



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE
En vue d'obtention du diplôme de
DOCTORAT 3^{EME} CYCLE

Spécialité : Biologie
Option : Biologie de la reproduction et développement

INTITULE

**ETUDE DE L'EXPOSITION DE L'ETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL
ETHER (EGME) SUR LA FONCTION DE LA REPRODUCTION DES
LAPINES CHEZ L'ESPECE *ORYCTOLAGUS CUNICULUS* :
ETUDE BIOCHIMIQUE, HEMATOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE**

Présenté par :
M^{me} BOUCHIKHI NOUR EL HOUDA
Soutenue le 29/05/2016

Devant le jury composé de :

Président :	Mr ABBOUNI Bouziane	Professeur UDL de Sidi-Bel-Abbès
Directeur de thèse :	Mme BENDAHMANE Malika	Professeur UDL de Sidi-Bel-Abbès
Examineur:	Mme AIT HAMADOUCHE Nadia	Professeur Univ.Ahmed Benbella-Oran1
Examineur :	Mr BEGHADALI Benali	MCA- UDL de Sidi-Bel-Abbès
Examineur :	Mr MENADI Norredine	MCA-UDL de Sidi-Bel-Abbès

Année universitaire : 2015-2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

*J*e remercie, avant tout, maître de l'univers pour ses bontés, notre Dieu tout puissant. Louange à **ALLAH**, qui m'a donné la volonté, le courage, la patience et sa miséricorde, je commence par Le remercier d'avoir eu la bonté de m'entourer de personnes formidables qui ont, chacune à leur façon, et ce, à différentes étapes de mon cheminement, contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de cette thèse de doctorat.

Paix et salut sur notre premier éducateur, le prophète MOHAMMED.

*Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, madame la professeure **BENDAHMANE-SALMI Malika**, qui, malgré ses nombreuses occupations, a accepté de prendre la direction de cette thèse en cours de route, transformant ainsi les difficultés rencontrées en une expérience enrichissante. Je lui suis également reconnaissante de m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de ces années, tout en me donnant toute fois la possibilité de trouver par moi-même mon cheminement personnel. Madame **BENDAHMANE-SALMI** a su diriger mes travaux avec beaucoup de disponibilité, de tact et d'intérêt. Elle m'a toujours accordé généreusement le temps nécessaire pour partager avec moi ses idées et sa grande expérience. De même, tout au long de cette thèse, elle n'a ménagé ni ses commentaires, toujours judicieux et rigoureux, ni ses encouragements. J'ai particulièrement apprécié sa très grande ouverture face à ma condition d'étudiante mariée et la confiance qu'elle a su garder en ma capacité à rendre ce projet à terme. surtout, pour sa grande patience, sa confiance et ses précieux et inestimables conseils. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. "C'est être ingrate si je ne disais pas ce que j'ai beaucoup appris de vous".*

*Je tiens particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements à professeure **ZAHZEH Touria** Pour sa fructueuse collaboration durant la réalisation de ce travail, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée et pour m'avoir fait profiter de leur connaissances, qui m'a dirigé au début de cette thèse. Elle a consacré, beaucoup de temps et d'énergie pour son avancement ; pour son analyse soignée et ses commentaires judicieux, lesquels m'ont permis de raffiner davantage certains points de l'analyse et de l'interprétation de mes données.*

*Je suis grandement reconnaissante à le professeur **ABBOUNI Bouziane** d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Les examinatrices et examinateurs qui ont accepté de siéger sur le jury de cette thèse doivent aussi trouver ici l'expression de ma reconnaissance, soit la professeure **AIT HAMADOUCHE Nadia**, et messieurs, docteur **BEGHDADLI Benali** et le docteur **MENADI Norredine**.*

*Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'ISBB BEJA, et j'en remercie ici tous les membres. Au docteur **SEBAI Hichem**, docteur **SELMI Slimen** et le directeur professeur **MARZOUKI Lamdjed** pour leurs accueil au sein de l'institut supérieurs de biotechnologie de Béja- TUNISIE.*

*Je ne saurais terminer sans souligner le soutien amical et chaleureux de mes copines et copains de tous les jours qui m'ont soutenue durant ce parcours doctoral. Je m'abstiens de les nommer tellement la liste est longue. Je nommerai tout de même mes amies, docteur **ZEMRI Khalida**, **LABIDI Oumayma** de l'ISBB BEJA, que je les remercie spécialement pour ses conseils et ses appuis.*

*Les mots me manquent pour remercier, à sa juste valeur, mon mari, **BERRABAH Abdelkrim**, pour ses soutiens moral et psychologique indispensables pour maintenir ce projet à flot au travers des aléas de la vie et pour avoir cru en mes capacités intellectuelles et à mon sens de l'organisation pour le réaliser.*

DEDICACE

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:

A mes très chers parents, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

*J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondé en moi.
Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.*

Que Dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A ma belle mère et mon beau père pour ses compréhensions, je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

*Je dédie cette thèse à mon mari qui a été le premier à m'encourager pour aller plus loin dans mes études. Il m'a appris le goût du travail, et de l'ambition. Parce que tu m'avais toujours soutenu,
Je te dédie ce travail pour que tu sois fière de moi.*

A mes frères (Yacine, Taha , Mohamed) et mes sœurs (Fatma, Ranya).

A mes belles sœurs et mes beaux frères leurs époux et épouses.

A toute ma grande famille (BOUCHIKHI et BERRABAH), oncles, tantes, cousins et cousines.

A tous qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

A mes adorables amies et collègues de toujours : Serrou Yamina, Maachou Aouali, Benalia Abdelkrim, Achemaoui Amine et Hamzaoui Hichem, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus Profond et mon affection la plus sincère.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nour el houda

Résumé

Les éthers de glycol sont des solvants organiques ayant de nombreuses applications industrielles, domestiques et cosmétiques, ils sont connus pour induire des perturbations de la fonction de reproduction. Cette étude a pour objectif de mettre en évidence l'effet reprotoxique, embryo-foetotoxique et hématotoxique de l'Éthylène Glycol Monométhyl Ether (EGME) et d'évaluer son stress oxydatif en évaluant son pouvoir oxydant *in vitro* chez les lapines gravides et non gravides de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Pour cela, dans la première partie de l'étude, trois groupes des lapines gravides (n=10) ont reçus par gavage trois doses croissantes de l'EGME à raison de 50, 100 et 150 ppm pendant (32 jours). Un suivi journalier du poids corporel et du déroulement de la gestation des lapines gestantes a été effectué. La deuxième partie a concerné l'étude de trois groupes de lapines non gravides (n=10) traitées par les mêmes doses précédentes pendant quatre semaines successives. Les résultats de l'exposition à l'EGME des lapines gravides indiquent l'existence d'un signe de toxicité maternelle traduit par une réduction remarquable très significative ($p < 0.01$) de poids corporel des lapines traitées accompagné par la réduction de la prise alimentaire et hydrique par rapport aux témoins. Le deuxième signe toxique est la résorption fœtale précoce qui est survenue autour de J7 à J9 de gestation chez toute les lapines traitées par la forte dose 150 ppm. La dissection des lapines décédées (autopsie) après l'avortement nous a permis de constater un aspect hémorragique utérine avec la présence des ulcères et des hémorragies gastriques graves vraisemblablement responsable du décès. Une véritable fœtotoxicité s'est manifestée par un prolongement anormal de gestation et une hypotrophie fœtale avec un changement comportemental très remarquable par rapport aux témoins. Concernant les lapines non gravides, nous avons démontré une toxicité gonadique (atrophie ovarienne) et une hépatotoxicité (hypertrophie du foie avec un aspect histopathologique), L'implication de l'EGME dans le stress oxydant est confirmée par une augmentation significative de la MDA témoignant une forte peroxydation lipidique, une réduction significative de l'activité enzymatique antioxydante de glutathion peroxydase (GSH-Px) et un effondrement du glutathion réduit (GSH) au niveau des ovaires et le foie. L'hématotoxicité de ce solvant a été confirmée chez les deux études par la détérioration significative des paramètres hématologiques : globules rouges (GB), hémoglobines (Hb), globules blancs (GB), plaquettes (PL) et l'altération hautement significative des paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, créatinine, urée, triglycéride, cholestérol et glucose).

En conclusion, la présente étude a montré que l'EGME est capable d'induire une forte reprotoxicité et altérer le système antioxydant.

Mots clés : EGME, lapines, reprotoxicité, hépatotoxicité, hématotoxicité.

Summary

Glycol ethers are a family of a widely use in industrial and household products. They are known to induce disturbances of a number of physiological functions including the function of reproduction. This study was carried out to investigate the effect of ethylene Glycol Mono Methyl Ether (EGME) on embryonic development, reproductive, biochemical, hematological parameters and antioxidant system in pregnant and non pregnant rabbits of the species *Oryctolagus cuniculus*. The solvent has been applied as reason of three doses: 50ppm, 100ppm and 150ppm throughout the duration of gestation (31 days) in pregnant rabbits and for four successive weeks in non-pregnant rabbits. From the analysis of our results, we observed a significant decrease in weight gain during treatment with EGME, a clear change in weight of the liver was obtained, there was also a significant decrease in ovary weight in rabbits. The comparison between controls and treated animals showed reproductive toxicity of EGME (weight reduction rabbits, spontaneous abortions, maternal mortality, prolongation of gestation, low birth weight), hepatotoxicity (increasing of liver weight with histopathology), hematotoxicity (significant deterioration in hematological parameters : red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb), white blood cell (WBC), plate (PL)) and highly significant alteration of biochemical parameters (ALAT, ASAT, urea, creatinin, triglyceride, cholesterol and glucose). In addition, the involvement of EGME in oxidative stress was indicated by an increase in MDA level, decrease in glutathione (GSH) level, in glutathione peroxidase (GSH-Px) in the studied organs.

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

Keywords: EGME, rabbits, reproductive toxicity, hepatotoxicity, hematotoxicity.

ملخص

اثيلان الغليكول هو نوع من المذيبات العضوية التي تدخل في العديد من التطبيقات الصناعية والمنزلية ومستحضرات التجميل. هدف هذه الدراسة هو تسليط الضوء على تأثير هذه الأخيرة على وظيفة الإنجاب عند الأرانب الحوامل وغير الحوامل للقيام بذلك خصصنا في الجزء الأول من هذه الدراسة، ثلاث مجموعات من الأرانب الحوامل (ن = 10) حصلت على 50 و 100 و 150 ppm من خلال أنبوب خاص ثلاث جرعات متزايدة من EGME (32 يوما). تم إجراء الرصد اليومي لوزن الجسم. اما الجزء الثاني من الدراسة فيتعلق بثلاث مجموعات من الأرانب غير الحوامل (ن = 10) تعامل مع نفس الجرعات خلال أربعة أسابيع على التوالي. نتائج تعرض الأرانب الحوامل للEGME تشير النتائج إلى وجود أدلة على تسمم الأمهات يتمثل في انخفاض كبير جدا و ملحوظ ($P < 0.01$) في وزن الجسم و هذا يرافقه انخفاض الاستهلاك الغذائي والمائي مقارنة مع الشواهد. العلامة الثانية هي ارتشاف الجنين في وقت مبكر (J7 إلى J9 من الحمل) التي وقعت عند جميع الأرانب المعالجة مع جرعة عالية 150 و 100 ppm. تشريح الأرانب النافقة (التشريح) بعد الإجهاض، تدل على وجود نزيف الرحم مع وجود تقرحات ونزيف في المعدة من المحتمل ان تكون مسؤولة عن وفاة هذه الأخيرة. وتجلى تسمم الجنين التي ادت إلى إطالة الحمل إلى أمد غير طبيعي وتأخر نمو الجنين مع تغيرات سلوكية ملحوظة مقارنة بالمجموعة الضابطة. وفيما يتعلق بالأرانب غير الحوامل، أثبتنا تسمم الغدد التناسلية (ضمور المبيض) وتسمم الكبد (تضخم الكبد مع التشريح المرضي) إشراك EGME في الأكسدة في ما يؤكد زيادة كبيرة في MDA، انخفاض كبير في نشاط انزيم المضادة للأكسدة GPx وانهيار GSH في المبيض والكبد. وقد أكدت الدراسة في كلتا الحالتين تدهور كبير من المعلمات الدموية: خلايا الدم الحمراء، خضاب الدم، خلايا الدم البيضاء والصفائح الدموية وتغيير كبير للغاية من المعلمات الكيمياء الحيوية.

في الختام أظهرت هذه الدراسة أن EGME قادر على إحداث تغير ملحوظ في القدرة الإنجابية وتغير نظام مضاد للأكسدة

كلمات السر: EGME، الأرانب، الإنجابية، مضاد للأكسدة.



TABLE DES MATIÈRES

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
<i>Chapitre I. Anatomie et physiologie de la reproduction chez la lapine....</i>	6
1. Anatomie	6
1.1. Appareil reproducteur externe et Sexage	6
1.2. Appareil reproducteur interne	8
2. Différenciation et maturité sexuelle	10
3. Comportements sexuels	11
3.1. Réceptivité sexuelle de la lapine	11
3.2. Accouplement	12
3.3. Gestation et mise-bas	13
3.4. La lactation	16
4. Physiologie de la reproduction : Mécanismes cellulaires et hormonaux	17
4.1. Cycle œstral	17
4.2. Ovulation	19
4.2.1. Activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique	19
4.2.2. Lutéinisation (formation du corps jaune)	22
4.2.3. Parcours de l'ovocyte / Fécondation	23
4.3. Gestation	23
4.4. Parturition et Post-partum	24
<i>Chapitre II. L'Ethylène Glycol Monométhyl Ether (EGME)</i>	28
1. Les données générales sur les éthers de glycol	28
2. L'Ethylène Glycol Monométhyl Ether (EGME).....	28
2.1. Définition	28
2.2. Identité et propriétés physico-chimiques	29
2.3. Caractérisation de la pénétration de l'EGME dans l'environnement	31
2.3.1. Production, importation et utilisations	31
2.3.1.1. Les principales utilisations de l'EGME	31
2.3.2. Sources et rejets	32
2.3.3. Devenir dans l'environnement	33
2.3.4. Distribution dans l'environnement	34
2.4. Toxicocénitique de l'EGME	34
2.4.1. Absorption	34
2.4.2. Absorption chez l'animal.....	34
2.4.3. Absorption chez l'homme.....	35
2.4.2. Distribution	35

2.4.2.1. Passage placentaire et distribution chez le fœtus	35
2.4.3.. Métabolisme	35
2.4.4. Elimination	36
2.5. Écotoxicologie	37
2.5.1. Organismes terrestres	37
2.5.2. Organismes aquatiques	37
2.6. Toxicité des éthers de glycol	38
2.6.1. Toxicité de l'EG chez l'animal.....	38
2.6.1.1. Toxicité aiguë.....	38
2.6.1.2. Toxicité à court terme	38
2.6.1.3. Administration chronique d'EG chez l'animal	39
2.6.1.4. Toxicité des éthers de glycol à dose chronique sur la reproduction	39
2.6.1.5. Toxicité des éthers de glycol à dose répétées sur pour le développement	41
2.6.1.6. Effets hématotoxiques d'EG à doses répétées	42
2.6.1.6.1. Action sur la moelle osseuse.....	43
2.6.1.7. Immunotoxicité	43
2.6.1.8. Neurotoxicité	44
2.6.1.10. Effets génotoxiques in vitro et in vivo et les effets cancérogènes des EG	45
2.6.2. Toxicité de l'EGME chez l'homme	46
8.1. Études épidémiologiques	47
Chapitre III : Stress oxydatif	50
1. Définition du stress oxydant	49
2. Origine du stress oxydant	49
3. Les radicaux libres	50
3.1 Définition des radicaux libres	50
3.2. Les types des radicaux libres	50
3.2.1. Le radical anion superoxyde (O ₂ ^{•-})	50
3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	52
3.2.3. Radical hydroxyle (OH [•])	52
3.2.4. L'anion monoxyde d'azote (NO [•])	52
3.3. Potentialité toxique des espèces radicalaires	53
3.3.1. La peroxydation lipidique	53
3.3.2. Dommages oxydatifs de l'ADN	54
3.3.3. Oxydation des protéines	54
3.4. Implication du stress oxydant dans les pathologies	55
3.5. Les systèmes de défenses antioxydants	55
3.5.1. Les systèmes enzymatiques	55
3.5.2. Système non enzymatique	57
3.6. Stress oxydant et grossesse	59
3.6.1. Stress oxydant et fœtus	60
3.6.2. Stress oxydant et placenta	61
Etude expérimentale	
Chapitre VI : Matériels et Méthodes.	64
Objectif du travail	64
1. Matériels	64
1.1. Matériel biologique.	64
1.1.1. Le choix de l'animal	64
1.2. Matériel chimique	65
1.2.1. Le choix de la dose	65
1.3. Conditions d'élevages	66

1.3.1. Les expérimentations sur les lapines gravides	66
1.3.2. Les expérimentations sur les lapines non gravides	67
2. Principes et protocole expérimental	68
2.1. <i>Etude de l'effet de l'EGME sur les lapines gravides</i>	68
2.1.1. Le déroulement de l'expérimentation	68
2.1.2. La détermination de l'état d'œstrus des lapines	68
2.1.3. La saillie (Accouplement)	69
2.1.4. L'administration de l'EGME par voie orale	69
2.1.5. Les pesées des lapines	70
2.1.6. Diagnostic de gestation	71
2.1.7. la préparation de la boîte à nid	72
2.1.8. La mise bas	72
2.1.9. Prélèvement de sang	73
2.1.10. Prélèvement des organes	74
2.2. <i>L'étude de l'effet de l'EGME sur les lapines non gravides</i>	74
2.2.1. Suivi pondéral des lapines non gravides	74
2.2.2. Prélèvement du sang	75
2.2.3. Les sacrifices	75
2.2.4. Les dosages des paramètres de stress oxydant	76
2.3. <i>Méthodes de dosage des paramètres biochimiques</i>	76
2.3.1. Dosage plasmatique du glucose plasmatique	77
2.3.2. Dosage des triglycérides	77
2.3.3. Dosage des protéines totales.	77
2.3.4. Dosage du cholestérol	78
2.3.5. Dosage de créatinine	79
2.3.6. Dosage de l'urée	80
2.3.7. Dosage d'Aspartate-Aminotransférase (ASAT/TGO)	81
2.3.8. Dosage de l'Alanine-Aminotransférase (ALAT/GPT)	82
2.4. <i>Evaluation de la toxicité hématologique</i>	82
2.5. <i>Dosage des biomarqueurs de stress oxydant</i>	83
2.5.1. MDA (hépatique et ovarien).....	83
2.5.2. GSH (hépatique et ovarien)	84
2.5.3. GPx (hépatique et ovarien).....	85
3. Etude histologique	86
4. Etude statistique	92
Chapitre V : Résultats	94
1. <i>Effet de l'EGME sur les lapines gravides</i>	94
1.1. Effet sur le poids corporels	94
1.2. Effet sur la survenue d'avortement	95
1.3. Mortalité des lapines	96
1.4 Durée de gestation	97
1.5. Effet sur les poids fœtaux	97
1.6. Effet sur les paramètres biochimiques du sang	99
1.7. Effet sur les paramètres hématologiques	105
2. <i>Effet de l'EGME sur les lapines non gravides</i>	106
2.1. Effet sur le poids corporels	106
2.2. Effet sur le poids hépatique.	104
2.3. Effet sur le poids des ovaires	105
2.4. <i>Effets sur le taux du glutathion (GSH)</i>	106
2.4.1 Variations du taux du glutathion hépatique	106

2.4.2 Variations du taux du glutathion ovarien	106
2.5 Effets sur le taux du malondialdéhyde (MDA)	107
2.5.1 Variations du taux du MDA hépatique	107
2.5.2 Variations du taux du MDA ovarien	107
2.6 Taux du glutathion peroxydase (GSH-px)	108
2.6.1 Taux de GSH-px hépatique	108
2.6.2 Taux de GSH-px ovarien	108
2.7. Effet de l'EGME sur les paramètres biochimiques du sang	109
3. Effet de l'EGME sur les paramètres hématologiques	117
4. Etudes histologiques	118
Chapitre VII : Discussion	119
Conclusions générales et perspectives	129
Référence bibliographiques	133
Annexe	146

Liste des abréviations

ALDH : Aldehydes Deshydrogenase

AMP : Acide Méthoxypropionique

BHT : Butylhydroxytoluène

BSA : Sérum albumine bovine

CAT : Catalase

COOH : Groupement carboxyle

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

DO : Densité Optique

DTNB Acide 5-5'-dithio-bis-2-Nitrobenzoïque

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

EGME : Ethylène glycol mono méthyle ether

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FNS : Formule de numération sanguine

GB : Globules Blancs

GPx : Glutathion Peroxydase

GR : Globules Rouges

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Hb : Hémoglobine

HCl : Acide Chlorhydrique

HCG : Human Chorionic Gonadotropin

INRS : Institut National de Recherché et de Sécurité

IPAA : Acide Isopropoxyacétique

IPG2ME : 1-Propylène Glycol 2-Méthyl Ether

INSERM : Institut National de Santé et de la Recherché Médicale

LH : Luteinizing Hormone

MAA : Acide méthoxyacétique

MDA : Malondialdéhyde

PGE : Prostaglandine

PPM : Partie Par Million

RCIU : Retard de Croissance Intra-utérine

ROS : Reactive Oxygen Species

SOD : Superoxyde Dusmatase

SSA : Acide SulfoSalycilique

TBA : Acide Thiobarbiturique

TCA : Acide trichloracétique

Liste des figures

- Figure 1 :** Sexage des lapins
- Figure 2 :** Glandes cutanées et mamelles de la lapine
- Figure 3 :** Organes urinaires et génitales de la lapine (vue ventrale)
- Figure 4 :** Appareil reproducteur des lapines
- Figure 5 :** Durées de gestation observées sur 2888 lapines blanches néo-zélandaises
- Figure 4 :** Part des femelles ayant accepté le mâle selon la période de gestation
- Figure 6:** Follicule tertiaire ou à antrum de lapine, au microscope optique
- Figure 7 :** Action des hormones gonadotropes sur les deux types cellulaires stéroïdogènes de l'ovaire : les cellules de la thèque interne et les cellules de la Granulosa
- Figure 8 :** Système porte hypothalamo-hypophysaire
- Figure 9 :** Taux plasmatique post-coït en LH et FSH
- Figure 10 :** Taux plasmatique post-coït en ocytocine et prolactine
- Figure 11 :** La balance oxydants/anti-oxydants
- Figure 12 :** La production d'ERO et ses conséquences cellulaires
- Figure 13 :** Phosphorylation oxydative, production de superoxyde, et les voies d'élimination dans les mitochondries
- Figure 14 :** Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol mono méthyl (EGME)
- Figure 15:** Le solvant utilisé dans l'expérimentation
- Figure 16 :** Le bâtiment d'élevage cunicole au niveau de CFPA d'Ouled Mimoune - TLEMCEN
- Figure 17:** Le bâtiment de l'expérimentation au niveau de la réserve de chasse de Sig – MASCARA
- Figure 18 :** L'observation de la couleur de la vulve
- Figure 19:** L'accouplement
- Figure 20 :** Le gavage de l'EGME à l'aide d'un pistolet
- Figure 21.** Un suivi pondéral des lapines gestantes
- Figure 22 :** Diagnostic de la gestation
- Figure 23 :** Une lapine témoin après la mise bas
- Figure 24:** Schéma récapitulatif du protocole expérimental (lapines gravides).
- Figure 25 :** Le gavage de l'EGME par voie orale chez des lapines non gravides pendant 4 semaines successives
- Figure 26:** Technique de prélèvement de sang.
- Figure 27 :** La dissection des lapines et prélèvement des organes.
- Figure 28:** Schéma récapitulatif du protocole expérimental chez les lapines non gravides.
- Figure 29 :** Les techniques histologiques
- Figure 30 :** Effet de l'EGME sur le poids corporel des lapines gestantes (g)
- Figure 31 :** Effet de l'EGME sur la survenue d'avortement (j).
- Figure 32 :** Début de saignement hémorragique
- Figure 33 :** avortement spontané des lapines de groupe 100 et 150ppm
- Figure 34 :** Mortalité des lapines causée par l'EGME(j)
- Figure 35 :** Une lapine décédée après un avortement
- Figure 36 :** observation de fœtus morts *in utero* dans les deux cornes utérines des lapines qui ont fait un avortement partiel
- Figure 37 :** Présence des une hémorragie digestive grave chez les lapines décédées
- Figure 38 :** Durée de gestation (j) entre le groupe témoin et groupe 50ppm

- Figure 39 :** Le poids corporels des fœtus après la mise bas
- Figure 40 :** La mise bas des lapines traitées par la dose 50 ppm à l'intérieur des cages
- Figure 41:** Taux plasmatique du glucose (g/L)
- Figure 42 :** Taux plasmatique du cholestérol (g/L)
- Figure 43 :** Taux plasmatique des triglycérides (g/L)
- Figure 44 :** Evaluation de taux plasmatique des protéines totales (g/L)
- Figure 45 :** Taux plasmatique d'ASAT (UI/L)
- Figure 46 :** Taux plasmatique d'ALAT (UI/L)
- Figure 47:** Taux plasmatique de créatinine (mg/L)
- Figure 48:** Taux plasmatique de l'urée (g/L)
- Figure 49 :** Effet de l'EGME sur le poids corporel des lapines gestantes (g)
- Figure 50:** Effet de l'EGME sur le poids hépatique (g)
- Figure 51 :** Effet de l'EGME sur le poids ovarien (g)
- Figure 52 :** Variation du taux de glutathion hépatique (nmol/mg prot)
- Figure 53:** Variation du taux de glutathion ovarien (nmol/mg prot)
- Figure 54 :** Variation du taux de MDA dans le foie (nmol/g)
- Figure 55 :** Variation du taux de MDA dans les ovaires (nmol/g)
- Figure 56 :** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) dans le foie (UI/g prot)
- Figures 57 :** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) dans les ovaires (UI/g prot)
- Figure 58:** Taux plasmatique du glucose (g/L)
- Figure 59:** Taux plasmatique du cholestérol (g/L)
- Figure 60:** Taux plasmatique des triglycérides (g/L)
- Figure 61 :** Evaluation de taux des protéines totales plasmatiques (g/L)
- Figure 62:** Taux plasmatique d'ASAT (UI/L)
- Figure 63:** Taux plasmatique d'ALAT (UI/L)
- Figure 64:** Taux plasmatique de créatinine (mg/L)
- Figure 65:** Taux plasmatique de l'urée (g/L)
- Figure 66:** Etude histologique de foie chez les lapines traitées par la dose 50,100 et 150ppm d'EGME

La liste des tableaux

Tableau 1: Identification de l'EGME

Tableau 2: Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME

Tableau 3: Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol mono méthyle (EGME).

Tableau 4: Revue des produits contenant des éthers de glycol, présents sur le marché en 2002

Tableau 5: Principaux produits susceptibles de contenir des éthers de glycol

Tableau 6: Métabolites acides formés ou supposés être formés selon la molécule d'EG

Tableau 7: Effets génotoxiques des éthers de glycol et de leurs métabolites *in vitro*

Tableau 8: Synthèse de niveau de preuve de danger par période d'exposition par l'EGME

Tableau 9: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées

Tableau 10 : les variations des paramètres sanguins chez les lapines gravides

Tableau 11 : Les variations des paramètres sanguins chez les lapines non gravides



INTRODUCTION

GENERALE

Introduction Générale

L'EGME est un dérivé des éthers de glycol (EG) dont l'utilisation s'est développée de façon importante à partir des années 1960, au plan domestique et professionnel, principalement dans les produits dits à l'eau (peintures, encres, vernis, produits d'entretien) (Cicolella, 2006).

La pénétration des EGME dans l'organisme humain se fait principalement lors d'un contact direct, à travers la peau, leur faible volatilité limite la contamination par voie respiratoire sauf dans des situations où les produits sont chauffés ou utilisés sous forme d'aérosols (Marie, 2002 ; Etiemble, 2003). Ils accèdent à tous les compartiments dans les minutes qui suivent l'absorption, quelle que soit la voie d'administration (Sabourin *et al.*, 1992 ; Ahmed *et al.*, 1994 ; Johanson, 1994).

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, l'EGME qui appartient à la catégorie éthylénique des EG 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 (Wang *et al.*, 2000).

Depuis la première publication de Nagano en 1979, de nombreuses études réalisées chez l'animal de laboratoire ont montré que l'EGME présentait des effets adverses sur la reproduction et le développement. L'EGME est un toxique de la reproduction qui induit une infertilité et une atteinte de l'appareil génital sur les deux sexes, ainsi qu'une atteinte du développement embryo-fœtal après exposition maternelle (malformation et altération du développement). Les données épidémiologiques publiées à partir de la fin des années 1980 ont confirmé les données animales (malformation, avortement spontané, hypofertilité). Cette atteinte peut perdurer même après retrait de l'exposition (INSERM, 1999).

Les études d'évaluation des risques invitent à penser que l'exposition massive aux EG reprotoxiques pendant plusieurs décennies peut avoir un impact important sur la santé reproductive de la population. L'ensemble des études menées à l'échelle internationale se sont intéressées aux effets des EG sur les paramètres de reproduction y compris la fertilité féminine (Cicolella, 2006). Il s'agit de l'altération de l'ovogenèse ou de la perturbation du développement embryonnaire. Sa toxicité 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).

Chez l'Humain, des études chez les femmes sont plus ambiguës. Elles semblent montrer une tendance à une baisse de la fertilité sans qu'elle soit statistiquement significative. Des augmentations du taux d'avortements ont également été observées dans l'industrie des semi-conducteurs lors de l'exposition aux EG de la famille éthylénique (Cicolella, 2006).

Une étude cas-témoins a mis en évidence, sur 44 patients atteints des malformations congénitales et souffrants des retards mentaux, un lien avec l'exposition professionnelle des mères à un mélange d'EGME et d'éthylène glycol pendant leur grossesse. Les enfants présentaient des signes et symptômes tels que des anomalies faciales, des retards mentaux, des anomalies sensorielles et des malformations des muscles squelettiques (Arteaga *et al.*, 2005).

En 2002, EL-ZEIN a étudié 41 bébés nés de 28 femmes exposées professionnellement à l'EGME six bébés étaient exposés durant leur grossesse. Leurs six enfants présentaient des aspects dysmorphiques caractéristiques, non observés chez les 35 autres enfants (El-zein *et al.*, 2002).

Plusieurs études professionnelles et rapports de cas ont indiqué que l'EGME ou son métabolite (MAA) présentent une toxicité sur la fonction de reproduction chez plusieurs espèces, y compris l'être humain (Bagchi & Waxman, 2007; Baert, 2007).

La toxicité des EGME sur la fonction de reproduction chez la femelle non gravide a été très peu étudiée. Chez l'animal, le seul indicateur recherché a été celui de la fertilité (femelles exposées et accouplées à des mâles non exposés).

L'EGME exerce sa toxicité par l'intermédiaire de ces métabolites. 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. Il est connu pour son effet toxique sur la fonction de la reproduction féminine. Grâce à sa propriété amphiphile, il diffuse dans tous les tissus et affecte leurs fonctions vitales (Lieber, 2005).

D'autres études ont démontré que l'administration répétée d'EG produit parfois des altérations fonctionnelles et/ou histologiques hépatiques. Les effets hépatiques rapportés avec l'EGME ont été observés pour des doses supérieures à celles susceptibles d'induire des atteintes hématologiques. Ce solvant est considéré comme produit hémato-immunotoxique: atteinte des cellules sanguines (INSERM, 1999), neurotoxiques, atteinte du système nerveux (Brashear, 1996), reprotoxiques atteignant la fonction de reproduction (Lorente *et al.*, 2000 ; Ku *et al.*, 1995 ; Baert, 2007), hépatotoxique et néphrotoxique (Djebali *et al.*, 2009, Bendjeddo *et al.*, 2014, Boucif *et al.*, 2015).

Depuis quelques années, le monde des sciences biologique et médicale est envahis par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est à dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence et l'excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (Favier, 2003). Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire, induite soit par production de radicaux libres, soit par diminution de la capacité de défense antioxydants induits par les xénobiotiques comme les solvants toxiques (Faigne, 2008).

La toxicité de l'EGME sur la fonction de la reproduction peut s'exprimer au niveau des gonades (ovaires). La manifestation d'une telle toxicité peut inclure des effets délétères sur la maturation sexuelle, la production, la qualité et le transport des gamètes, le comportement sexuel, le déroulement de gestation et sur toutes les autres fonctions dépendantes de l'intégrité du système reproducteur.

C'est dans cet axe que se dirige notre travail de recherche qui consiste en une étude expérimentale de l'effet de l'exposition de: l'Ethylène Glycol Monométhyle Ether (EGME) sur quelques paramètres relatifs à la fonction de la reproduction et certains paramètres biochimiques et hématologiques. De même, l'impact de ce solvant sur le système antioxydant chez les lapines (*Oryctolagus Cuniculus*) a été recherché.

Ce manuscrit se divise en deux parties :

✚ **Une synthèse bibliographique** qui comprend trois chapitres

- Chapitre I consacré à des rappels *anatomo-physiologiques de la reproduction chez la lapine* et ses particularités reproductives
- Chapitre II est une étude des caractères physico-chimiques de l'EGME, son utilisation et ses effets sur la santé et l'environnement.
- Chapitre III sur le stress oxydant ses origines et son implication dans les pathologies et la grossesse.

✚ **Une partie expérimentale** dans laquelle nous présentons les matériels et les méthodes fournis, le mode de traitement ainsi que l'ensemble de manipulations réalisées *in vitro* pour obtenir les résultats souhaités.

Les résultats obtenus après l'exposition des animaux à l'EGME et enfin, nous essayons de discuter les résultats obtenus et les comparer avec les données disponibles dans la littérature.



SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Anatomie et Physiologie de la Reproduction chez la Lapine

I. Anatomie et physiologie de la reproduction chez la lapine

1. Anatomie

1.1. Appareil reproducteur externe et Sexage

Le sexage des lapins avant le développement et la descente des testicules chez le mâle est assez difficile et nécessite un opérateur expérimenté. Cependant, on peut observer une distance entre la vulve et l'anus chez la femelle plus grande qu'entre le pénis et l'anus chez le mâle. De plus, en effectuant une pression délicate de part et d'autre de l'orifice génital, on peut mettre en évidence, chez le mâle un orifice protubérant arrondi en forme de tube correspondant à l'extériorisation du pénis, alors que chez la femelle on peut observer une fente à l'extrémité pointue crânialement correspondant à la vulve (Figure 1).

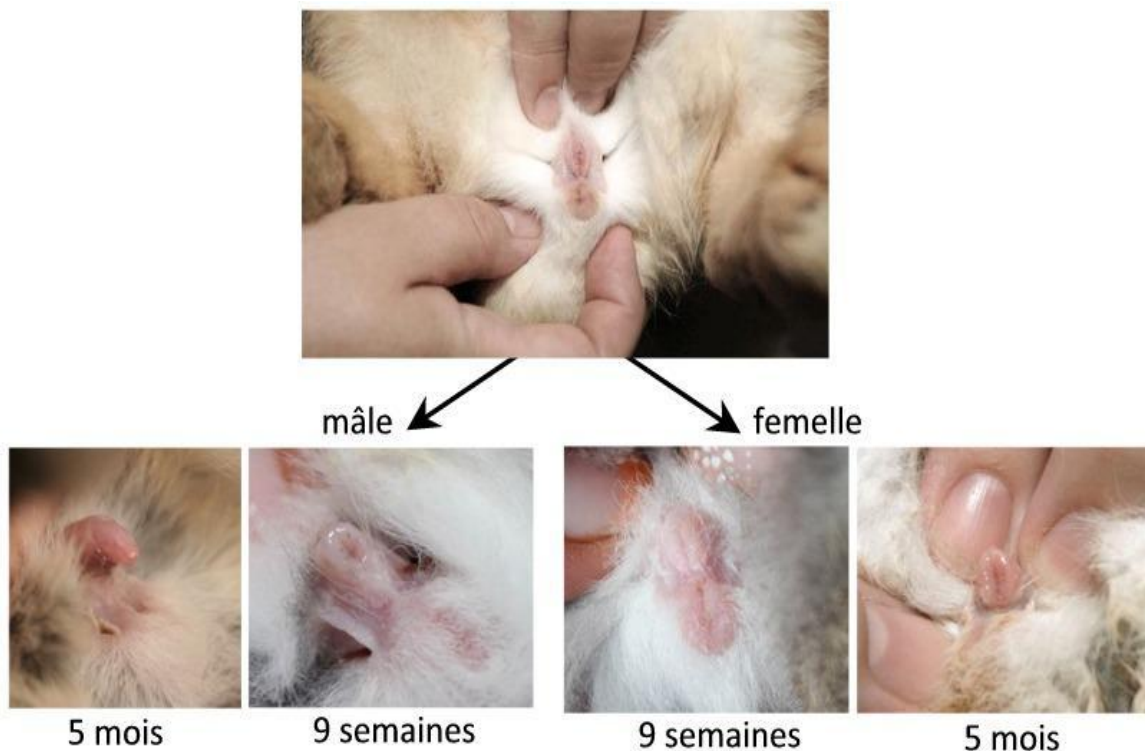


Figure 1 : Sexage des lapins (HRN. 2012)

La vulve est constituée de deux paires de lèvres : les grandes lèvres, recouvertes de poils sur leur face latérale et les petites lèvres internes aux précédentes et plus fines. Leur aspect peut se modifier au cours du temps : en temps normal, elles sont rose pâle mais en période de réceptivité sexuelle, elles vont avoir tendance à enfler et virer au rouge-violacé.

Les glandes mammaires sont distribuées en deux rangées dans le tissu graisseux ventro-latéral de la lapine, allant de la région thoracique à la région inguinale (Figure 2). Il en est

dénombré en général 4 paires : une paire axillaire, une thoracique, une abdominale et une inguinale. Cependant certaines lapines en ont 5 voire 6 paires, notamment suite à une sélection génétique sur un critère de prolificité (plus la portée est grande, plus il « faut » de places pour la tétée de tous les lapereaux). Les variations de nombre portent en général sur les paires les plus ventrales et donc les plus accessibles lors de la tétée, c'est-à-dire les abdominales et les thoraciques. Chaque tétine est munie de 5 à 6 canaux évacuateurs et correspond à une glande mammaire indépendante. Le tissu mammaire est difficilement palpable en temps normal mais se développe fortement avant la gestation et pendant la lactation, où il devient alors bien visible (Barone *et al.*, 1973)

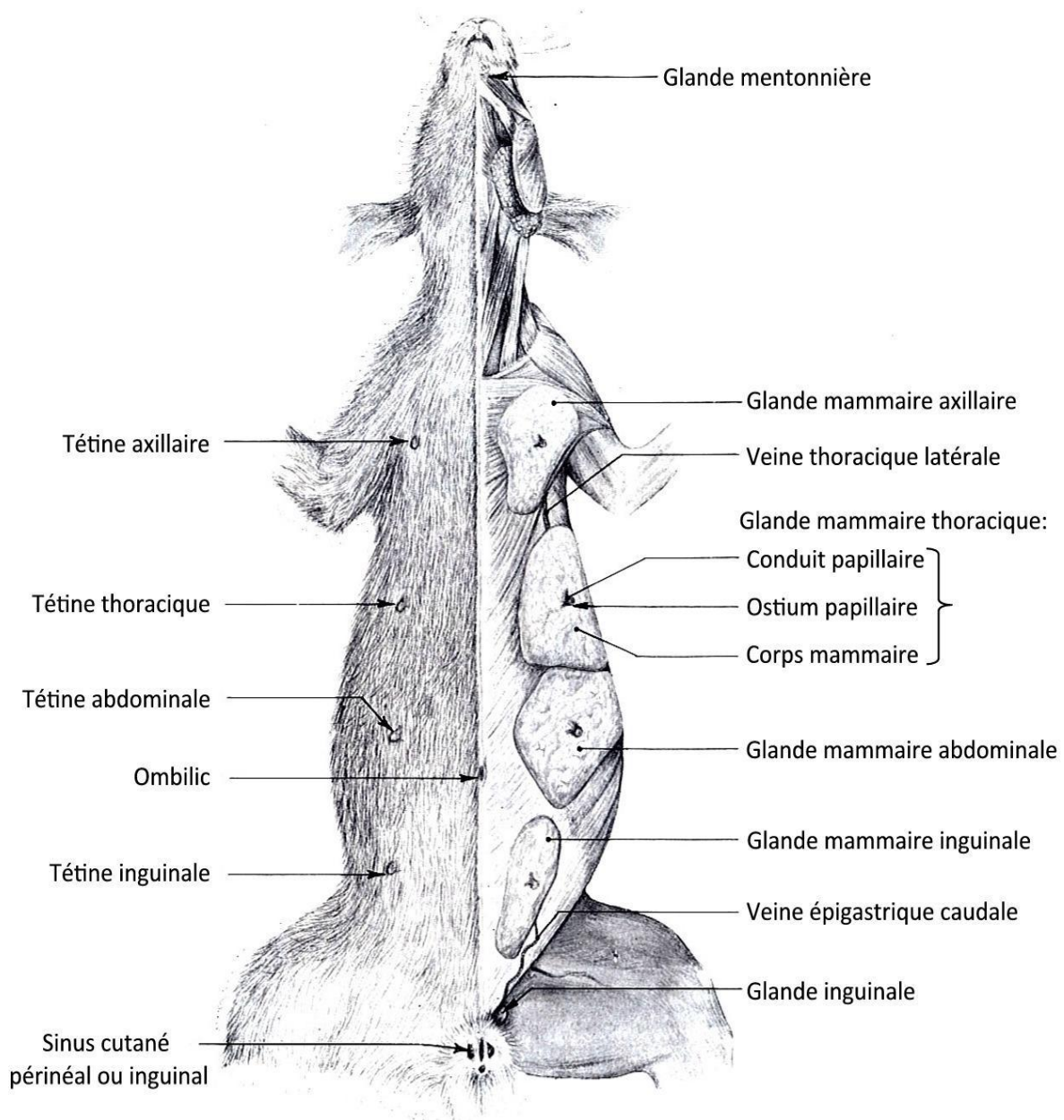


Figure 2 : Glandes cutanées et mamelles de la lapine (Barone *et al.*, 1973)

1.2. Appareil reproducteur interne

Le vestibule faisant suite à la vulve est assez long, entre 4 et 6 cm selon la taille des lapines.

Le corps du clitoris s'étend sur la face ventrale du vagin, dans son tiers postérieur et son gland se projette dans l'ouverture urogénitale (Figure 3).

Le vagin est également long, entre 4 et 8 cm pour 1 à 1,2 cm de largeur. Sa paroi est fine ce qui lui donne une forme aplatie. La vessie s'y insère au niveau du méat urinaire, situé sur le plancher vaginal à mi hauteur du vestibule.

L'utérus de la lapine a la particularité de n'être composé que des deux cornes utérines, s'abouchant chacune directement dans le vagin, par un col qui lui est propre. Ainsi, en cas de césarienne, si des fœtus sont présents dans les deux cornes, il faudra inciser chacune d'elles puisqu'une mobilisation de ceux-ci vers un même endroit (en général le corps de l'utérus) est dans le cas de la lapine, impossible.

En règle générale, les cornes utérines mesurent 10 à 12 cm de long pour un diamètre compris entre 4 et 7 mm selon les lapines. Cependant, de larges variations sont observables selon le stade physiologique, l'âge, les imprégnations hormonales... Contrairement aux carnivores domestiques, les artères utérines ne sont pas accolées à l'appareil génital mais circulent dans le mésométrium ou ligament large. Celui-ci constitue en outre un lieu important de stockage des graisses, ce qui peut rendre difficile la visualisation de ces vaisseaux en vue d'une ligature. Chaque corne est terminée par un oviducte relativement long avec un pavillon très développé qui s'enroule latéralement et crânialement autour de l'ovaire.

Les ovaires sont de forme allongée et des follicules sont le plus souvent visibles à leurs surfaces. Ils mesurent entre 1 et 2 cm de long pour 6 à 8 mm de large. Dans la cavité abdominale, ils sont situés en position dorsale, plus précisément ventro-caudalement aux reins, à hauteur de la cinquième vertèbre lombaire. Ils sont reliés à la paroi abdominale par le *mesovarium*, qui est ample et permet donc une mobilisation relativement facile lors des stérilisations (Barone *et al.*, 1973).

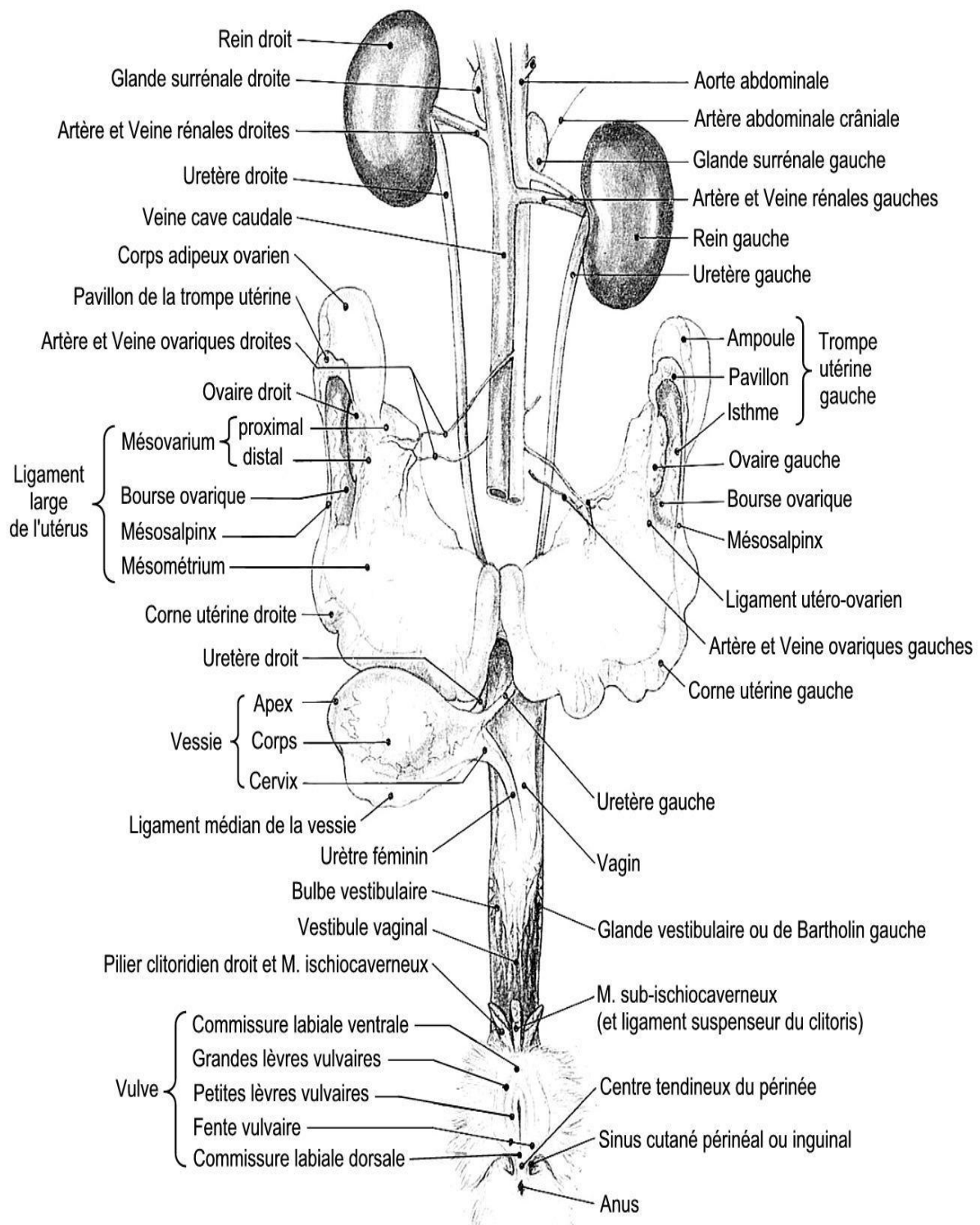


Figure 3 : Organes urinaires et génitaux de la lapine (vue ventrale) (Barone *et al.*, 1973)

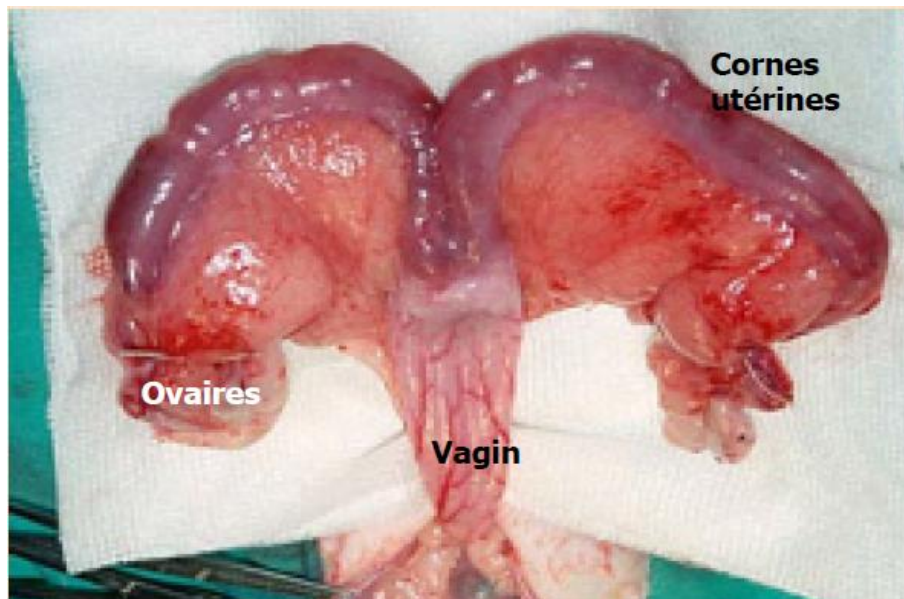


Figure 4 : Appareil reproducteur des lapines (Esther, 2006)

2. Différenciation et maturité sexuelle

L'appareil génital se met en place grâce à des nombreuses évolutions dès l'embryogenèse : la première étape, commune aux mâles et aux femelles, est la différenciation sexuelle, dès le 16ème jour post-fécondation (Delforge, 2003).

Chez les femelles, les divisions ovogoniales commencent au 21ème jour de la vie fœtale et se poursuivent jusqu'à constituer le stock définitif d'ovogonies. À la naissance, ces divisions cessent et laissent place à l'ovogenèse : les premiers follicules primordiaux sont formés dès le 13ème jour après la naissance et les premiers follicules à antrum vers 65-70 jours. En parallèle de ces évolutions cellulaires, la croissance des organes sexuels se poursuit, mais nettement moins vite que celle du reste du corps : les ovaires notamment ne commencent significativement à se développer qu'à partir de 50 à 60 jours (Lebas, 1996).

C'est en général vers 10-12 semaines que les femelles peuvent accepter l'accouplement pour la première fois. Cependant cela ne correspond pas réellement à la maturité sexuelle ou puberté car en général il n'y pas ovulation. En effet, on définit par maturité sexuelle chez la lapine, le moment où elle aura la capacité d'ovuler en réponse à l'accouplement. Ce moment est difficile à définir car il varie selon de nombreux facteurs:

- *la race du lapin*, les petits formats étant en général les plus précoces
- *le développement corporel* : il a été observé qu'en moyenne, les lapines sont pubères lorsqu'elles atteignent 75 % de leur poids adulte même s'il est conseillé d'attendre qu'elles soient à 80 % pour les mettre à la reproduction.

- la photopériode et le moment de la naissance par rapport au printemps : effectivement, le temps d'éclairement par jour ou photopériode influe nettement sur la reproduction, avec une durée optimale au printemps. Ainsi les lapines sont souvent pubères à ce moment-là qu'elles soient nées en été ou en automne dernier, celles nées en été ont une maturité sexuelle plus tardive que celles nées en automne.

- l'alimentation : elle influe directement sur le développement corporel, une lapine sous-alimentée aura une puberté plus tardive. Pour les lapines de compagnie qui sont en général de petit ou moyen format, la puberté intervient en général vers 4 à 5 mois. Cependant, compte tenu des variabilités individuelles, il est conseillé d'isoler les mâles des femelles dès le sevrage (vers la 7ème ou 8ème semaine) pour éviter des gestations indésirables (Lebas, 2011).

3. Comportements sexuels

3.1. Réceptivité sexuelle de la lapine

Les lapines, comme les chattes et les furettes, ne présentent pas de cycle œstral net : on n'observe pas l'apparition de chaleurs à intervalle de temps régulier, au cours desquelles l'ovulation a lieu spontanément. Chez elles, l'ovulation est provoquée par des stimuli nerveux et hormonaux lors de l'accouplement. Elles sont donc considérées en œstrus quasipermanent, c'est-à-dire sexuellement réceptives en quasi-permanence. Cependant il existe une certaine variation de la réceptivité sexuelle de la lapine. En effet, elle présente des courtes phases où elle refuse l'accouplement : on parle alors de phase de dioestrus et la lapine est dite « non-réceptive » (Donnelly, 2004).

Au niveau comportement, une lapine réceptive va se caractériser par :

- l'acceptation du mâle et de l'accouplement
- la position de lordose avec la croupe relevée notamment à la stimulation de l'arrière-train qui est l'un des indicateurs les plus fiables
- le changement d'aspect de la vulve qui devient rouge et humide ; on note d'ailleurs que 90 % des lapines présentant ce caractère acceptent le mâle et ovulent, contre seulement 10 % des femelles ayant la vulve pâle et rosée (Lebas, 1996).
- Une certaine hyperactivité et chevauchement entre congénères du même sexe

À l'opposé, une femelle non réceptive présentée au mâle aura tendance à se blottir dans un coin de la cage ou à essayer de s'échapper, voire à être agressive.

Il est encore difficile de prévoir l'intervalle de temps entre chaque dioestrus et c'est un élément très discuté (Patton, 1994).

L'étude réalisée par Moret en 1980 montre une grande variabilité individuelle entre chaque lapine. Cette étude a été menée pendant 1 mois sur 15 lapines pubères nullipares. Chaque jour, un mâle a été présenté à la femelle et son comportement sexuel a été noté (réceptivité ou non-réceptivité) tout en empêchant l'accouplement le cas échéant afin de pouvoir poursuivre l'expérience. On peut ainsi noter des lapines réceptives entre 20 et 27 jours d'affilée, comme des lapines réceptives seulement quelques jours.

À l'opposé, l'étude réalisée par Cheeke *en* 1987 laisse supposer qu'il existe une certaine régularité avec une période de réceptivité de 14 à 16 jours, suivie d'une période de non réceptivité de 1-2 jours.

Il existe également une variation de la réceptivité sexuelle en fonction de la saison et en particulier du temps d'éclairement et de la température. En effet, dans les conditions naturelles, les lapines présentent leur plus forte réceptivité au printemps et au contraire leur plus faible réceptivité en automne. Dans les conditions d'élevage, le temps d'éclairement et la température sont contrôlés, impliquant une absence de saisonnalité. En revanche, pour les lapins de compagnie, ce phénomène est plus ou moins marqué, notamment selon le mode de vie proposé (Cheeke *et al.*, 1987).

3.2. Accouplement

Pour l'accouplement, il est conseillé de placer la femelle dans la cage du mâle, et non l'inverse : en effet, dans le cas contraire, elle peut se montrer très agressive sur son domaine et lui causer de graves blessures. Hors de son territoire, le mâle va avoir tendance à passer son temps à marquer tout ce qui l'entoure au lieu de s'occuper de la femelle. Si l'accouplement n'a pas lieu dans les dix premières minutes, il ne sert à rien de les laisser ensemble, cela peut même être néfaste : la femelle risque de devenir agressive. Dans ces deux cas, si le mâle est rejeté continuellement par la femelle, il peut en résulter un traumatisme et un refus à la reproduction pour les fois suivantes (Donnelly, 2004).

Lorsque la femelle est réceptive, une parade sexuelle est entreprise par le mâle pour initier l'accouplement : il va la poursuivre en lui tournant autour, la renifler, notamment en région périnéale, la lécher et faire sa toilette, se blottir et se frotter à elle. Il va également lui présenter son arrière-train et émettre des petits jets d'urine dans sa direction. Enfin, il peut aller, dressé sur ses postérieurs, poser sa queue à plat sur le dos de la femelle. Ces deux dernières manifestations de parade sont, pour la lapine, des stimuli visuels et mais surtout olfactifs, via les glandes périanales avec émission de phéromones sexuelles. Cette initiation

dure en général peu de temps pour les mâles expérimentés mais peut durer davantage chez les autres (Lebas, 2011).

Ensuite, la femelle se campe sur ses postérieurs, en position de lordose et le mâle la chevauche, en bloquant son arrière-train entre ses postérieurs. Après quelques mouvements rapides de va-et-vient du bassin, la première intromission donne directement lieu à l'éjaculation et le mâle se laisse alors tomber en arrière ou sur le côté, en poussant un petit cri caractéristique. Ensuite, si le mâle et la femelle réceptive sont laissés ensemble, un nouvel accouplement peut avoir lieu dans les quelques minutes qui suivent (Patton, 1994).

3.3. Gestation et mise-bas

La gestation chez la lapine dure 31-32 jours (Cheeke, 1987), avec une variation observée selon la race et selon les individus pouvant aller de 29 à 35 jours (Figure 5). En dessous de 29 jours, les lapereaux ne sont en général pas viables. Au dessus de 33 jours, lorsque la portée est petite (<4 lapereaux), ils sont souvent mort-nés (Chavatte, 2005).

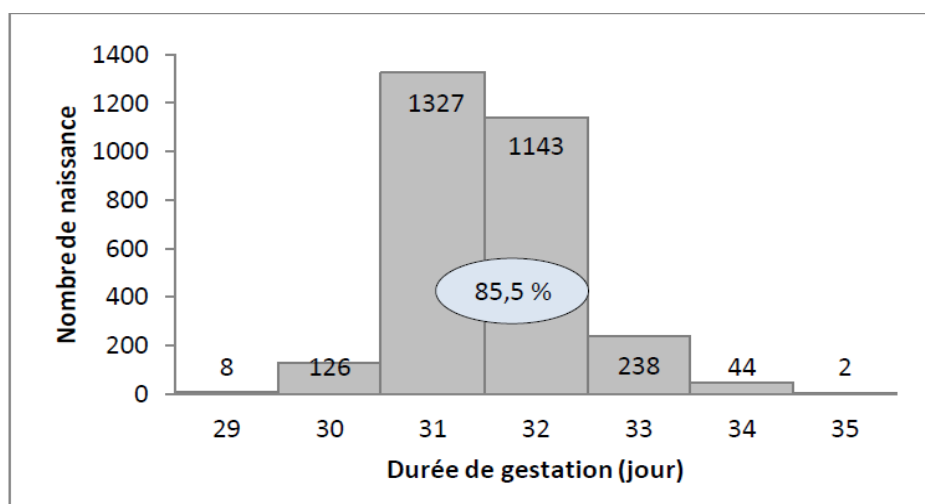


Figure 5 : Durées de gestation observées sur 2888 lapines blanches néo-zélandaises (Patton, 1994).

Durant les 2 premiers tiers de la gestation, il n'y aura pas de changements importants chez la lapine : elle va prendre du poids, mangé éventuellement davantage mais son comportement ne sera pas changé. De plus, elle va le plus souvent continuer à accepter l'accouplement, notamment en fin de gestation où c'est le comportement le plus fréquent (Figure 6). Cela n'a pas de conséquence néfaste et il n'a jamais été observé de superfoetation, c'est-à-dire d'implantation d'une nouvelle gestation dans un utérus qui contient déjà une portée en développement (Donnelly, 2004).

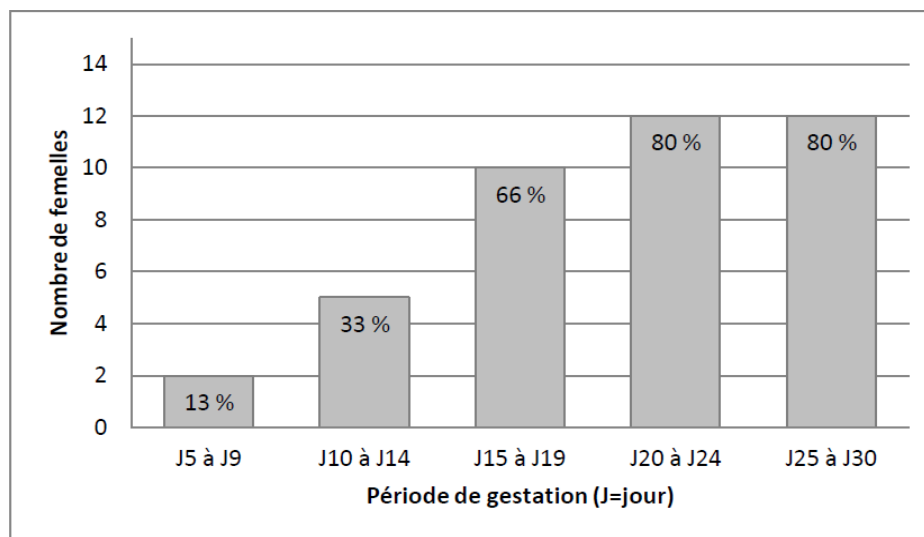


Figure 6 : Part des femelles ayant accepté le mâle selon la période de gestation (Moret, 1980)
 À chaque période de 5 jours correspond un lot de 15 lapines gestantes de type blanc Néo-zélandais ; le mâle est présenté chaque jour, chaque femelle saillie est dénombrée et retirée de l'étude.

Ces critères ne sont donc pas utilisables pour le diagnostic de gestation. Il se fera par différentes méthodes selon le stade de gestation :

- Dès le 10ème jour avec de l'expérience ou à partir de 12-14 jours sinon, on peut diagnostiquer une gestation grâce à la palpation abdominale. Pour cela, d'une main, on maintient éventuellement la lapine par la peau du cou et on place la seconde sous son ventre, entre les postérieurs, légèrement en avant du pelvis de manière à palper les cornes utérines : on sentira alors les fœtus sous la forme de petites boules souples et glissantes au toucher. Cette méthode est déconseillée après 20 à 25 jours de gestation car elle présente de forts risques d'avortement.
- Dès le 11ème jour, on peut réaliser une radiographie: l'utérus apparaît alors élargi et rempli d'un contenu liquidien. Par la suite, le processus de calcification du squelette se met en place. Il débute par les clavicules et la mandibule vers le 15 ou 16ème jour de gestation et les os du crâne sont visibles au cours des 18 à 22ème jours de gestation (Danicldon, 1986).
- Dès le 7ème jour, un opérateur expérimenté peut visualiser les ampoules fœtales par échographie abdominale et même dénombrer la portée dès le 9ème jour si elle est inférieure à 6 fœtus (Chavatte *et al.*, 2005). Ces deux dernières méthodes sont assez peu utilisées en pratique, notamment à cause des artéfacts causés par le gaz intestinal en échographie et du coût de réalisation, autant en élevage que pour les lapins de compagnie. C'est donc la palpation abdominale qui reste la méthode la plus utilisée.

Dans le dernier tiers de gestation, des changements de comportement apparaissent et constituent des indices dans le diagnostic, même si l'on verra qu'ils n'en sont pas spécifiques. Leur survenue est très variable selon les individus : d'une dizaine de jours à quelques heures avant la mise-bas. La lapine devient plus nerveuse, elle s'alimente en général moins, ses glandes mammaires se développent rapidement et elle entreprend de construire son nid : pour cela, elle amasse de grandes quantités de foin et de paille dans sa bouche et s'arrache des poils par grandes touffes au niveau du ventre, du fanon et des flancs. Si elle est en liberté, elle peut également aller récupérer des fibres, des tissus... En outre, l'arrachage des poils au niveau ventral permet de dégager les mamelles et d'en faciliter l'accès aux lapereaux à la naissance.

La mise-bas a généralement lieu tôt le matin : 68 % des naissances arrivent entre 5h et 13h, contre seulement 8 % entre 21h et 5h (Patton, 1994). Si tout se passe normalement, elle se déroule assez rapidement, au maximum en 30 min, et indépendamment de la taille de la portée. Toutes les présentations à l'expulsion sont possibles : par les antérieurs, par les postérieurs ou par le siège. De ce fait, les dystocies sont peu fréquentes et la plupart du temps dues à des lapereaux trop gros. Rarement on peut observer deux temps dans la mise-bas : la deuxième partie de la portée naît à quelques heures voire à un ou deux jours d'intervalle de la première partie. Cela n'est pas considéré comme anormal. Cependant si ce délai est de plus de deux jours, les fœtus sont le plus souvent mort-nés et il faudra les extraire le plus vite possible afin de ne pas compromettre la santé de la lapine et son potentiel reproducteur. Dans le but d'éviter cette situation, lorsque le délai dépasse 1 ou 2 jours ou lorsque la gestation dépasse 33 jours, il est possible d'induire l'expulsion des fœtus grâce à une injection d'ocytocine (1-2 UI/kg, SC ou IM).

La femelle s'occupe rapidement de chaque petit dès la naissance : elle coupe le cordon ombilical, lèche et nettoie les résidus d'enveloppes fœtales qui restent sur leur corps. Puis ils se réfugient dans le nid et commencent à téter. La lapine consomme également les placentas dans les minutes qui suivent la mise-bas. Donc l'observation de placenta dans la boîte à nid plus d'une heure après peut être considéré comme une anomalie.

La taille de la portée dépend de la race, de la parité, de l'âge de la lapine et de la saison. En effet, les races de petit format ont tendance à faire des portées de 4-5 lapereaux alors que les grandes races peuvent avoir en moyenne entre 8 et 12 lapereaux. Pour la parité, ce sont les primipares qui présentent en général les portées les plus petites. Les portées les plus importantes sont observées en 2ème et 3ème gestation puis leur taille diminue aux gestations

suivantes. Enfin, pour la saison, c'est au cours des mois les plus chauds que sont observées les portées les plus petites.

Dans les 48 heures qui suivent, l'utérus de la lapine régresse rapidement et son poids diminue environ de moitié. De plus, elle redevient réceptive et fécondable presque immédiatement après la mise-bas et l'est tout au long de la lactation, avec une certaine variabilité selon son intensité : le taux de gestation après mise-bas chez une lapine ayant eu une grande portée (forte production laitière) sera donc moins important que celui d'une lapine ayant eu une petite portée (production laitière moindre). Une variation de la réceptivité et du taux de gestation est observée en fonction de la courbe de lactation de la lapine, avec une baisse au moment du pic de lactation (environ à 3 semaines) (Cheek, 1987).

3.4. La lactation

Le lapin est une espèce nidicole : les lapereaux naissent nus et aveugles. Ils restent donc dans le nid et sont dépendants de leur mère. Ils pèsent entre 35 g et 80 g, les poids les plus élevés correspondant en général aux portées les plus petites. Au cours des premiers jours, ils passent la majorité de leur temps à dormir. Un fin duvet pousse dès le deuxième jour mais leur fourrure définitive n'apparaît que vers le dixième jour. Ensuite ils ouvrent les yeux au bout de 2 semaines et commencent alors à sortir du nid mais ils y restent jusqu'à la 3^{ème} semaine.

C'est la femelle qui fixe le rythme des tétées : elle vient dans le nid une à deux fois par jour, en général tôt le matin et elle n'y reste pas plus de 5 minutes. Ce comportement est le plus souvent pris pour un défaut de soins maternels par les propriétaires qui s'en inquiètent. Les lapereaux retrouvent les mamelles de leur mère très rapidement grâce aux stimuli olfactifs dégagés par des glandes en région mammaire. Malgré la brièveté de l'allaitement, ils arrivent à boire jusqu'à 20 % de leur poids afin de couvrir leur besoins quotidiens. Pendant les 2-3 premiers jours, la femelle sécrète du colostrum, important tant pour ses qualités nutritionnelles qu'immunologiques, bien que les lapereaux reçoivent déjà un stock d'immunoglobulines au cours de la gestation, via le liquide amniotique. Ensuite, la composition du lait change : il est plus riche que celui de vache avec 12,3 % de protéines, 13,1 % de matière grasse, 1,9 % de lactose et 2,3 % de minéraux. La quantité augmente également fortement pour atteindre son pic à environ 250 g par jour autour de la 3^{ème} semaine de lactation. Elle diminue ensuite plus ou moins vite selon la stimulation des lapereaux (retrait ou non de la portée) et l'état physiologique de la lapine (nouvelle gestation ou non).

Les lapereaux peuvent commencer à consommer des aliments solides vers l'âge de 2 semaines et le sevrage peut être effectué vers 5 semaines (Lebas, 2011).

4. Physiologie de la reproduction : Mécanismes cellulaires et hormonaux

4.1. Cycle œstral

L'ovogenèse est achevée en même temps que la croissance des follicules primordiaux vers 2 semaines de vie. Ces follicules sont alors constitués d'une seule couche de cellules au niveau de la granulosa. À la puberté, sous l'action de la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) sécrétée par l'adénohypophyse, une vague de 5 à 10 follicules primordiaux entre en croissance sur chaque ovaire, afin de devenir des follicules secondaires ou antraux, dont le diamètre atteint alors 0,8 mm. Au cours de cette transformation, la couche extérieure de la thèque développe alors un important réseau vasculaire, dont les capillaires vont progressivement proliférer et s'hyper-perméabiliser, et les cellules de la granulosa se multiplient largement, en passant d'une seule couche à plusieurs couches cellulaires (Boiti *et al.*, 2006).

Les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque interne produisent toutes deux des oestrogènes via l'aromatisation des molécules de testostérone (Figures 7 et 8) ; en effet, la testostérone est synthétisée dans la thèque interne à partir de progestérone et est utilisée « sur place » ou importée ensuite dans la granulosa, ses cellules ne possédant pas les enzymes nécessaires à cette aromatisation.

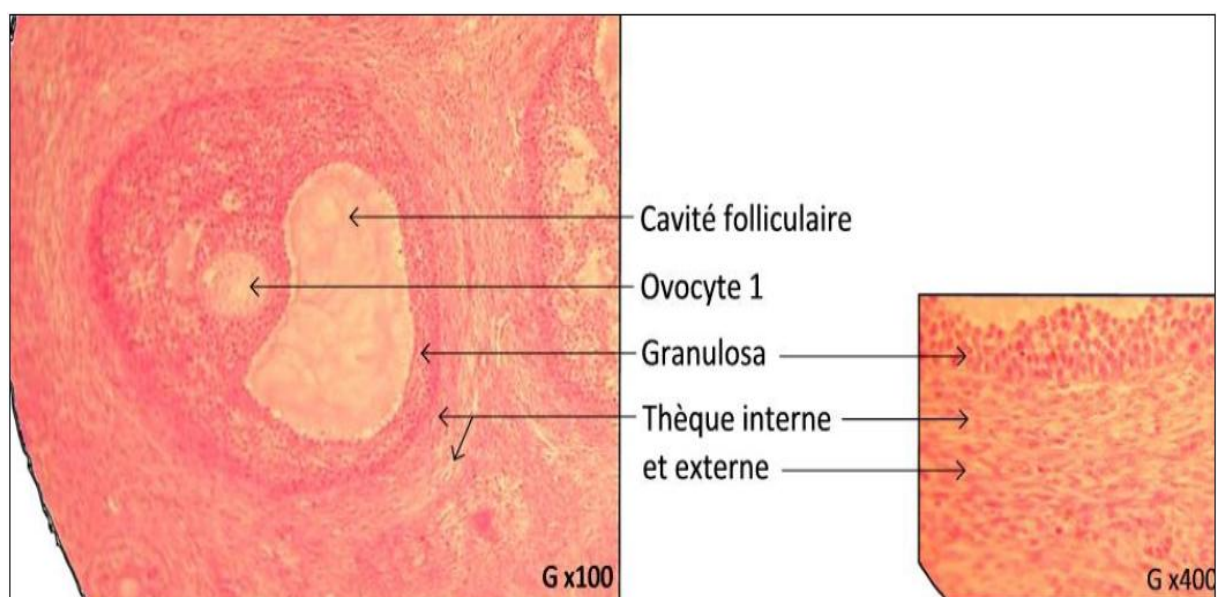


Figure 7: Follicule tertiaire ou à antrum de lapine, au microscope optique (Manumanu, 2012)

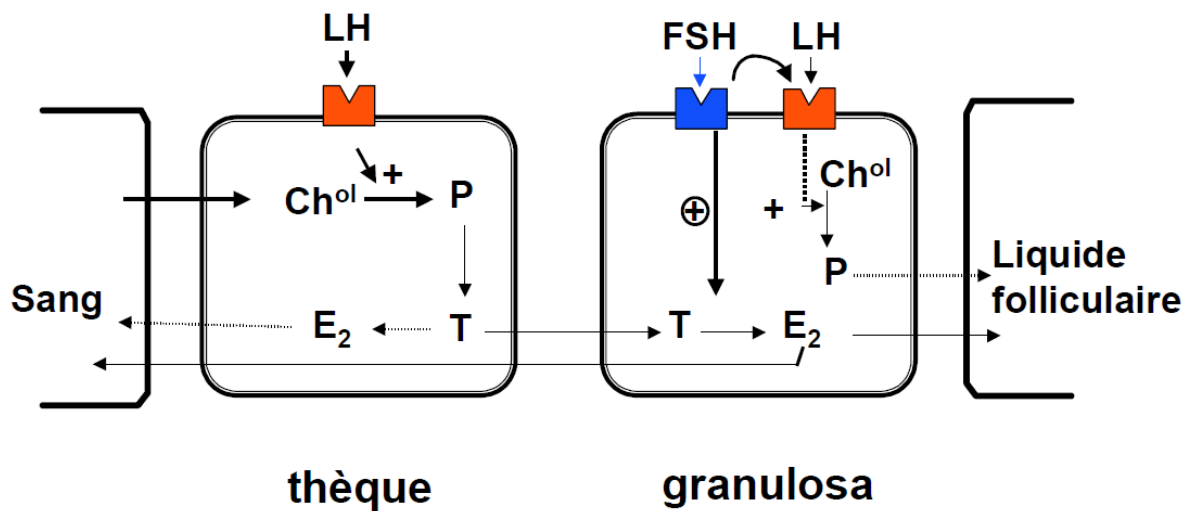


Figure 8: Action des hormones gonadotropes sur les deux types cellulaires stéroïdiques de l'ovaire : les cellules de la thèque interne et les cellules de la Granulosa (Gayrard, 2011)

Chol = cholestérol, P = Progésérone, T = Testostérone et E2 = OEstradiol (oestrogène principal).

L'augmentation du nombre de cellules dans la granulosa au cours de la croissance des follicules de la vague sélectionnée entraîne de ce fait une augmentation importante de la sécrétion d'œstrogènes et donc de sa concentration sanguine. Ainsi quand le nombre de follicules matures est suffisant, le taux circulant d'œstrogène atteint un seuil-signal intégré par le système nerveux central qui agit sur le comportement sexuel de la lapine : c'est alors qu'elle devient « réceptive » à l'accouplement. Les variabilités de cycle de réceptivité observées sont donc expliquées par ce phénomène, en effet, le taux « suffisant » d'œstrogène sanguin pour stimuler le système nerveux central peut être très différent d'un individu à l'autre (Moret, 1980).

Une fois ce seuil atteint, la production d'œstrogène se poursuit jusqu'à la dégénérescence de la vague de follicules secondaires, n'ayant pas pu évoluer en follicules de De Graaf en l'absence d'accouplement. Cette période dure en théorie 7 à 14 jours mais des variations sont également observées, notamment en fonction des conditions environnementales telles que la température, l'éclairage, l'alimentation, la stimulation sexuelle mais aussi en fonction de facteurs individuels.

À la dégénération de la vague folliculaire, le taux d'œstrogènes diminue en dessous du seuil, la lapine n'est alors plus réceptive. Mais en parallèle, une nouvelle vague de follicule est sélectionnée et se développe. Elle va à son tour, produire des œstrogènes et débiter un

nouveau cycle. La phase de « dioestrus » définie précédemment correspond donc à la phase de dégénération des follicules de la vague (n) suivie de la phase de développement de la vague (n+1). Elle dure en théorie 1 à 4 jours mais peut également être très variable.

Au final, le cycle en absence d'accouplement ou de stimulation similaire, dure donc en théorie entre 8 et 18 jours : 7 à 14 jours de réceptivité suivis de 1 à 4 jours de non réceptivité à l'accouplement (Gayrard, 2011).

4.2. Ovulation

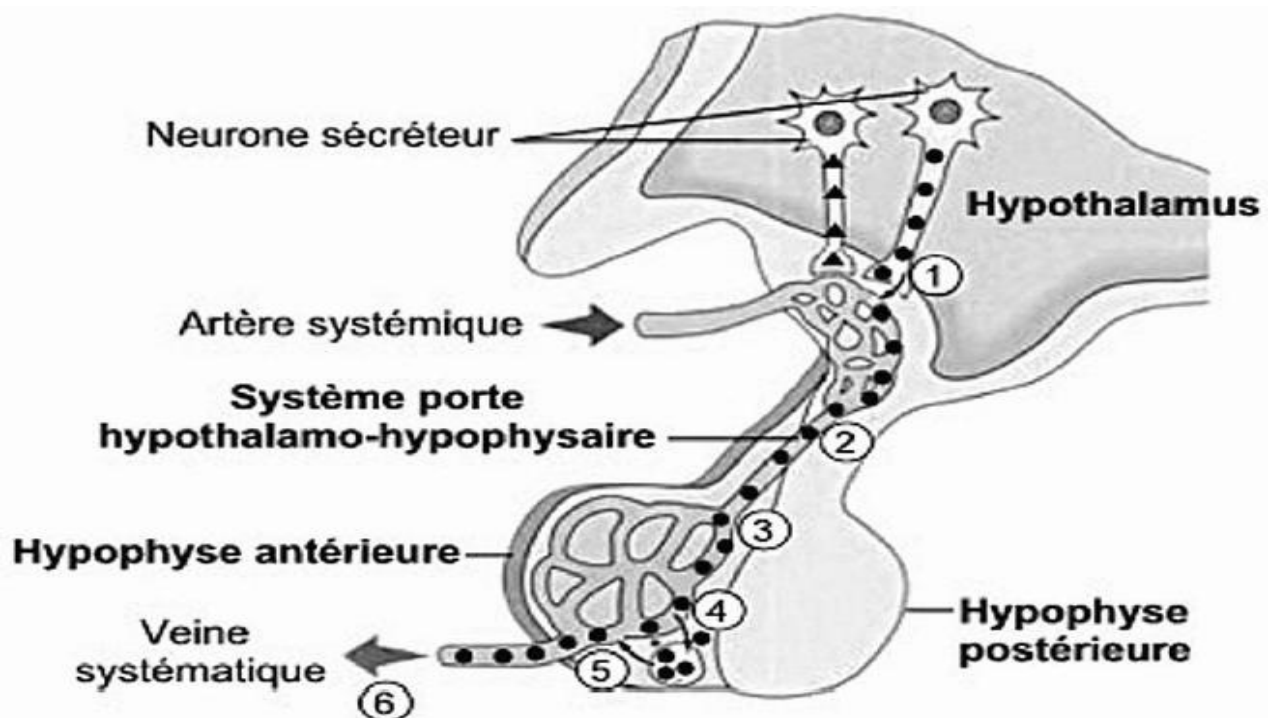
Chez les espèces à ovulation spontanée, l'augmentation croissante des oestrogènes, passée une concentration-seuil, exerce un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus, induisant ainsi l'ovulation via l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Au contraire, chez la lapine qui est une espèce à ovulation provoquée, ce rétrocontrôle n'existe pas. La production d'oestrogène n'agit que sur le comportement sexuel de la lapine et l'ovulation ne survient donc qu'en présence de stimuli extérieurs, principalement l'accouplement dans les conditions naturelles. L'ovulation peut également être déclenchée par stimulation mécanique, chevauchement entre femelles ou avec un mâle stérilisé (Salvetti, 2008).

4.2.1. Activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

L'accouplement active de nombreuses zones sensorielles, dont les messages nerveux convergent le long de la colonne vertébrale en passant par le cervelet, pour finir au niveau du centre d'intégration de l'hypothalamus. Cette connexion nerveuse entre le coït et la stimulation de l'hypothalamus semble faire intervenir principalement deux neurotransmetteurs : la noradrénaline (NorAd) et l'acétylcholine (ACh), puisque l'administration de leurs antagonistes atténue voire bloque le processus ovulatoire. Ainsi il a été observé une libération de NorAd au niveau de l'hypothalamus médio-ventral en réponse au coït et juste avant l'ovulation. De plus, l'expression de gènes à NorAd est rapportée dans les cellules nerveuses du tronc cérébral : le tronc cérébral peut donc être considéré comme un site extra-hypothalamique où les stimuli de l'accouplement sont intégrés et convertis en signaux pré-ovulatoires à destination de l'hypothalamus. Cependant, d'autres neurotransmetteurs entrent très probablement en jeu tels que l'interleukine 1, les endorphines... mais n'ont pas encore été étudiés chez le lapin.

L'arrivée de ces signaux pré-ovulatoires sur l'hypothalamus déclenche à leur tour une décharge d'hormones gonadolibérines : la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), avec un pic de concentration 1 à 2h post-coït. Cette hormone est libérée principalement dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Figure 9) et très peu dans le système sanguin général afin d'éviter la dilution de l'hormone. Ainsi elle est prise en charge dans le système veineux hypothalamique, qui communique avec le réseau capillaire de l'adénohypophyse : la GnRH est donc directement amenée à agir au niveau de l'éminence médiane de l'hypophyse (Furelaud et al., 2012).



- ① Les hormones hypophysiotropes (libérines et inhibines) produites par des neurones de l'hypothalamus passent dans les capillaires de l'hypothalamus.
 - ② Ces capillaires confluent pour former le vaisseau porte hypothalamo-hypophysaire qui suit la tige pituitaire jusqu'à l'hypophyse antérieure.
 - ③ Il donne naissance aux capillaires de l'hypophyse antérieure.
 - ④ Les hormones hypophysiotropes passent dans le sang des capillaires de l'hypophyse antérieure et tiennent sous leur dépendance la libération des hormones de celle-ci.
 - ⑤ En cas de stimulation par la libérine hypothalamique, l'hormone de l'hypophyse antérieure correspondante est sécrétée dans les capillaires de celle-ci.
 - ⑥ Les capillaires de l'hypophyse antérieure confluent pour donner naissance à une veine par laquelle les hormones de l'hypophyse antérieure gagnent la circulation systémique qui les distribue dans tout l'organisme.
- ▲ Hormones hypothalamiques hypophysiotropes
- Hormones antéhypophysaires

Figure 9 : Système porte hypothalamo-hypophysaire (Furelaud *et al.*, 2012)

À l'arrivée de ce signal chimique, l'adénohypophyse répond par la libération massive de LH (*Luteinizing Hormone*) : la concentration sanguine de cette gonadotropine est multipliée par 100 seulement 60 à 90 min après le coït.

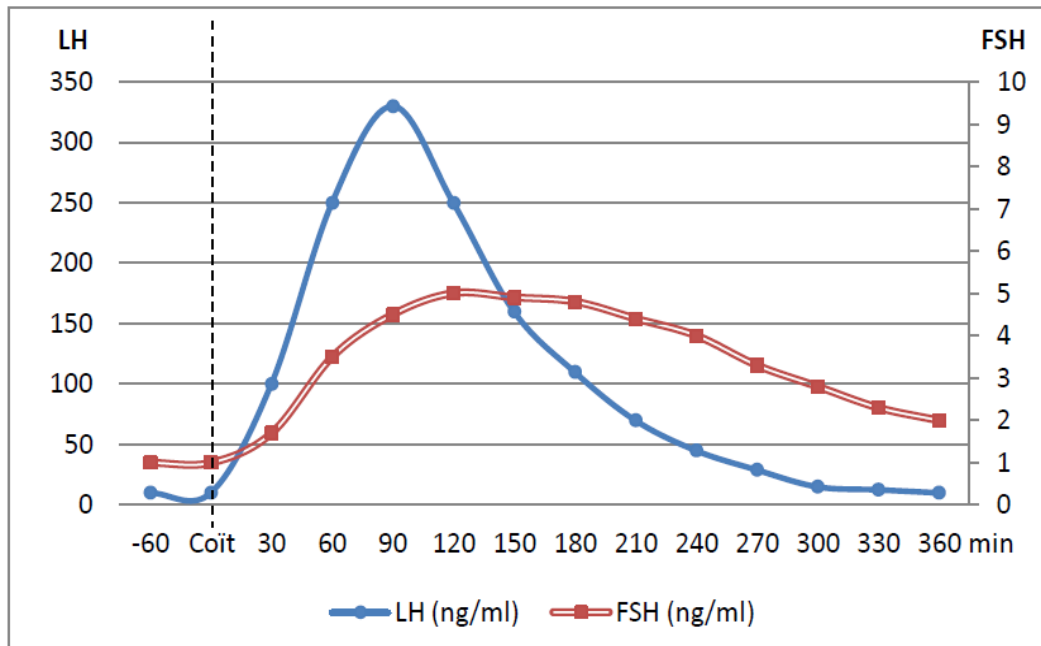


Figure 10 : Taux plasmatique post-coït en LH et FSH (Lebas, 2011)

La stimulation de l'adénohypophyse engendre également une augmentation de l'autre gonadotropine, la FSH. Cependant son augmentation est plus modeste, son maximum est observé environ 120 min après l'accouplement et son rôle est de déclencher la reprise de la méiose jusqu'au stade métaphase II. Par la suite, autour de 24h post-accouplement, une nouvelle décharge de FSH est observée chez la lapine : c'est une particularité de cette espèce. Elle est probablement responsable du recrutement et du développement d'une nouvelle vague de follicules primordiaux en follicules antraux, afin de fournir au corps jaune grossissant issu de l'ovulation, un support trophique nécessaire en oestrogènes. Il a été montré que ce phénomène hormonal est indépendant du déroulement de l'ovulation mais les conditions le déclenchant sont encore inconnues.

L'accouplement induit également une augmentation du taux d'ocytocine en parallèle d'une diminution du taux de prolactine, dans les minutes qui suivent (Figure 11). Cette décharge hormonale semble avoir comme rôle de permettre aux spermatozoïdes de franchir les cols utérins et de progresser dans l'utérus (Lebas, 2011).

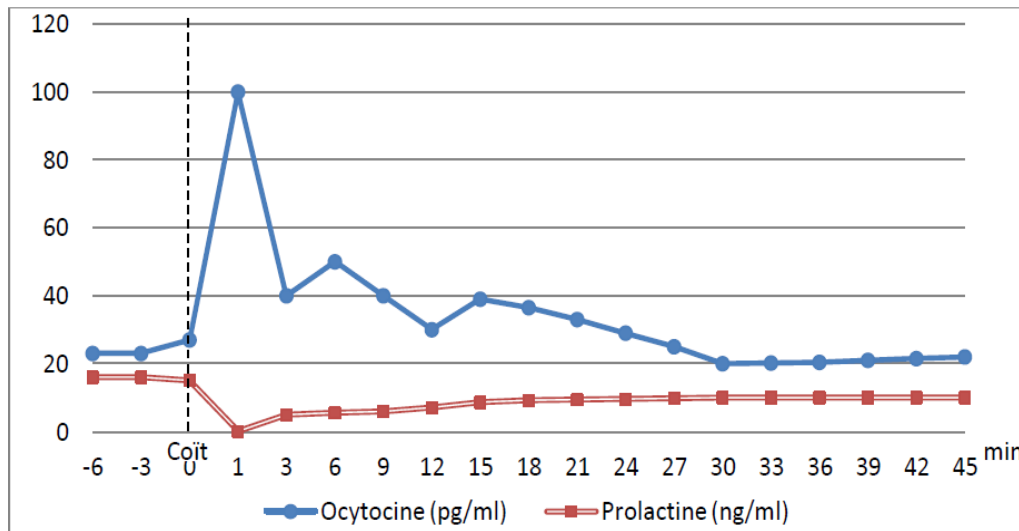


Figure 11 : Taux plasmatique post-coït en oxytocine et prolactine (Lebas, 2011)

L'ovulation survient en général 9-10 heures après le pic de LH, soit 10-11 heures après l'accouplement. Pendant cet intervalle, sous l'action de LH, des changements ont lieu sur les follicules de la vague sélectionnée et sur les ovocytes qu'ils contiennent : le volume folliculaire augmente, le flux sanguin arrivant s'accroît, les cellules du cumulus produisent un dépôt de matrice extracellulaire ce qui engendre une augmentation de volume de cette structure mais surtout l'acquisition de sa viscosité nécessaire à l'ovulation future... Le tout aboutissant à leur maturation en follicules pré-ovulatoires ou de De Graaf. Seuls les follicules matures ayant produit un nombre suffisant de récepteurs à LH à leur surface, sous l'action combinée des hormones FSH et oestrogènes, peuvent capter le signal chimique de LH et donc ovuler. Alors la fixation de LH sur son récepteur induit la synthèse de prostaglandines via l'AMP cyclique ainsi que la cascade en aval d'événements menant à la lutéinisation des cellules folliculaires. Les événements cellulaires de l'ovulation sont parfois assimilés à une réaction inflammatoire sur les follicules ovariens, causant la rupture de l'épithélium ovarien de surface laissant échapper l'ovocyte.

4.2.2. Lutéinisation (formation du corps jaune)

Les corps jaunes, d'environ 2 mm de diamètre, sont formés à partir des follicules ovulés par l'intermédiaire de mécanismes impliquant l'angiogenèse et le remodelage tissulaire des follicules, sous l'influence locale de nombreux facteurs venant de l'endothélium modifié (facteur de croissance endothélial vasculaire ou VEGF, facteur de croissance transformant ou

TGF- α , facteur de croissance des fibroblastes...) et de nombreuses hormones lutéotrophiques (LH, oestradiol 17 α). Les corps jaunes deviennent ainsi des glandes endocrines transitoires sécrétant la progestérone nécessaire au maintien des embryons tout au long de la gestation. Leur évolution et leur durée de vie dépendent d'une balance entre facteurs lutéotrophiques et lutéolytiques (Furelaud *et al.*, 2012).

4.2.3. Parcours de l'ovocyte / Fécondation

À la rupture des follicules, le pavillon de l'oviducte entoure l'ovaire afin de favoriser la récupération des ovocytes libérés. La viscosité du cumulus entourant les ovocytes associée à une activité sécrétoire maximale de l'épithélium de l'oviducte autour de l'ovulation permet la progression du complexe cumulus-ovocyte vers le lieu de la fécondation, c'est-à-dire vers la partie distale de l'ampoule, près de l'isthme.

En parallèle, les spermatozoïdes sont déposés dans la partie supérieure du vagin, près de l'entrée des cols utérins. Ils doivent remonter ensuite le long de l'utérus en passant les obstacles du col utérin et de la jonction utéro-tubulaire au cours desquels seulement 1% des spermatozoïdes de départ survivent et ils subissent alors la phase de maturation appelée capacitation, qui les rend aptes à féconder les ovocytes. Ensuite seulement une vingtaine par ovocyte atteint rapidement l'ampoule, en général 1 heure 30 à 2 heures après l'émission des ovocytes. La pénétration d'un spermatozoïde entraînant le durcissement de la zone pellucide, aucune pénétration polyspermiq ue n'est possible (Salvetti, 2008).

4.3. Gestation

Tous les embryons sont présents dans l'isthme de l'oviducte 24 heures après l'accouplement. Ils vont ensuite évoluer grâce à des multiplications mitotiques successives mais également migrer le long de l'oviducte pour atteindre leur site d'implantation, dans la corne utérine, 72 heures après la fécondation.

La survie de l'embryon dépend des deux couches extracellulaires qui l'entourent :

- **La zone pellucide**, qui est la couche la plus interne. Elle est mise en place pendant la folliculogénèse dans les ovaires, mesure entre 11 et 30 μm d'épaisseur et est essentielle à la nutrition des ovocytes lors de la croissance folliculaire et à la reconnaissance des gamètes lors de la fécondation.
- **La couche muqueuse**, qui est la couche la plus externe. Elle est mise en place lors de la migration de l'embryon dans l'oviducte, elle passe alors de 10 μm à 24 heures post-coït dans

l'isthme à 100 µm à 72h post-coït, décuplant ainsi son épaisseur en à peine 48 heures et son rôle est ensuite primordial lors de l'implantation de l'embryon sur la paroi utérine.

Parallèlement à la migration, la paroi utérine commence à se différencier afin d'accueillir les embryons mais la dentelle utérine nécessaire à leur implantation n'apparaît que 5 à 8 jours après l'accouplement, sous l'action de la progestérone sécrétée par les corps jaunes en croissance. Il existe donc une étroite synchronisation entre ce phénomène et l'implantation des embryons d'un diamètre de 5 mm au stade blastocyte, survenant en général 5 à 6 jours après l'accouplement.

Ensuite, la croissance majeure de l'utérus et des foetus commence vers le 15ème jour de gestation, permettant alors un diagnostic de gestation par palpation abdominale. Dans le même temps, des modifications de profils hormonaux ont lieu. Le taux de progestérone ne cesse d'augmenter (multiplication par 4) entre le 3ème et 12ème jour suivant l'accouplement puis reste relativement stationnaire pour enfin diminuer rapidement dans les jours précédant la mise bas. Cette sécrétion est principalement réalisée par les corps jaunes ovariens qui perdurent tout au long de la gestation, afin d'assurer son maintien. En effet, même si une petite partie est produite par le placenta à partir de la mi-gestation, les lapines sont considérées comme des animaux «corps jaune dépendants» : une ovariectomie ôtant les corps jaunes aura systématiquement pour effet l'avortement de la lapine, quelque soit le stade de gestation, contrairement à d'autres espèces où le relai pour la sécrétion de progestérone est pris charge en quantité suffisante par le placenta, passé un certain stade de gestation.

Le taux d'œstrogènes subit des modifications de moindre ampleur. En effet, une part (17-βoestradiol et oestrone) continue d'être produit dans les ovaires par la nouvelle vague folliculaire alors qu'une seconde (oestriol) est alors sécrétée par le placenta.

En fin de gestation, c'est l'interaction entre progestérones et œstrogènes qui permet de pondérer l'action de la prolactine sécrétée par l'hypophyse et ainsi de stimuler indirectement le développement de la glande mammaire ainsi que le comportement de construction du nid (Lebas, 2011).

4.4. Parturition et Post-partum

Le mécanisme de parturition est encore mal défini. Le temps de gestation chez la lapine correspond à la durée de vie des corps jaunes. Donc le déclenchement de la parturition coïncide avec le phénomène de lutéolyse. Ce phénomène est un processus impliquant des changements fonctionnels et structuraux au niveau des ovaires, aboutissant à la régression et à

la disparition des corps jaunes par apoptose. Mais les mécanismes, la chronologie de son induction et les jeux subtils entre facteurs de croissance, cytokines hormones lutéotrophiques et lutéolytiques chez la lapine sont encore peu connus. Cependant il a été montré que la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) était un facteur lutéolytique majeur d'origine utérine. Elle est, avec la prostaglandine E_2 (PGE_2), la principale prostaglandine de la reproduction, toutes deux, synthétisées, essentiellement par la paroi utérine mais aussi par les corps jaunes et les blastocystes. En effet, une hystérectomie privant d'apport en $PGF_{2\alpha}$, de même qu'une endométrite, a pour effet chez la lapine, de rallonger la phase lutéale. Les mécanismes d'action de ces hormones sur la lutéolyse ne sont pas encore bien définis mais il a été observé que la réceptivité du corps jaune varie selon son stade d'évolution : il est d'abord réfractaire en phase précoce et le devient peu à peu au cours de la gestation.

De plus, il semble que le niveau de sécrétion des corticostéroïdes par les surrénales des fœtus joue un rôle dans le signal de la parturition, comme c'est le cas dans d'autres espèces.

Au moment de la mise-bas, la dilatation du vagin, du cervix et de l'utérus de la lapine stimule la production d'ocytocine par la neurohypophyse : cela correspond au réflexe de Ferguson.

Cette décharge joue alors un rôle dans la contraction utérine et l'induction de l'éjection de lait, dont la production a commencé avant la parturition sous l'effet de la prolactine. La sécrétion d'ocytocine permettant la production lactée se poursuit ensuite durant toute la lactation. En effet, à chaque tétée, les stimuli mécaniques des lapereaux sur les mamelles tendent à induire une sécrétion immédiate de l'hormone. La pression intramammaire augmente alors, permet l'éjection du lait et les lapereaux vident presque en totalité les mamelles. Puis le taux d'ocytocine diminue, il ne reste élevé ($> 20-25$ pg/mL de plasma) que 3 à 5 min, c'est-à-dire à peu près le temps de la tétée. Enfin, une décharge de prolactine (70-75 ng/mL de plasma) est observée 1 à 5 min après la fin de la tétée pendant environ 2 à 3 heures, induisant la synthèse de lait et son accumulation dans les glandes mammaires, à vitesse constante, pendant les 23 à 24 heures qui suivent, jusqu'à la prochaine tétée. La durée de lactation va ensuite dépendre de différents paramètres :

- Du stade physiologique de la mère :

En effet, les lapines ont la particularité d'être réceptives à la fois pendant la gestation comme vu précédemment, mais également dès les premiers jours post-partum, la sélection de vagues folliculaires se poursuivant durant la gestation. Ainsi les lapines sont toutes réceptives dans

les premiers jours de lactation, puis cette aptitude diminue, avec un niveau au plus bas au pic de lactation et réaugmente vers le 10ème jour de lactation. C'est d'ailleurs à ce moment-là qu'elles sont généralement inséminées, dans les élevages cunicoles.

- De la stimulation apportée par les lapereaux :

La synthèse de lait va par exemple rapidement s'arrêter si les lapereaux ne têtent plus.

- De variations hormonales :

En effet, l'ampleur de la décharge quotidienne de prolactine va naturellement diminuer à partir du 25ème jour de lactation, ce qui va favoriser la fin de la lactation.

La lapine a la particularité d'être une espèce à ovulation provoquée. Elle ne présente pas de cycle œstral clairement défini et de grandes variations sont observées selon les individus et leur mode de vie. Tous ces phénomènes sont connus pour être sous forte dépendance hormonale, même si actuellement il reste encore des zones d'ombre à élucider chez les lapines. Ainsi l'ovulation et la phase lutéale qui en découle ne sont en général déclenchées que lors de l'accouplement. Cependant d'autres phénomènes semblent pouvoir être source de stimulation de ce mécanisme et engendrer la formation de corps jaunes sans gestation : la lapine est dite alors en « pseudo-gestation » (Lebas, 2011).

CHAPITRE II

L'Éthylène Glycol Monométhyl Ether (EGME)

II.L'Ethylène Glycol Monométhyl Ether (EGME)

1. Les données générales sur les éthers de glycol

Un solvant est défini comme étant un produit ou un mélange de produits ayant la capacité de diluer un autre produit. Il est liquide à température ambiante et non soluble dans l'eau généralement sauf pour des exceptions telles que les éthers de glycols (EG). Ils se caractérisent par leur volatilité et leur inflammabilité.

Les solvants organiques sont très utilisés dans de nombreux secteurs industriels comme les industries du bois ouvré, graphique, manufacturière et chimique. Ils sont utilisés dans diverses peintures, colles et laques, et comme produits nettoyants et anticorrosifs. Les solvants les plus communs sont les alcools, les éthers, les cétones, les hydrocarbures halogénés et les EG (Catalina, 2002 ; Gérin, 2002).

Les EG constituent une famille de produits dont l'usage comme solvants s'est largement développé ces trente dernières années. En effet, ces composés ont comme principale propriété d'être 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.

Leurs synthèses s'effectuant principalement par l'action d'un alcool sur l'oxyde d'éthylène ou de propylène, les EG se divisent en deux principaux groupes : les dérivés de l'éthylène glycol (série E) et les dérivés du propylène glycol (série P).

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

2. L'Ethylène Glycol Monométhyl Ether (EGME)

2.1. Définition

L'EGME fait partie des dérivés de l'éthylène glycol (série E) : $R-O-CH_2-CH_2-OH$: possède une fonction alcool primaire qui se métabolise dans l'organisme par voie de l'alcool déshydrogénase puis de l'aldéhyde déshydrogénase en acides alkoxyacétiques (Etiemble, 2003). Ces acides alkoxyacétiques sont responsables d'effets toxiques sur la reproduction,

notamment l'acide méthoxyacétique (MAA), métabolite de l'EGME (Lemazurier *et al.*, 2003; INRS, 2005).

2.2. Identité et propriétés physico-chimiques

L'EGME a pour formule moléculaire empirique C₃H₈O₂; sa formule développée est CH₃OCH₂CH₂OH et son poids moléculaire s'élève à 76,1 g/mole. Il porte le numéro 109-86-4 au registre du *Chemical Abstracts Service* (CAS) et est un liquide visqueux et incolore, d'une solubilité de 500 000 mg/L dans l'eau (DMER et AEL, 1996). Son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau (log K_{ow}) est de -0,77 (Hansch et Leo, 1985), il a une tension de vapeur de 1 300 Pa à 25 °C (Riddick *et al.*, 1986) et une constante de la loi de Henry égale à 0,198 Pa·m³/mole (valeur théorique) (DMER et AEL, 1996). Son facteur de conversion de dans l'air correspond à 1 ppm = 3,11 mg/m³.

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

Tableau 1 : Identification de l'EGME (INRS, 2014)

FORMULE	NOM	NUMÉRO CAS	NUMÉRO CE	NUMÉRO INDEX	SYNONYMES
C ₃ H ₈ O ₂	2-Méthoxyéthanol	109-86-4	203-713-7	603-011-00-4	Méthylglycol, EGME, Ether monométhylque de l'éthylène-glycol

Formule chimique



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

Tableau 2 : Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME (INRS, 2014).

NOM SUBSTANCE	DÉTAILS	
2-Méthoxyéthanol	Formule	$C_3H_8O_2$
	N° CAS	109-86-4
	Etat Physique	Liquide
	Masse molaire	76,09
	Point de fusion	-85°C
	Point d'ébullition	123-126°C
	Densité	0,963-0,966
	Densité gaz / vapeur	2,6
	Pression de vapeur	0,82 kPa à 20°C / 1,29 kPa à 25°C / 8,55 kPa à 60°C
	Point d'éclair	37-39°C (coupelle fermée)
	Température d'auto-inflammation	285 à 325°C (selon les sources)
	Limites d'explosivité ou d'inflammabilité (en volume % dans l'air)	Limite inférieure : 1,8 à 2,4% (selon les sources) Limite supérieure : 14 à 24,5% (selon les sources)



2-MÉTHOXYÉTHANOL

Danger

H226 - Liquide et vapeurs inflammables
H360Fd - Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus
H332 - Nocif par inhalation
H312 - Nocif par contact cutané
H302 - Nocif en cas d'ingestion

Nota : Les conseils de prudence P sont sélectionnés selon les critères de l'annexe 1 du règlement CE n° 1272/2008.
203-713-7

Selon l'annexe VI du CLP.

ATTENTION : pour les mentions de danger H332, H312, H302, se reporter à la section "Réglementation".

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

2.3.1. Production, importation, Utilisations

L'utilisation des éthers de glycol de série éthylénique remonte aux années trente. L'EGME était utilisé comme solvant sous le nom de méthylcellosolve® (*Union Carbide*). Ce nom commercial de cellosolve provient d'un des premiers usages des éthers de glycol éthyléniques comme solvant des nitrocelluloses. Mais c'est dans les années soixante, et surtout soixante-dix, avec le développement des peintures polyuréthanes et époxydiques d'une part et des peintures à l'eau (acryliques, vinyliques) d'autre part, que leur emploi va s'amplifier (Donley, 1936 ; Cicolella, 1992 ; ECE-TOC, 1995 ; Venier, 2004).

2.3.1.1. Les principales utilisations des l'EGME

Fabrication des peintures, laques et vernis, des encres d'imprimerie ; industrie des matières plastiques, de la nitrocellulose, des dérivés cellulosiques, de certains colorants...)

- Fluides hydrauliques
- Industrie électronique
- Industrie photographique
- Antigel pour carburants d'aviation.
- Produits de dégraissage et de nettoyage.

Tableau 3: Revue des produits contenant des éthers de glycol, présents sur le marché en 2002 (CSHPF, 2002).

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

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

Tableau 04: 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,
Phytoprotecteurs	EGBE, DEGDME, DEGBE, DPGME, EGME
Carburant aéronautique	EGME, DEGME
Produits photographiques	DEGBEA

2.3.2. Sources et rejets

- **Sources naturelles**

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

- **Sources anthropiques**

Les rejets de l'EGME dans l'environnement immédiat signalés dans le cadre de l'Inventaire national des rejets de polluants totalisaient 17,0 tonnes en 1994 (INRP, 1996). Une usine du sud de l'Ontario est à l'origine de ces émissions, toutes atmosphériques de nature. La même année, les transferts de l'EGME en vue de leur élimination hors des lieux,

dans un incinérateur, se chiffraient à 2,12 tonnes. Enfin, 0,07 tonne de l'EGME a servi à la récupération de l'énergie en 1994 (INRP, 1996). En 1995, les rejets de l'EGME dans l'environnement immédiat rapportés par des entreprises à l'Inventaire national des rejets de polluants s'établissaient à 6,3 tonnes (INRP, 1998). La totalité du polluant a été libérée dans l'atmosphère par les cheminées d'une usine du sud de l'Ontario.

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

2.3.3. Devenir dans l'environnement

2.3.3.1 Air

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

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

2.3.3.2.Eaux de surface

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

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

2.3.3.3.Eaux souterraines

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

2.3.3.4.Sols

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

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

2.3.4. Distribution dans l'environnement

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

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

2.4. Toxicocénitique de l'EGME

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

2.4.1. Absorption

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

2.4.1.1. Absorption chez l'animal

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

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

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

L'EGME s'absorbe facilement après exposition par voie orale, par inhalation ou par pénétration cutanée (Stellman, 2004; Sleet *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989).

2.4.1.2. Absorption chez l'homme

Des travaux sur différents montrent un passage cutané humain de 35 à 2 800, mg/h/cm, ces absorptions variant en fonction inverse du poids moléculaire des composés: EGME > 2PG1ME > EGEE > EGEEA > EGnPE > EGBE > DEGME > DEGEE > DEGBE (Dugard *et al.*, 1984; Barber *et al.*, 1992; Kezic *et al.*, 1997).

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

2.4.2. Distribution

L'EGME gagne toutes les parties de l'organisme ou presque, y compris le fœtus en développement où la concentration de métabolites peut être plus élevée que chez la mère (Testud, 1998).

Après quelques heures, de fortes concentrations se retrouvent dans le foie, les reins et les graisses. Les concentrations tissulaires sont alors supérieures aux concentrations circulantes.

De fortes concentrations ont également été mesurées dans la moelle osseuse, la vessie, la rate et le thymus de souris ayant reçu de l'EGME par voie intraveineuse, 24 à 48 h après l'administration d'EGME, une forte rémanence de composés est observée dans la carcasse (5 à 10 %) et dans le foie (Bartnick *et al.*, 1987).

2.4.2.1. Passage placentaire et distribution chez le fœtus

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

2.4.3. Métabolisme

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

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

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

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

Tableau 5: Métabolites acides formés ou supposés être formés selon la molécule d'EG (Gijssbers *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, DEGEBE, TEGBE
Acide isopropoxyacétique (iPAA)	EGiPE
Acide propoxyacétique (PAA)	EGnPE
Acide phénoxyacétique (PhAA)	EGPhE
Acide méthoxypropionique (MPA)	1PG2ME
Acide éthoxypropionique (EPA)	1PG2EE

2.4.4. Elimination

Le temps de demi-vie plasmatique des molécules mères est court, de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes. Cela contraste avec le plus long séjour des métabolites acides dans l'organisme et de leur élimination urinaire, de quelques heures à plus de 48 heures pour certains d'entre eux (71 h pour le MAA). Pour les éthers monosubstitués, la vitesse d'élimination des métabolites urinaires va dépendre de la longueur de la chaîne alkyl : les métabolites acides des éthers de glycol à chaînes longues (butyles) sont plus rapidement éliminés (demi-vie de 6 h) que les dérivés éthylés ou méthylés (demi-vies de 40 et 80 h respectivement). L'alcool et l'aldéhyde déshydrogénases sont des systèmes enzymatiques saturables, expliquant que la quantité de composé administré va également intervenir dans la vitesse d'élimination et le mode de transformation métabolique. L'administration simultanée d'autres composés (alcool éthylique) substrats de ces enzymes va diminuer la vitesse de transformation métabolique des éthers de glycol (Humbert *et al.*, 2003).

En général, l'MAA (libre ou conjugué) est le principal métabolite décelé dans l'urine du rat, de la souris et de l'être humain exposés au produit par ingestion ou inhalation; les autres métabolites dans l'urine comprennent l'éthylène glycol (surtout chez le rat exposé de façon

répétitive au composé par l'eau potable) (Medinsky et al., 1990) et les produits métaboliques du cycle de Krebs.

L'être humain élimine le MAA beaucoup plus lentement que le rat, avec des demi-vies dans le sang de 77 et de 19 heures respectivement (Groeseneken *et al.*, 1989).

2.5. Écotoxicologie

2.5.1. Organismes terrestres

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

2.5.2. Organismes aquatiques

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

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

2.6. Toxicité des éthers de glycol

Selon l'INRS, 2010 l'EGME est classé en **catégorie 2** : substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine (**phrase de risque R60 : peut altérer la fertilité**) et substances devant être assimilées à des substances causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (**phrase de risque R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant**) (INRS, 2010).

2.6.1. Toxicité chez l'animal

2.6.1.1. Toxicité aiguë :

Selon les cas d'intoxications aiguës par ingestion d'EG suivis chez l'homme, des études de toxicité aiguë ont été réalisées chez l'animale. L'objectif est alors d'évaluer cette toxicité:

quantitativement, par la détermination des doses toxiques et doses létales, pour mieux cerner les effets cliniques, biologiques et histologiques de ces produits (Simonet, 2005).

L'EGME se caractérise par une toxicité aiguë faible à moyenne chez les animaux de laboratoire exposés par voie orale, par inhalation ou par pénétration cutanée. La DL50 orale se situe habituellement autour de 1 000 mg/kg-mc ou plus (Smyth *et al.*, 1941; Carpenter *et al.*, 1956; ECETOC, 1995).

Des valeurs de DL50 de 2,1 et 3,4 g/kg de poids corporel ont été rapportées après administration orale et intrapéritonéale d'EGME chez le rat et la souris respectivement. Ces valeurs sont de 0,95 chez le porc et 0,9-1,5 g/kg chez le lapin (Johanson, 2000).

Du fait de leur caractère amphiphile, l'EGME traverse facilement les membranes et se répartissent dans les compartiments aqueux et lipidiques. Absorbé très efficacement quelle que soit la voie de pénétration (orale, cutanée, pulmonaire), il se distribue dans la plupart des tissus biologiques y compris dans les tissus fœtaux. Les systèmes enzymatiques les transforment ensuite en composés hydrosolubles plus facilement éliminés ou en métabolites réactifs, responsables de manifestations toxiques. La balance entre ces deux devenir métaboliques dépend étroitement de la nature des substituants portés sur les fonctions alcool ou sur le squelette carbone (CSHPF, 2002).

2.6.1.2. Toxicité à court terme

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

2.6.1.3. Administration chronique d'éthers de glycol chez l'animal

En expérimentation animale, les EG sont responsables d'un certain nombre d'effets systémiques. Leurs principaux effets toxiques à doses répétées sont hématologiques, gonadiques et tératogènes (INSERM, 1999).

2.6.1.4. Effets des éthers de glycol à dose chronique sur la reproduction

La reprotoxicité des produits chimiques peut s'exprimer à différents niveaux de l'un ou l'autre sexe:

Cette toxicité peut s'exprimer au niveau des organes reproducteurs, du système endocrinien associé (l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique) ou des événements qui font suite à la fécondation. Elles peuvent inclure des effets adverses sur la maturation sexuelle, la production et le transport des gamètes chez l'adulte, le comportement sexuel et la gestation sur toute autre fonction dépendante de l'intégrité du système reproducteur (Lemazurier *et al.*, 2003).

2.6.1.5. Effets sur les gonades mâles

Depuis la première publication de Nagano en 1979, de nombreuses études réalisées chez l'animal de laboratoire ont montré des effets délétères de certains éthers de glycol sur le fonctionnement testiculaire (Johanson, 2000). Quelle que soit la voie de pénétration dans l'organisme, ils ont observé une toxicité testiculaire de certains éthers de glycol de manière dose-dépendante. 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).

De nombreux travaux toxicologiques produits dès le début des années 1980 ont confirmé ces effets et souligné la très haute sensibilité du testicule à ces composés et la spécificité des lésions induites chez le rat, la souris, le chien ou le lapin (Hardin, 1983). Cette toxicité se manifeste principalement par une dégénérescence de l'épithélium germinale et une atrophie testiculaire, avec diminution du nombre de spermatozoïdes, infertilité et anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Hardin, 1983; OSHA, 1986; Kalf *et al.*, 1987).

L'effet testiculaire des éthers de glycol s'est avéré hautement spécifique pour la lignée des cellules germinales: un des trois grandes lignées cellulaires qui constituent le testicule (Multigner, 2002).

Les études disponibles sont de qualité diverses et les effets sont souvent difficiles à attribuer aux seuls éthers de glycol en raison des co-expositions à d'autres solvants. Cependant, un ensemble de résultats concordants est en faveur de l'existence d'un lien entre

l'infertilité masculine (s'entendant par la diminution de la concentration du sperme, l'oligospermie, la difficulté à concevoir un enfant) et l'exposition professionnelle à l'EGEE, l'EGME et peut être à l'un des autres EG présents dans l'industrie des semi-conducteurs (DEGDME, 2PG1MEA) (Figa *et al.*, 2001).

2.6.1.6. Effets sur les gonades femelles

La toxicité des éthers de glycol sur la fonction de reproduction chez la femelle non gravide a été très peu étudiée. Chez l'animal, le seul indicateur recherché était celui de la fertilité (femelles exposées et accouplées à des mâles non exposés). Au cours de ces dernières années, des études se sont intéressées aux effets des EG sur le cycle ovarien (Davis *et al.*, 1997).

Etudes in vivo

Davis *et al* (1997) ont révélé que l'administration quotidienne de 300 mg/kg/j d'EGME par voie orale chez des rates adultes supprime, au terme de 3 à 8 jours d'exposition, le rythme du cycle ovarien sans induire d'autre effet systémique. Cet effet est accompagné d'une augmentation des taux circulants de progestérone alors que ceux de l'hormone stimulante de la folliculogénèse (FSH), de l'hormone lutéinisante (LH) et de la prolactine restent inchangés. Une hypertrophie du corps jaune a été observée au niveau histologique. Ces données combinées suggèrent que les cellules lutéales ovariennes sont la cible primaire de l'EGME.

Etudes in vitro

In vitro, des cellules lutéales de la granulosa en culture isolées d'ovaires après injection de gonadotropine chorionique humaine (hCG) ont été exposées au MAA après stimulation à la LH. Ce métabolite de l'EGME maintient la sécrétion de progestérone pendant 24 et 48 h par rapport au témoin où la production de progestérone diminue (Davis *et al.*, 1997). Il est connu que la production de progestérone est stimulée par la LH via la voie adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Richards *et al.*, 1983). Or, dans cette étude le MAA stimule la production de progestérone dans absence de LH (après 24 ou 48 h) et la concentration d'AMPC ne varie pas lors du traitement. Ces travaux montrent que l'EGME (via le MAA) exerce un effet toxique sur la cellule lutéale et que la production de progestérone qui en découle est indépendante de la stimulation de l'AMPC par la LH (Davis *et al.*, 1997).

Deux enquêtes ont été menées aux Etats-Unis sur des femmes qui travaillent dans l'industrie des semi-conducteurs, dont l'objectif était d'examiner la fertilité et les issues de grossesse des

employées de ces industries ou des épouses des hommes employés, en relation avec les nombreuses expositions présentes, parmi lesquelles les EG.

Des anomalies de la durée ou de la régularité des cycles menstruels ainsi qu'une diminution de la fertilité conduisant à un taux de fécondabilité abaissé ou des difficultés à concevoir un enfant ont été constatés (INSERM, 1999).

2.6.1.7. Effets des éthers de glycol à doses répétées sur le développement

Les effets sur le développement ont été classés en 1999 par l'expertise collective Inserm en trois types :

- Toxicité chez les femelles gestantes.
- Mortalité fœtale.
- Malformations.

Le MAA, le principal métabolite de l'EGME s'avèrent constamment toxiques pour le développement dans maintes études sur diverses espèces d'animaux de laboratoire à qui ces composés avaient été administrés par voie orale.

2.6.1.7.a Toxicité chez les femelles gestantes

Lors d'une évaluation des études de toxicité sur le développement, la toxicité maternelle est tenue en compte vu la difficulté de séparer cette toxicité de l'effet tératogène. Une toxicité maternelle chez la femelle gravide est fréquemment rapportée comme c'est le cas pour l'EGME (Wickramaratne, 1986; Nagano *et al.*, 1981). Dans toutes les études dans lesquelles une toxicité maternelle a été observée, une diminution de la prise d'aliments par la mère et/ou une diminution de la prise de poids durant la gestation sont toujours notée (Lemazurier, 2003).

- Mortalité fœtale

Des travaux menées par Nagano *et al* (1981) chez la souris; Nelson & Brightwell (1984) chez le rat et Scott *et al* (1989) chez le singe pour une administration journalière de 1000 mg/kg/j; 264 mg/kg/j; 35,8 mg/kg/j respectivement pendant la durée de l'organogenèse. La mort de tous les fœtus a été constatée. Cette embryofétotoxicité est variable selon les doses et les espèces utilisées; elle peut se manifester selon la dose par une résorption fœtale totale ou partielle (Lemazurier, 2003).

- Malformations fœtales

Selon des protocoles de Wilson, les malformations observées dans la plupart des études, sont des anomalies au niveau des doigts et des pattes antérieures plus que postérieures et une exencéphalie, surtout à partir de la dose de 250 mg/kg/j chez la souris (Scott, 1989)

Après l'exposition, des malformations, qui ne témoignent pas d'un simple retard de croissance in utero, sont observables. Ces malformations varient en fonction des espèces et touchent de nombreux organes (anomalies digitales, exencéphalie, fente palatine, 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.

2.6.1.8. Effets hémato-toxiques des éthers de glycol à doses répétées

La toxicité hématologique des éthers de glycol s'exprime principalement sous trois formes: hémolyse, déplétion lymphocytaire responsable d'immunosuppression, toxicité sur les progénitures myéloïdes de la moelle osseuse. Elle a été largement étudiée sur des modèles animaux (Simonet, 2005).

L'hémolyse, un symptôme majeur de la toxicité hématologique de certains EG. Elle a fait l'objet de plusieurs études sur des modèles animaux. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet hémolytique a été souligné. Cette propriété se traduit le plus souvent par une hémolyse intravasculaire avec anémie régénérative (caractérisée par une augmentation du taux de réticulocytes et parfois érythroblastose sanguine), chute du taux d'haptoglobine sanguine, hémoglobinurie. Elle est associée à des déformations des hématies: stomatocytose, sphérocytose, puis aspect de fragmentation cellulaire (Ghanayem, 1996).

Les mécanismes de l'hémolyse restent mal connus. Les anomalies morphologiques observées avant l'hémolyse évoquent l'existence des lésions induites, des protéines de la membrane érythrocytaire et d'anomalies du squelette membranaire. Une étude expérimentale suggérant que la membrane érythrocytaire est probablement le site d'action hémolytique (Ghanayem *et al.*, 1987).

2.6.1.8.a. Action sur la moelle osseuse

L'exposition de l'animal à différents EG se manifeste au niveau de la moelle osseuse par une hypoplasie des lignées érythrocytaire et myéloïde, avec dommages des cellules

endothéliales (Kalf *et al.*, 1987). À l'inverse de l'hémolyse, les dérivés de l'éthylène glycol à chaîne alkyl courte ont une toxicité élevée sur la moelle osseuse:

l'EGME > EGEE > DEGDME > EGNPE, principalement (EGME) sont susceptibles de provoquer une hypoplasie médullaire, accompagné d'une leucopénie avec neutropénie et d'une anémie non régénérative (Ghanayem, 1996).

2.6.1.9. Immunotoxicité

Quelques EG cause une déplétion lymphocytaire et de façon moins marquée une altération fonctionnelle des lymphocytes (Kim & Smialowicz, 1997). Ceci explique en grande partie ses effets immunosuppresseurs (INSERM, 1999).

2.6.1.10. Effets immunosuppresseurs

Des études réalisées sur des modèles animaux ont constaté une diminution des réponses humorales à des stimuli antigéniques. L'effet immunosuppresseur est principalement décrit avec l'EGME, les dérivés à chaîne alkyl plus longue ayant peu ou pas d'activité immunosuppressive (Ghanayem, 1996).

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

2.6.1.11. Neurotoxicité

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

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

2.6.1.12. Effets génotoxiques *in vitro* et *in vivo* et les effets cancérigènes des EG

Se fait *in vitro* et *in vivo* à l'aide des modèles cellulaires aident à l'évaluation des potentialités mutagènes et génotoxiques. La mutagénicité 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 contient les altérations affectant la structure et le fonctionnement du génome, ainsi que les mécanismes de contrôle du cycle et de la division cellulaire (INSERM, 1999).

La toxicité de l'EGME sur les cellules germinales et ses effets d'induction *in vivo* des échanges de chromatides sœurs ont été confirmés par des études de génotoxicité *in vivo* sur les mammifères (rat et souris), alors que les effets clastogènes apparaissaient moins constants.

Des dommages à l'ADN des cellules de moelle osseuse et des cellules testiculaires ont été prouvés par le test des comètes. Ces altérations génomiques étaient plus marquées sur les cellules testiculaires mais sont apparues transitoires (Ballantyne & Vergnes, 2001).

Tableau 6 : 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 soeurs, **AC** : aberrations chromosomiques, **MicroN** : micronoyau, **Aneupl** : aneuploidie, **ICI** : inhibition des communications intercellulaires, **TM** : transformation morphologique.

2.6.2. Toxicité chez l'homme

2.6.2.1. Études épidémiologiques

Les études d'évaluation des risques invitent à penser que l'exposition massive aux EG reprotoxiques pendant plusieurs décennies peut avoir un impact important sur la santé reproductive de la population.

Plusieurs études réalisées sur des peintres exerçant dans des chantiers navals ont tenté d'évaluer les effets de l'exposition à l'EGEE et l'EGME sur les facteurs de reproduction. Les auteurs ont mis en évidence une diminution de la concentration du sperme et une augmentation du pourcentage d'oligospermies et d'azoospermies chez les hommes exposés Sparer *et al.*, 1988 ; ECETOC ; 2005).

Dans l'industrie des semi-conducteurs, un ensemble de résultats concordants est en faveur de l'existence d'un lien entre infertilité masculine (oligospermie, difficulté à concevoir un enfant) et exposition professionnelle à l'EGEE, l'EGME et leurs acétates (INSERM, 2006).

Un risque élevé de cancer du testicule a été décrit dans le secteur de l'aviation au cours d'une

étude réalisée par la Royal Navy britannique. Une cause possible de cet excès, proposée par les auteurs, est le contact régulier des mécaniciens avec les carburants d'avion contenant 0,15 % d'EGME (Yamane *et al.*, 2003)

Les études chez les femmes sont plus ambiguës. Elles semblent montrer une tendance à une baisse de la fertilité sans qu'elle soit statistiquement significative. Des augmentations du taux d'avortements ont également été observées dans l'industrie des semi-conducteurs lors d'exposition à un certain nombre de produits dont des éthers de glycol de la famille éthylénique (ECETOC ; 2005).

L'ensemble des études menées à l'échelle internationale se sont intéressées aux effets des EG sur les paramètres de reproduction y compris la fertilité féminine (Cicolella, 2006). Il s'agit de l'altération de l'ovogenèse ou de la perturbation du développement embryonnaire. Sa toxicité 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).

Une étude cas-témoins a mis en évidence, sur 44 patients atteints des malformations congénitales et souffrants des retards mentaux, un lien avec l'exposition professionnelle des mères à un mélange d'EGME et d'éthylène glycol pendant leur grossesse. Les enfants présentaient des signes et symptômes tels que des anomalies faciales, des retards mentaux, des anomalies sensorielles et des malformations des muscles squelettiques (Arteaga *et al.*, 2005). En 2002, EL-ZEIN a étudié 41 bébés nés de 28 femmes exposées professionnellement à l'EGME du six étaient exposées durant leur grossesse. Leurs six enfants présentaient des aspects dysmorphiques caractéristiques, non observés chez les 35 autres enfants (El-zein *et al.*, 2002). Un syndrome malformatif particulier a été décrit au Mexique, proche mais différent du syndrome d'alcoolisme fœtal, 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).

Tableau 7 : Synthèse de niveau de preuve de danger par période d'exposition par l'EGME (INRS,2010).

	À partir de données humaines	À partir de données animales
Fertilité homme	Oligospermie et difficulté de conception suspectées	Baisse de la fertilité (atrophie testiculaire) partiellement réversible selon la dose
Fertilité femme	Données discutables	Inhibition de l'ovulation (à confirmer)
Période équivalente au 1 ^{er} trimestre chez la femme	Effet malformatif suspecté	Embryotoxicité : embryolétale (pertes post-implantatoires) et tératogène (malformations du squelette et des viscères)
Période équivalente aux 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestres chez la femme	Fœtotoxicité : pas de donnée disponible	Fœtotoxicité : mortalité, baisse de poids des fœtus, retard d'ossification
	Effet sur le développement post-natal : pas de donnée disponible	Effet sur le développement post-natal : lésions testiculaires (diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes)
Allaitement ou exposition post-natale	Pas de donnée disponible	Effet sur le développement post-natal : lésions testiculaires (diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes en cas d'exposition des petits)

Légende

Pas d'effet



Pas d'évaluation possible



Preuves limitées d'un effet



Preuves suffisantes d'un effet

CHAPITRE III

Stress Oxydant

III. Le stress oxydant

1. Définition du stress oxydant

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance antioxydant/prooxydant est équilibrée. Mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou « ROS » en anglais Reactive Oxygen Species), devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés prooxydants ou par déficit en substances antioxydantes), on parle de stress oxydatif ou stress oxydant (Favier, 2003).

Dans les conditions physiologiques normales la balance oxydants/anti-oxydants est équilibrée

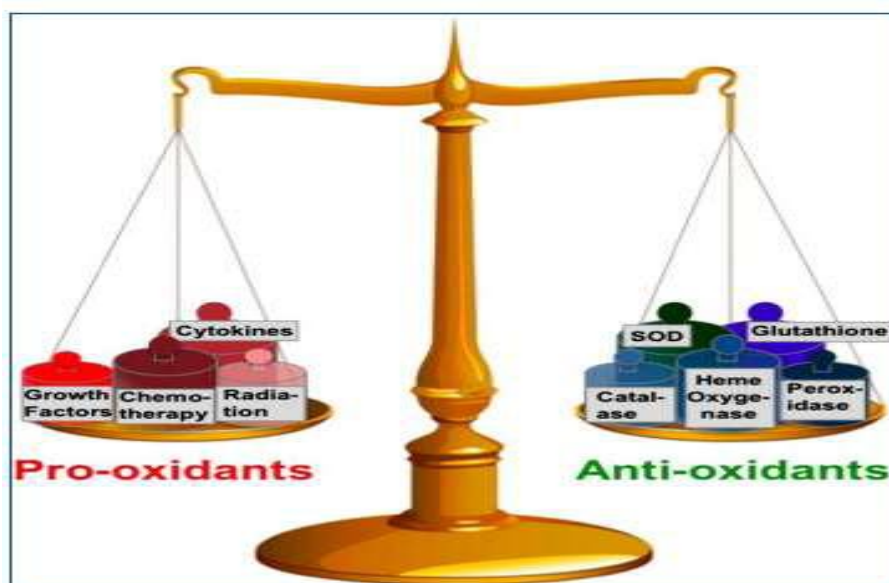


Figure 11 : la balance oxydants/anti-oxydants (Favier, 2003).

2. Origine du stress oxydant

Les causes essentielles de stress oxydant sont d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, soit d'origine accidentelle : inflammation, exposition à des xénobiotiques pro-oxydants (solvants toxiques), etc., ou d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira à la formation des ERO qui mèneront aux mécanismes pathogènes (Bartosz, 2003 ; Favier, 2003).

3. Les radicaux libres

3.1 Définition des radicaux libres :

Un radical libre est tout atome (Gutteridge et Mitchell, 1999) ou molécule avec un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbite extérieure (Deaton et Marlin, 2003). Le point symbolique à côté d'une abréviation chimique telle que ($\bullet\text{OH}$) signifie un radical libre (Scheibmeir *et al.*, 2005). La présence des radicaux libres dans les matières biologiques a été découverte à moins de 50 ans (Dröge, 2002). Cette configuration instable crée de l'énergie qui est libérée par les réactions avec des molécules adjacentes, telles que les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques (Rahman, 2007), ce qui provoque leur inhibition et accélère leur dégradation (Ratnam *et al.*, 2006). La réactivité des radicaux libres résulte de leur désir d'atteindre un électron d'un adverse directeur de spin (Deaton et Marlin, 2003).

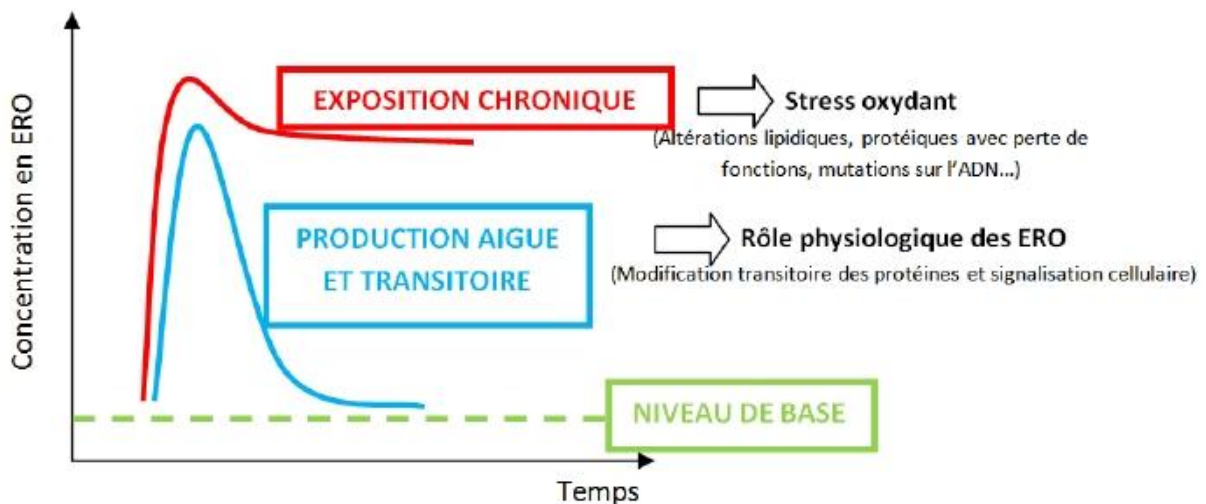


Figure 12 : La production d'ERO et ses conséquences cellulaires (Carriere, 2006).

3.2. Les types des radicaux libres

3.2.1. Le radical anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$)

Il existe trois voies de génération endogène des anions superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$), à savoir : la chaîne de transfert des électrons située au niveau des mitochondries; la flambée respiratoire des cellules phagocytaires ; ainsi que l'activité des enzymes de type oxydase.

- **La respiration mitochondriale** : la chaîne respiratoire mitochondriale constitue la source principale produisant environ 80 % d'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) (Turrens, 2003). Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final « l'oxygène », qui est réduit complètement en H_2O . L'énergie ainsi libérée

sous forme d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne est alors utilisée par l'ATP synthétase pour donner l'ATP. Dans ces conditions, le fonctionnement de l'ATP synthétase est couplé à celui de la chaîne respiratoire. Lorsque la respiration devient plus intense (par exemple : effort physique), une proportion significative de l'oxygène (2 à 6 %) échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I (NADH/ubiquinone réductase) et III (ubiquinol/Cytochrome c réductase) de la chaîne respiratoire pour donner l'anion superoxyde (O₂⁻), chef de file des ERO (Carrière *et al.*, 2006).

- **La poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (respiratory burst)** : est par ailleurs une source importante de l'anion superoxyde qui est produit au niveau de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique formé de plusieurs sous unités capables d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane des cellules phagocytaires activées. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la digestion du matériel phagocyté (Babior *et al.*, 2002 ; Favier, 2003).

- **Réaction d'oxydation** : le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante (Terada *et al.*, 1991).

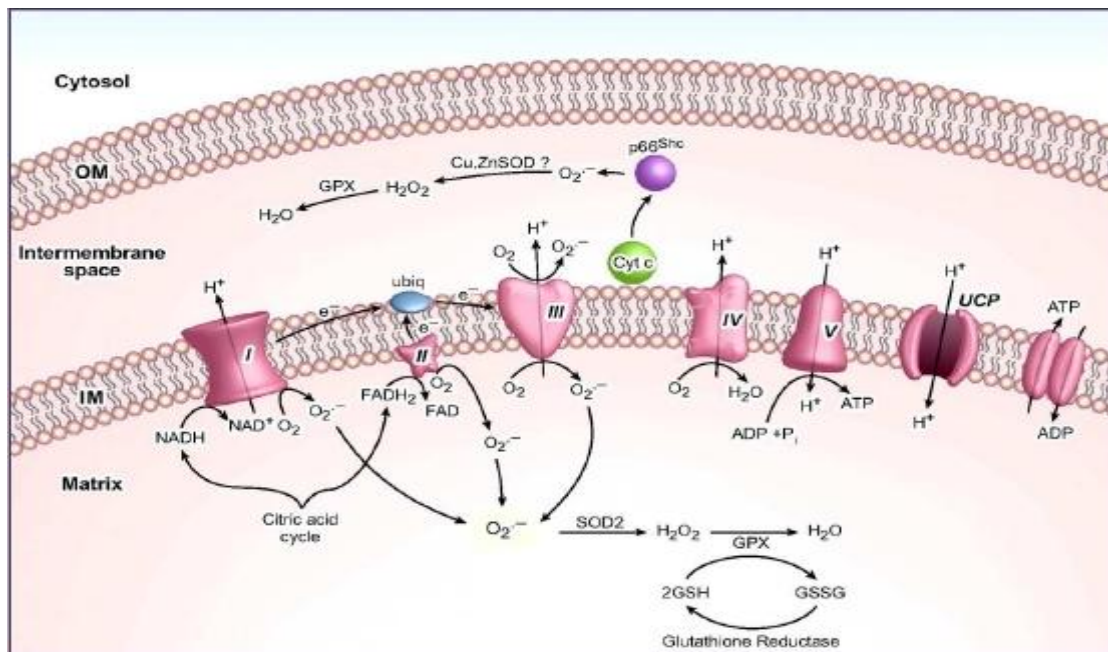


Figure 13 : Phosphorylation oxydative, production de superoxyde et les voies d'élimination dans les mitochondries (Nageswara *et al.*, 2007).

3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique, l'absence de charge à sa surface rend cette ERO peu réactif en milieu aqueux mais très lipophile capable de traverser les membranes biologiques et se retrouver distant de son lieu de synthèse. Sa toxicité se traduit par le fait qu'il participe à la formation du radical hydroxyle (OH·) (Cash *et al*, 2007). L'H₂O₂ se forme par la dismutation du radical superoxyde elle est soit spontanée ou enzymatique catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), ou les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes (Kohen et nysKa, 2002).

3.2.3. Radical hydroxyle (OH●)

Le radical hydroxyle (OH●) apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge, 1993). Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical, on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leurs forme réduite par une réaction appelée réaction de Fenton (Favier, 2003).

L'H₂O₂ peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du OH●, ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).

3.2.4. L'anion monoxyde d'azote (NO·)

Les systèmes enzymatiques nitrique oxyde synthase (NOS) produisent à partir de l'acide aminé L-arginine, le monoxyde d'azote à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de NO· et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxyde d'azote (ONOO·), qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO₂ et le OH· (Sorg, 2004).

D'autres sources ou modes de génération exogène des ERO existent de part les interactions avec le milieu environnant ; par exemple : L'ingestion de toxique (métaux lourds : chrome, cuivre, vanadium...) (Flora *et al*, 2008).

L'inhalation de certaines particules comme l'amiante ou la silice qui sont aussi génératrices de ERO, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer (Favier, 2003).

La fumée de cigarette contient plusieurs millions d'ERO altérant directement le premier

organe à leur contact : le poumon (Zang *et al*, 1995).

L'usage mal contrôlé de certains médicaments, comme le paracétamol (Abraham, 2005).

3.3. Potentialité toxique des espèces radicalaires

Le rôle délétère des radicaux libres est de plus en plus connu. Il a été suggéré pour la première fois par Harman (1956) qui proposait que les ERO formées peuvent potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Cependant, les cibles préférentielles des ERO sont les lipides, suivis par les protéines et les bases constitutives du matériel génétique.

3.3.1. La peroxydation lipidique

L'agression par les ERO déclenche une réaction en chaîne « la peroxydation lipidique », elle se déroule en trois phases (Oostenbrug *et al*, 1997 ; Lacolley, 2007).

L'initiation : l'acide gras polyinsaturé est attaqué par un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), ce dernier est capable d'arracher l'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, position particulièrement fragile pour donner un radical lipidique ($\text{R}\cdot$). Par réarrangement des doubles liaisons, il se forme un diène conjugué. Cette molécule réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$).

La propagation : le radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), en arrachant un hydrogène à une molécule d'acide polyinsaturée adjacente, devient un hydroperoxyde (ROOH), tandis que le deuxième acide gras subit la même suite de modifications en donnant un autre radical lipidique ($\text{R}\cdot$), ce dernier peut être réactivé par réaction de Fenton qui le convertit en radical alkoxy ($\text{RO}\cdot$) très réactif. Les hydroperoxydes (ROOH) peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase (GPx) ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents fragments dont le malonaldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Kohen et Nyska, 2002).

La terminaison : cette phase consiste à former des composés stables le plus souvent à l'issue de la réaction d'un radical avec des molécules antioxydantes dite 'briseur de chaîne' comme la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes.

La peroxydation lipidique est considérée comme une des conséquences les plus vulnérables

des attaques radicalaires. Elle est responsable des altérations cellulaires et diminution de la fluidité membranaire. Elle peut toucher aussi les lipoprotéines circulantes LDL aboutissant à leurs oxydation qui, une fois captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome favorisant le développement des maladies cardiovasculaires (Esterbauer *et al*, 1992 ; Davies, 2000 ; Favier, 2003).

3.3.3. Oxydation des protéines

Les protéines peuvent subir une oxydation de leurs acides aminés, soit au niveau de la chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (Berlette et Stadtman, 1997). Les acides aminés les plus sensibles aux attaques radicalaires sont ceux renfermant un atome de soufre et les acides aminés aromatiques (Dean *et al*, 1997). L'oxydation de ces acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines et peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements. Ils seront particulièrement susceptibles à la protéolyse afin d'éviter leur accumulation dans le noyau, le cytoplasme ou le réticulum (Jung *et al*, 2007). Les protéines dénaturées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent incapables de se fixer correctement sur un récepteur ou fixer spécifiquement un ligand, altérant ainsi la signalisation cellulaire. Elles deviennent hydrophobes, et forment des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus âgés (Favier, 2003).

3.3.2. Dommages oxydatifs de l'ADN

L'ADN est très sensible aux attaques par les radicaux de l'oxygène. Cinq classes principales de dommages oxydatifs incités par $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées (Hartmann et Niess, 2000 ; Cadet *et al*, 2002).

L'attaque directe des bases puriques et pyrimidiques engendre un grand nombre de bases modifiées, particulièrement la guanine qui est transformée en 8-hydroxy- 2'-déoxyguanosine (8-OHdG). La formation d'un site abasique non fonctionnel suite à l'attaque de la liaison entre la base et le désoxyribose.

L'oxydation du désoxyribose provoque une coupure de chaîne simple brin. L'agression radicalaire des protéines (histones), qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription),

entraîne des pontages des protéines. La création d'adduits avec des dérivés de la peroxydation lipidique, tel que le malonaldialdéhyde-guanine.

Ces altérations du matériel génétique représentent la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Favier, 2003 ; Valko *et al*, 2007).

3.4. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Plusieurs recherches ont confirmé l'implication du stress oxydant dans une multitude de maladies, comme le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse pulmonaire aigu, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Kuloglu *et al*, 2002 ; Judge *et al*, 2005; Haliwell, 2006 ; Pak *et al*, 2006; Valko *et al*, 2007; Ng *et al*, 2008).

3.5. Les systèmes de défenses antioxydants

Les cellules sont équipées de divers systèmes antioxydants distribués dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Powers et Sen, 2000). Dans leur définition du terme antioxydant, Halliwell et Gutteridge (1989) désignent au sens large, l'ensemble des molécules dont la teneur diminue lors d'un stress oxydant, en donnant des dérivés plus stables et bloquant la phase de propagation. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances qui agissent en synergie soit en inhibant la formation des ERO (la séquestration des métaux de transition empêche la réaction de Fenton et la production de OH·) ou en les métabolisant grâce à des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) ou même en se sacrifiant pour piéger l'électron célibataire du radical libre et le neutraliser.

3.5.1. Les systèmes enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. On peut citer : la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites, utilisent un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

- La Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases sont capables d'accélérer la dismutation de deux anions superoxydes en une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène (ZelKo *et al*, 2002). La superoxyde dismutase existe sous plusieurs isoformes, formé d'un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc (cCu-ZnSOD) protégeant le cytosol, la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (ZelKo *et al*, 2002 ; Favier, 2006).

- La Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme commune trouvée dans presque tous les organismes aérobies où elle fonctionne pour accélérer la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. Une molécule de catalase peut convertir des millions des molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire par seconde. Chez les mammifères la structure de la catalase est très complexe. Formée de quatre sous-unités identiques dont chacune a un poids d'environ 60 KDa, elle est prépondérante dans le foie, les reins, les érythrocytes (Deisseroth et Dounce, 1970).

- La Glutathion peroxydase (GSH-Px ou GPx)

Le rôle principal de cette enzyme est de protéger l'organisme des dégâts induits par le peroxyde d'hydrogène, mais aussi des peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium, son déficit entraîne une diminution de l'activité enzymatique. Il existe plusieurs isoformes codés par des gènes différents, qui varient dans l'emplacement cellulaire et la spécificité de substrat (Favier, 2003). GPx-1 est une protéine tétramérique avec quatre sous-unités identiques, dont chacune contient un résidu seleno-cystéine avec un poids moléculaire total de 22- 23 KDa. Cette forme de GPx est la plus abondante, trouvée dans le cytoplasme (Epp *et al*, 1983). GPx-2 est une glutathion peroxydase gastro-intestinal. Les fonctions de GPX-2 sont très spécialisées, elle assure la protection contre les hydro-peroxydes dans la nourriture et participe particulièrement dans la protection contre tous changements promouvant le cancer gastro-intestinal (Bermano *et al*, 1995). GPx-3 est une glycoprotéine purifiée du

plasma humain, agit contre la peroxydation des phospholipides ce qui lui donne un rôle direct dans la protection des membranes cellulaires. De plus, dans la thyroïde GPX-3 peut contrôler les niveaux de peroxyde d'hydrogène nécessaire à la synthèse d'hormone thyroïdienne (Howie *et al*, 1995). GPx-4 est une protéine de poids moléculaire environ 20-22 KDa. Cette protéine est caractérisée par une structure monomérique, associée des fois aux membranes cellulaires et agit en synergie avec la vitamine E pour prévenir la peroxydation lipidique (Maiorino *et al*, 1989).

- La Glutathion réductase (GSH-R)

La GR a pour rôle de régénérer le glutathion réduit (GSH) à partir du glutathion oxydé (GSSG) tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur. Cette activité enzymatique dépend des apports alimentaires de riboflavine (Sorg, 2004).

3.5.2. Système non enzymatique

Le glutathion (GSH) : dans des cellules vivantes, le plus abondant thiol de faible poids moléculaire est le glutathion (Sugiyama, 1992). Il est un antioxydant multifactoriel intracellulaire et il est considéré comme le majeur thiol disulfure représentant la solution tampon du redox de la cellule (Rahman, 2007). Le GSH est synthétisé à partir de L-glutamate, L-cystéine, et la glycine. Le foie est la principale source de la synthèse du glutathion (Sies, 1999), il est également abondant dans le cytosol, les noyaux et les mitochondries. Il est le principal antioxydant soluble dans ces compartiments cellulaires (Rahman, 2007). Le groupement actif de glutathion est le sulfhydryle (-SH) de la cystéine (Sies, 1999 ; Deaton et Marlin, 2003) et qui peut aisément accommoder la perte de l'électron unique (Rahman, 2007). Le glutathion disulfure ou oxydé (GSSG) est formé par l'oxydation de GSH (Sies, 1999), il est accumulé à l'intérieur de la cellule et le rapport de GSH/GSSG représente un bon indice du stress oxydant d'un organisme.

Les rôles principaux de protection de glutathion contre le stress oxydant sont :

- Il peut agir comme cofacteur de plusieurs enzymes de détoxification
- Il participe dans le transport des acides aminés à travers la membrane plasmique
- Il piège les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet directement, et régénère les vitamines (C et E) à leurs formes actives (Rahman, 2007).

La glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du glutathion dans laquelle deux molécules de glutathion sont reliées par leurs groupements sulfhydriles en formant un pont disulfure. Ce dernier est ensuite réduit par la glutathion réductase avec l'utilisation de NADPH+H⁺ (Deaton et Marlin, 2003).

Tableau 5: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin–ramonatxo, 2006).

<i>Nutriments antioxydants</i>	<i>Sources alimentaires</i>
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, Kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β-carotène	Légumes et fruits orangés et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins

3.6. Stress oxydant et grossesse

La grossesse est associée à une altération des fonctions physiologiques et métaboliques. Par conséquent, les événements remarquables et spectaculaires se produisent au cours de la période pour soutenir et favoriser la croissance et le maintien du fœtus (Idonije *et al.*, 2011). La grossesse est un état physiologique qui s'accompagne d'une forte demande énergétique et d'une exigence accrue en oxygène à l'origine d'un stress oxydatif (Desai *et al.*, 2003). L'intensité du stress oxydatif s'ajuste à la physiologie dynamique, le poids corporel de la mère et les changements des concentrations sanguines en lipides (Oeraitiene *et al.*, 2005). L'état de stress oxydatif pendant la grossesse est aussi dû à l'activité mitochondriale accrue et à la réduction du potentiel du piègeage (Kressig *et al.*, 2008) et (Arikan *et al.*, 2001) ont rapporté qu'il y a une augmentation significative des taux en MDA pendant la grossesse normale. Les peroxydes lipidiques se forment lorsque les lipides interagissent avec les radicaux d'oxygène. Le placenta humain produit des peroxydes lipidiques qui sont sécrétés principalement du côté maternel du placenta (Walsh et Wang, 1993) et les marqueurs de la

peroxydation lipidique accrue sont observés pendant la grossesse normale (Morris *et al.*, 1998). Plusieurs études ont montré que le système de défense antioxydante est modifié pendant la grossesse. Wisdom et son équipes (1991) ont montré que l'activité d'une importante famille d'enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase (SOD), est réduite dans le sang des femmes enceintes. En outre, Walsh et Wang. (1993) ont signalé un déficit dans une autre enzyme antioxydante, la glutathion peroxydase (GPx) pendant la grossesse. Compte tenu de ces constatations, on peut s'attendre à ce qu'une carence en ces enzymes conduirait à la peroxydation lipidique accrue pendant la grossesse. Les taux sériques réduits en vitamine C et en vitamine E ont été observés pendant toute la grossesse (Hassan et Onu, 2006).

3.6.1. Stress oxydatif et fœtus

L'embryon nécessite de l'énergie sous la forme de l'ATP, de NADPH, et de l'oxygène pour se développer d'une manière adéquate. Ces composés sont générés à partir de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et sont étroitement régulés. Une conséquence inévitable de la respiration aérobie est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui si elles sont produites à des niveaux élevés, peuvent activer une variété de voies de signalisation et affecter négativement le développement. Au cours du développement, il ya un équilibre délicat entre les fonctions de ROS et des antioxydants pour maintenir l'homéostasie. La perturbation de cet équilibre entraîne des anomalies qui peuvent avoir un impact sur les cellules germinales, l'embryon et le fœtus et peut avoir à long terme des conséquences sur l'organisme mature (Dennerly, 2010). Les modèles animaux ont été très utiles pour démontrer que l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène, associée à une augmentation des espèces réactives de l'azote, sont clairement liées à l'induction des malformations chez le fœtus (Lappas *et al.*, 2011). Des souris gestantes traitées avec des antioxydants tels que le butylhydroxytoluène, la vitamine E, la vitamine C, ou l'acide lipoïque ont moins de descendants avec des malformations, alors que la perturbation de la superoxyde dismutase conduit à des anomalies congénitales mineures et majeures qui sont associées à une augmentation de l'oxydation de l'ADN par les ROS (Eriksson, 1999).

En ce qui concerne les études animales, l'exposition du fœtus aux ROS peut altérer de façon permanente la fonction des cellules pancréatiques, ce qui conduit au diabète. Récemment, beaucoup de données épidémiologiques suggèrent que les influences indésirables pendant le développement humain précoce et dans la vie foetale augmentent le risque de

maladies de l'adulte, c'est ce qu'on appelle la programmation foetale pour le développement des maladies chez l'adulte (Barker *et al.*, 1993).

3.6.2. Stress oxydatif et placenta

Le placenta est un organe unique et transitoire, indispensable à l'établissement de la grossesse, à son bon déroulement, à la croissance embryonnaire et fœtale. Il est de plus impliqué dans les mécanismes du développement et de l'accouchement à terme (Caron, 2007). Le placenta régule la croissance et le développement fœtal à travers le transport des nutriments et de gaz, la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdiennes et peptidiques. Ces fonctions sont déterminées par le développement vasculaire et la circulation sanguine et par la croissance et la différenciation du trophoblaste, qui contient des récepteurs, des transporteurs et des enzymes. Le placenta génère des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent contribuer au stress oxydatif observé, même dans la grossesse normale. Ce stress est très important dans la grossesse compliquée par une prééclampsie, une restriction de croissance intra-utérine (RCIU) et un diabète pré gestationnel. Le stress nitratif est la modification covalente des protéines et d'ADN par le peroxynitrite formé par l'interaction du superoxyde et du monoxyde d'azote (Myatt, 2010). Le stress nitratif est très important au cours des grossesses compliquées. Le stress oxydatif et nitratif perturbe la fonction placentaire conduisant à des perturbations de la croissance foetale et du développement (Lappas *et al.*, 2011).



PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV

Matériels et Méthodes

Objectif du travail

Ce travail est consacré à évaluer l'effet reprotoxique, fœtotoxique et hématotoxique de l'EGME sur les lapines gravides et non gravides en essayant d'approfondir les données des études menées à l'échelle internationale et d'évaluer sa potentialité toxicologique à induire un stress oxydatif en évaluant son pouvoir oxydant *in vitro*.

1. Matériels

1.1. Matériel biologique

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des lapines de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*, largement utilisées 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*

Les animaux qui ont servi à cette étude sont composés de 40 lapines non gravides âgées entre 6 et 8 mois dont le poids corporel moyen est de 3518 ± 172 g et 40 lapines femelles gravides de la même espèce, nullipares âgées entre 6 à 9 mois dont le poids corporel moyen est de 3402 ± 121 g.

1.1.1. Le choix de l'animal

Nous avons choisi le lapin comme model animal de l'expérimentation a cause d'une forte sensibilité à ce genre de solvant et pour son rapprochement phylogénétique avec l'homme.

1.2. Matériel chimique

Le solvant utilisé dans cette expérimentation est l'Ethylène Glycol Monométhyl Ether (EGME) qui fait partie de la catégorie «E» des éthers de glycol ou la catégorie des dérivés de l'Ethylène glycol.

L'EGME principalement utilisé comme solvant pour la fabrication de peintures, vernis, 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, 2010 comme suite :

T : Toxique

R60 : Peut altérer la fertilité.

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

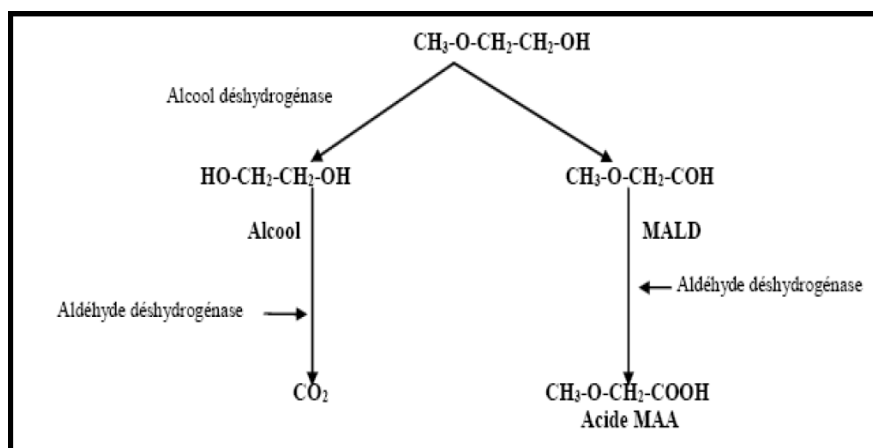


Figure 14 : Formule développée et métabolisme de l'EGME

(Paul *et al.*, 1986 ; Lemazurier *et al.*, 2003).

1.2.1. Le choix de la dose

En se basant sur la bibliographie, les trois doses de l'EGME administrées sont : 50, 100, et 150ppm (mg/kg de poids corporel des animaux) ont été choisies.



Figure 15: Le solvant utilisé dans l'expérimentation

1.3. Conditions d'élevages

1.3.1. Les expérimentations sur les lapines gravides

Se sont déroulées entre octobre 2013 et juin 2014 au niveau de l'atelier d'élevage cynicole du centre de formation professionnelle et d'apprentissage d'OULED MIMOUNE-TLEMCEN (Ouest algérien).

Les paramètres d'ambiance du bâtiment d'élevage: la ventilation, l'humidité relative, la température ainsi que l'éclairage (16h de lumière/j) sont contrôlés. L'un des bâtiments sert à la reproduction et l'autre à l'engraissement. Les animaux sont logés individuellement dans des cages grillagées galvanisées de type Flat Deck, munies d'une trémie, d'une tétine d'abreuvement et de boîtes à nid, fixées à l'extérieur. Ils sont nourris ad libitum à base d'un aliment granulé constitué de maïs et d'orge fabriqué à Ain-Fezza (TLEMCEN).



Figure 16 : le bâtiment d'élevage cynicole au niveau de CFPA d'Ouled Mimoune – TLEMCEN

1.3.2. Les expérimentations sur les lapines non gravides

Se sont déroulées entre janvier 2015 et février 2016 au niveau de la réserve de chasse de Sig-MASCARA (Ouest algérien) et dans l'animalerie de l'institut supérieur de biotechnologie de Béja - TUNISIE.



Figure 17: le bâtiment de l'expérimentation au niveau de la réserve de chasse de Sig-MASCARA

2. Principe et protocole expérimental

2.1. Etude de l'effet de l'EGME sur les lapines gravides

L'expérimentation consiste à administrer aux lapines après la saillie (femelle exposée avec un male non exposé à l'EGME), trois doses croissantes de solvant: 50, 100, et 150ppm. Pour cela nous avons répartis 40 lapines en quatre groupes, chacun comprend dix lapines (n=10), il s'agit du :

Groupe témoin n'ayant reçu aucun traitement

Groupe traité par l'EGME à raison de 50 ppm

Groupe traité par l'EGME à raison de 100ppm

Groupe traité par l'EGME à raison de 150ppm

2.1.1. Le déroulement de l'expérimentation

Comme nous avons déjà mentionné, cette étude s'est déroulée dans un bâtiment d'élevage cunicole, nous avons essayé d'acheter des lapines pubères nullipares qui ont presque le même âge, même taille, même poids et dépourvu des maladies afin de ne pas fausser les résultats souhaités et elles sont déjà adaptées aux conditions du bâtiment.

La lapine a la particularité sexuelle d'être une espèce à ovulation provoquée. De ce fait nous avons respecté les démarches suivantes pour confirmer la réussite de l'accouplement afin de mettre en évidence l'effet toxique sur l'EGME.

2.1.2. La détermination de l'état d'œstrus des lapines

La lapine ne présente pas de cycle œstral avec apparition régulière d'œstrus. On parle plutôt de période de réceptivité ou de non réceptivité. Pour savoir si la lapine est réceptive, on peut regarder la couleur de la vulve qui devient rouge et humide, ce dernier est le seul critère fiable de l'acceptation de l'accouplement.



Figure 18 : L'observation de la couleur de la vulve (état d'œstrus).

2.1.3. La saillie (Accouplement)

Pour l'accouplement, nous avons placé les femelles réceptives dans la cage du mâle, et non l'inverse : en effet, dans le cas contraire, elle peut se montrer très agressive sur son domaine et lui causer de graves blessures.



Figure 19: L'accouplement des lapines

2.1.4. L'administration de l'EGME par voie orale

Après un jour d'accouplement, le produit est administré par voie de gavage à l'aide d'un pistolet de gavage une fois par jour (1 mL), 6 jours par semaine, pendant toute la durée de la gestation (31 jours).

Nous avons pris la précaution de manipuler nos animaux quotidiennement, à la même heure, afin d'éviter tout stress le jour du sacrifice. En effet, d'après Loybert *et al.*, 1997, les animaux d'expérimentation manipulés chaque jour présentent des teneurs en corticostérone plasmatique et surrénalienne plus faibles que celles des animaux non manipulés.



Figure 20 : Le gavage de la lapine par l'EGME à l'aide d'un pistolet

2.1.5. Les pesées des lapines

Un suivi pondéral des lapines gestantes a été réalisé de façon hebdomadaire dès le premier jour de gavage à l'aide d'une balance électronique de marque SCOUT PRO pour noter les variations pondérales causées par le solvant.



Figure 21. Un suivi pondéral régulier des lapines gestantes

2.1.6. Diagnostic de gestation

Se fait grâce à la palpation abdominale pour confirmer une éventuelle présence de gestation chez toutes les lapines, la détection des fœtus se fait sentir par la présence de petites boules souples et glissantes au toucher. Cette méthode est déconseillée après 20 à 25 jours de gestation car elle présente de forts risques d'avortement.



Figure 22 : Diagnostic de la gestation par palpation abdominale

2.1.7. La préparation de la boîte à nid

Avant environ 5 jours de la date présumée de la mise bas, nous avons placé les boîtes à nid. Les lapines ont commencé de construire leur nid dans une boîte, on s'arrachant des poils par grandes touffes au niveau de leur ventre, et elles deviennent plus nerveuses.

2.1.8. La mise bas

La mise-bas a généralement lieu tôt le matin dans la boîte à nid : 68 % des naissances arrivent entre 5h et 13h, contre seulement 8 % entre 21h et 5h. Si tout se passe normalement, elle se déroule assez rapidement, au maximum en 30 min (Lebas, 2011).



Figure23 : Observation d'une lapine témoin après sa mise bas

2.1.9. Prélèvement de sang

A la fin de l'expérimentation, Nous avons prélevé le sang à l'aide une aiguille épicroténienne dans la veine marginale des oreilles. Le sang recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA pour le comptage des cellules sanguines (globules blancs, lymphocytes, globules rouges, hémoglobine, plaquettes). Trois autres fractions de sang sont récoltées dans des tubes héparinés, puis centrifugées (1000 tours pendant 3 min), le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -20° C pour le dosage des différents paramètres biochimiques : ASAT, ALAT, créatinine, urée, glucose, cholestérol, triglycérides.

2.1.10. Prélèvement des organes

La pesée du foie et des ovaires à l'aide d'une balance de précision a été effectuée après la dissection des animaux témoins et traités par la faible dose d'EGME (50 ppm) ayant accompli leur mise bas et celles des lapines décédées après un avortement spontané précoce ou tardif suite à leur exposition à de forte dose d'EGME (100 et 150 ppm).

L'ensemble des démarches expérimentales réalisées sur les lapines gravides sont indiqué en dessous dans la figure 24

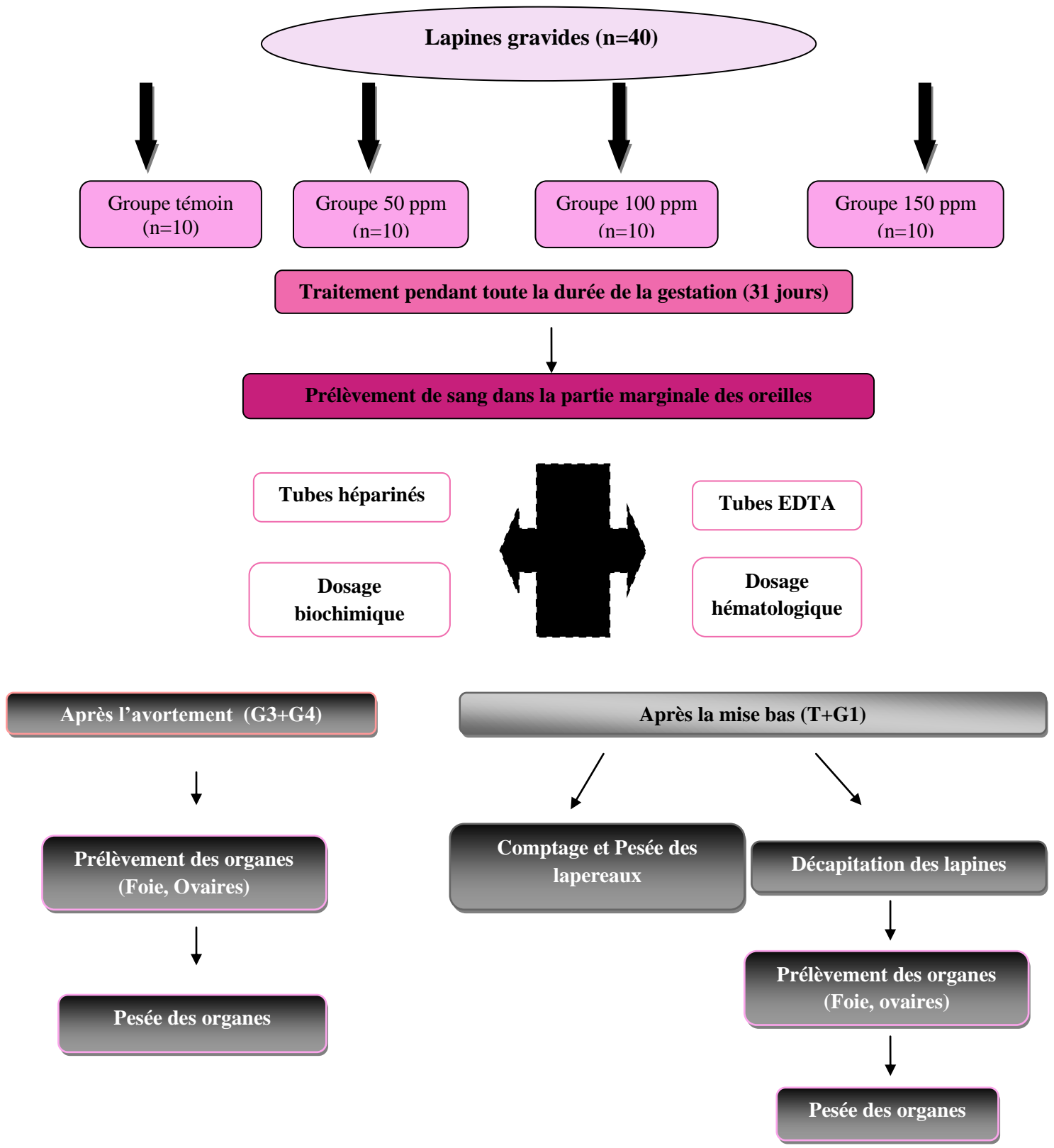


Figure 24: Schéma récapitulatif du protocole expérimental effectué chez les lapines gravides.

2.1. Effet de l'EGME sur les lapines non gravides

La première partie de l'expérience a été faite dans le laboratoire de la réserve de chasse de Sig-MASCARA. L'expérimentation consiste à administrer aux lapines trois doses croissantes de l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME): 50, 100, et 150ppm. Pour cela nous avons répartis 40 lapine en quatre groupes, chaque groupe comprend dix lapines (n=10), il s'agit du :

- Groupe témoin n'ayant reçu aucun traitement,
- Groupe traité par l'EGME à raison de 50 ppm,
- Groupe traité par l'EGME à raison de 100ppm,
- Groupe traité par l'EGME à raison de 150ppm

Le produit est administré par voie de gavage à l'aide d'un pistolet une fois par jour (1mL), 6 jours par semaine pendant quatre semaines successives.



Figure 25 : Le gavage de l'EGME par voie orale chez des lapines non gravides

2.2.1. Le suivi pondéral des lapines non gravides

Les lapines ont été pesées et suivies quotidiennement dès le premier jour de gavage avec une balance électronique de marque *SCOUT PRO* en notant toutes les variations pondérales et physiologiques causées par l'EGME.

2.2.2. Prélèvement du sang

Nous avons prélevé le sang de la veine marginale des oreilles à l'aide une aiguille épicroténienne après avoir rasé et désinfecté la région, Le sang recueilli dans des tubes EDTA pour le comptage des cellules sanguines (globules blancs, lymphocytes, globules rouges, hémoglobines, plaquettes). Trois autres fractions de sang sont récoltées dans des tubes héparinés puis centrifugées, le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -20°C pour le dosage des différents paramètres biochimiques : ASAT, ALAT, créatinine, urée, glucose, cholestérol, triglycérides.



Figure 26: Technique de prélèvement de sang à partir de la veine marginale.

2.2.3. Les sacrifices

A l'issue des 4 semaines de traitement, nous avons procédé à la dissection après la décapitation des animaux (à jeun depuis au minimum 12 heures) au niveau de laboratoire dans la réserve de chasse de Sig-MASCARA afin de prélever et peser le foie et les ovaires qui ont été immédiatement plongés dans le sérum physiologique (0,9%) maintenus à 2°C , afin d'arrêter toute activité catabolique.

2.2.4. Les dosages des paramètres de stress oxydant

Une deuxième partie de l'expérience a été réalisée dans les laboratoires de l'institut supérieur de biotechnologie de Béja-TUNISIE, nous avons gardé la même espèce des animaux et respecté toutes les conditions de traitement.

Le dosage des paramètres de stress oxydatif a été fait aux niveaux tissulaire, hépatique et ovarien. 0,4g de chaque organe (foie et ovaire) sont prélevés et homogénéisés dans 4mL de PBS (phosphate Buffer Saline, pH=7,4) et broyés à l'aide d'un Potter. On a procédé ensuite à une centrifugation à 1000 tours pendant 15 min. Le surnageant ainsi obtenu est fractionné en aliquotes dans des tubes Eppendorfs numérotés et conservé à -80°C. Il a servi aux dosages des différents paramètres du stress oxydant : le dosage des enzymes antioxydants (GPx), bio marqueurs de la peroxydation lipidique (MDA) et du glutathion (GSH) et une autre partie du foie conservée dans le formol pour l'étude histologique.



Figure 27 : la dissection et le prélèvement des organes chez les lapines.

L'ensemble des démarches expérimentales réalisées sur les lapines non gravides sont indiquées en dessous dans la figure 25.

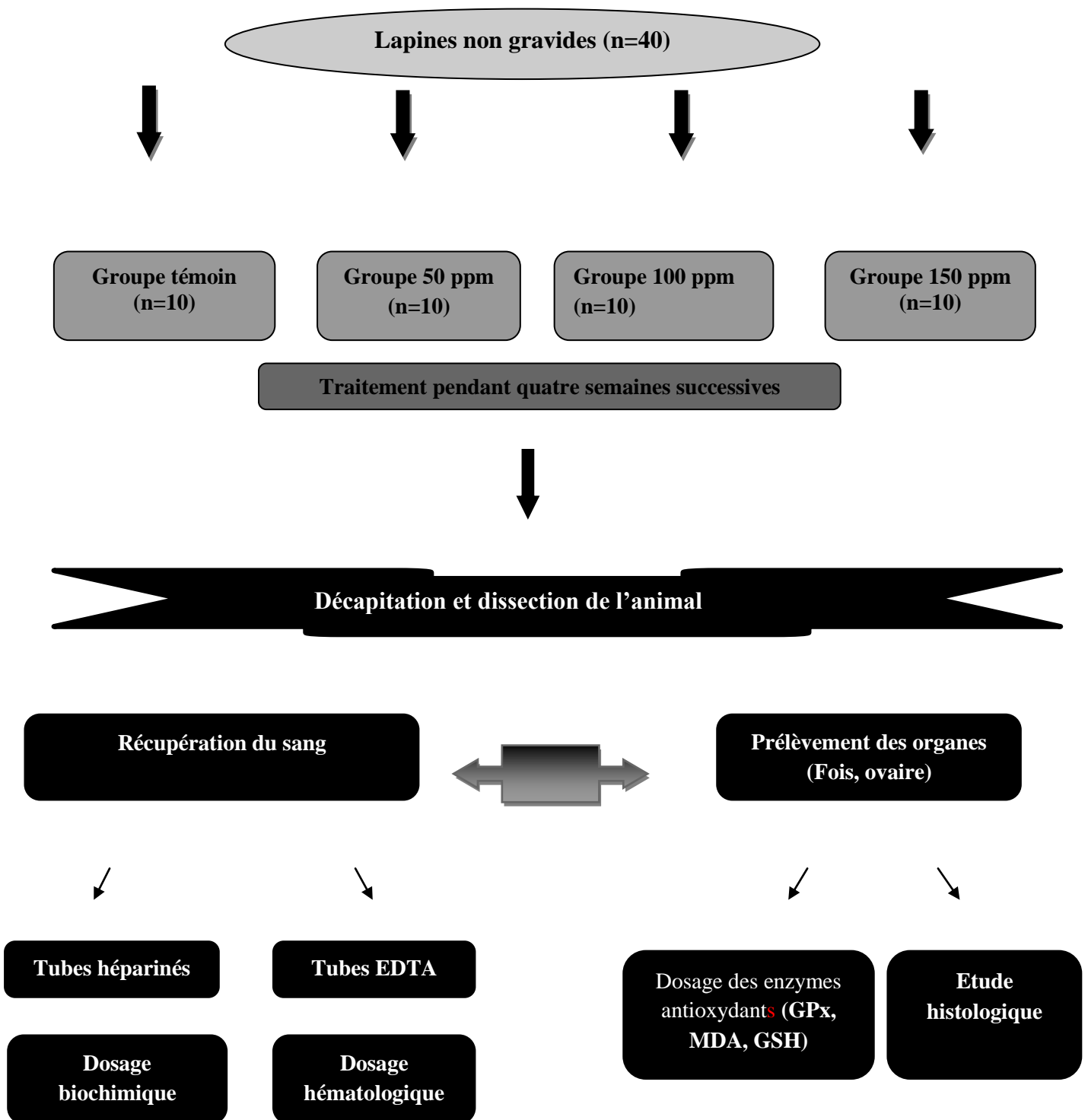


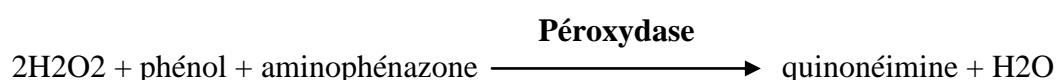
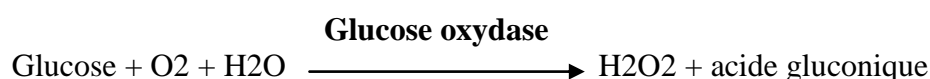
Figure 25: Schéma récapitulatif du protocole expérimental chez les lapines non gravides.

2.2. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques

2.3.1. Dosage du glucose plasmatique

Principe

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



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

La préparation de réactifs utilisés (Voir annexe, tableau 1)

Préparation des réactifs de travail (RT)

Le contenu de R2 a été dissous dans la fiole de R1 le tout a été bien mélangé et avec douceur jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable pendant 4 mois à 2-8, ou 40 jours à 15-25 C°.

Mode opératoire

Ajouter 10 µL de l'échantillon et 10 µL de l'étalon dans le RT

Agiter bien par le vortex et incubé pendant 5 min à 37° C.

Mesurer l'absorbance (DO) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

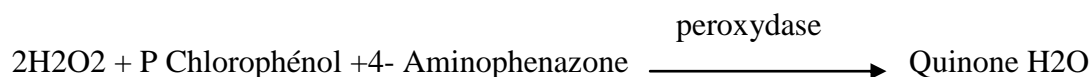
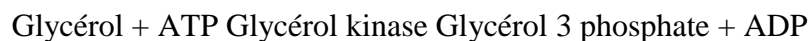
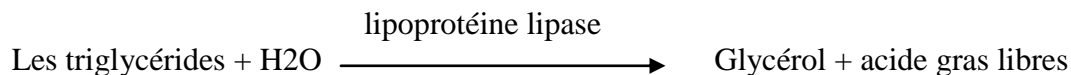
Calcul de la concentration: la concentration du glucose dans l'échantillon est calculée par la formule suivante :

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

2.3.2. Dosage des triglycérides plasmatiques

Principe

Les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré selon la réaction suivante (Kaplan *et al.*, 1984) :



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

Réactifs utilisés (Voir annexe I, tableau 2)

Préparation de réactif de travail (RT)

Dissoudre le contenu de R2 dans la fiole de R1.

Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

Ce réactif de travail est stable 6 semaines à 2-8 C° ou une semaine à 15-25 C°.

Mode opératoire

Ajouter 10 µL de l'échantillon et 10 µL de l'étalon dans le RT .

Agiter bien par le vortex et incuber pendant 5 min à 37°C ou 10 min à la température de 25°C.

Mesurer l'absorbance (DO) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

Calcul de la concentration

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

2.3.3. Dosage des protéines totales

Les protéines du sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un

Complexe coloré en bleu. L'intensité de couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon (Burtis *et al.*, 1999).

pH alcalin

Protéines + Cu⁺² \longrightarrow Cu - Complexe protéinique

Réactifs utilisés (Voir annexes I, tableau 3)

Mode opératoire

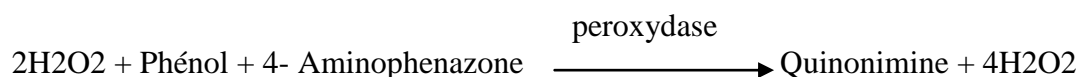
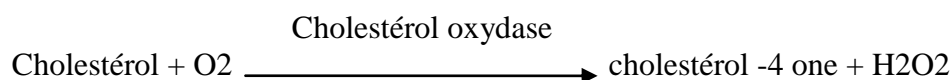
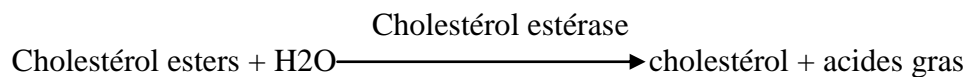
Mélanger 25 μ L de l'échantillon et 25 μ L de l'étalon dans 1 mL de RT, agiter bien et incuber pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à la température de 25°C.

Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 540 nm et de l'étalon contre le blanc. La couleur est stable après 30 min.

$$\text{Concentration des protéines (g/L)} = \frac{\text{Concentration de l'échantillon}}{\text{Concentration de l'étalon}} * 7$$

2.3.4. Dosage du cholestérol plasmatique**Principe**

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinonéimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino-4- antipyrine en présence de phénol et de peroxydase, selon les réactions suivantes (Naito, 1984).



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

Réactifs utilisés (Voir annexes I, tableau 4)

Préparation de réactif de travail (RT)

Dissoudre le contenu de R2 dans la fiole de R1.

Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 1 mois à 2-8 C° à l'abri de la lumière.

Mode opératoire:

Ajouter 10 µL de l'échantillon et 10 µL de l'étalon dans le RT

Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à la température de 25°C.

Mesurer l'absorbance (DO) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

Calcul de la concentration

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

2.3.5. Dosage de créatinine plasmatique**Principe**

La créatinine présente dans le sérum forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide principal. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine (Murray *et al.*, 1984).

Réactifs utilisés (Voir annexe I, tableau 5)

Préparation et stabilité

Les réactifs sont à l'emploi stable à température ambiante.

Réactif du travail : mélanger à parts égales R1 et R2.

Stabilité : 10 jours à 15-25 C°.

Mode opératoire

Ajouter 100 µL de l'échantillon et 100 µL de l'étalon dans le RT

Mélanger et lire la densité optique DO1 après 30 sec, à 492 nm.

Lire ensuite DO2 exactement 1 minute après.

Calcul de la concentration

Calcul de ($\Delta \text{DO} = \text{DO1} - \text{DO2}$) pour l'étalon et les échantillons.

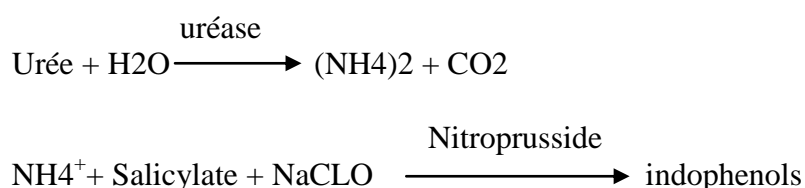
$$[C] \text{ (mg/L)} = \frac{\Delta \text{DO échantillon}}{\Delta \text{DO étalon}} \times 2$$

2.3.6. Dosage de l'urée plasmatique

Principe

Les ions d'ammonium peuvent réagir avec le salicylate et le dihypochlorite de sodium pour donner un complexe coloré en vert, L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée présentée dans l'échantillon.

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode enzymatique par l'utilisation de l'uréase selon la réaction suivante (kaplan *et al.*, 1984) :



Réactifs utilisés (Voir annexe I, tableau 6)

Préparation de réactif de travail (RT)

Dissoudre un comprimé de R3 Enzyme dans la fiole de R1.

Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 4 semaines à 2-8 C° ou une semaine à 15-25C°.

Mode opératoire

Ajouter 1 mL de l'échantillon et 1 mL de l'étalon dans le RT

Mélanger et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min températures de 25C°.

Mesurer l'absorbance (DO) de l'échantillon à 580 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min à 15-25C°.

Calcul de la concentration

La concentration est calculée par la formule suivante :

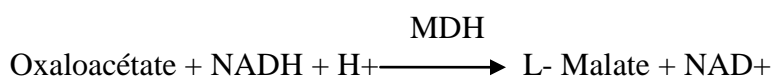
$$[\text{C}] \text{ (mg/L)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 50$$

2.3.7. Dosage d'Aspartate-Aminotransférase (ASAT/TGO)

Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺. Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'aspartate aminotransférase dans l'échantillon (sérum) (Murray, 1984)

Détermination cinétique de l'ASAT selon la réaction suivante (Bergmyer, 1980)



Réactifs utilisés (Voir annexe, tableau 7)

Préparation de réactif de travail (RT) et stabilité

Dissoudre le contenu de R2 dans la fiole de R1.

Agiter bien et doucement.

Mode opératoire

Ajouter 50 μ l dans 3 mL de RT, mélanger et incuber les tubes préparés 1 minute à 37 C°. Mesurer la diminution de la DO par minute pendant 1 à 3 minute à 340 nm.

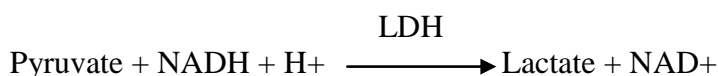
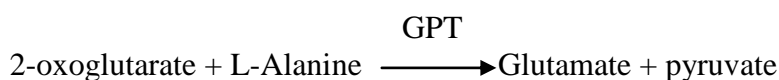
Activité (ASAT/TGO) UI/l = Δ DO x 175

Δ DO : C est la valeur moyenne des trois lectures.

2.3.8. Dosage de l'Alanine-Aminotransférase (ALAT/GPT)

Principe

Détermination cinétique de l'activité d'ALAT selon le schéma réactionnel suivant :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine-aminotransférase dans l'échantillon

Réactifs utilisés (Voir annexe I, tableau 8)

Préparation de réactif de travail (RT) et stabilité :

Reconstituer chaque R2 par un flacon R1. Cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8 C°
24 heures à 20-25 C°.

Mode opératoire :

Ajouter 50 µl de l'échantillon dans 3 mL de RT, Mélanger et incuber les tubes préparés 1 minute à 37 C°. Mesurer la diminution de la DO par minute pendant 1 à 3 minute à 340 nm.

Activité (ALAT/GPT) UII = Δ DO x 1750

2.4. Evaluation de la toxicité hématologique

Principe

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

La toxicologie hématologique a été mise en évidence à travers la détermination de la formule numérique sanguine (FNS) qui a été effectuée en utilisant un automate d'hématologie (Marque : ERMA INC).

Le tube à EDTA contenant le sang est placé dans l'automate, et la mesure de la FNS commence. Au bout de 2 minutes les résultats s'affichent sur l'écran, et en suite on les imprime.

Les paramètres hématologiques mesurés sont : Globule Rouge (**GR**), Globule Blanc (**GB**), Hémoglobine (**Hb**), Plaquettes (**PL**).

2.5. Dosage des biomarqueurs du stress oxydant dans le foie et les ovaires

1. Détermination du taux de MDA

Principe

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par certains contaminants. Dans notre étude, les taux du MDA hépatique et ovarien ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa *et al* en 1979.

Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (80 °C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA).

Dans la réaction de dosage du MDA, deux molécules TBA réagissent avec une molécule de MDA pour former un pigment rose possédant une absorbance maximale entre 530 nm

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formée, donnant ainsi une évaluation précise de la lipoperoxydation.

Préparation de l'homogénat

500 mg de foie ou des ovaires des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1M, pH 7.4) pour obtenir un homogénat.

Mode opératoire

- Prélever 0,5 mL de l'homogénat,
- Ajouter 0,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 20 %,
- Ajouter 1 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %,
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80 °C pendant 15 minutes,
- Refroidir et additionner de 4 mL de *n*-butanol,
- Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min,
- Récupérer le surnageant, et lire la DO à 530 nm contre le blanc,

La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nm/gramme de tissu (foie ou ovaires).

2. Détermination de Glutathion réduit (GSH)

Principe

La plupart des protéines possèdent des groupements thiols (-SH) qui réagissent très facilement avec les espèces oxygénées activées.

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

Une fois préparé, le surnageant doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 50.25%) afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion (Weckbecker & Cory, 1988).

Préparation de l'homogénat

200 mg de foie et des ovaires ont été mis en présence de 8 mL d'une solution d'Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason pour obtenir un homogénat. Centrifuger l'homogénat obtenu à 5000 tours/mn pendant 15 minutes et récupérer le surnageant pour le dosage des protéines tissulaires et le glutathion GSH.

Mode opératoire

1. 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.

2. Dosage du GSH tissulaire :

- Prélever 0.8 mL du surnageant,
- Ajouter 0.2 mL d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0.25%,
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace,
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 minutes,
- Récupérer le surnageant pour le dosage des protéines tissulaires et le glutathion GSH.
- Ajouter 1 mL du tampon Tris-EDTA, pH = 9.6,

- Mélanger et ajouter 0.025 mL de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (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 :

$$[\text{GSH}] = (\text{DO} \times 1 \times 1.525) / (13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg protéines}) = \text{nM GSH/mg des protéines}$$

DO: densité optique,

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

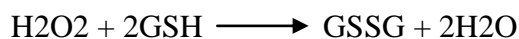
0.8 : le volume de l'homogénat trouvé dans 1 mL,

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 mL.

3. Détermination de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Principe

L'activité de peroxydase de glutathion a été mesurée par la méthode de Flohé et de Günzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Préparation de l'homogénat

500 mg de foie ou des ovaires des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) pour obtenir un homogénat.

Mode opératoire

- Prélever 0.2 mL de l'homogénat,
- Ajouter 0.4 mL de GSH (0.1 mm),
- Ajouter 0.2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50 mm, NaCl 150 mm pH 7.4),
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min,
- Ajouter 0.2 mL de H₂O₂ (1,3 mm) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes,
- Ajouter 1 mL de TCA (1 %) pour arrêter la réaction,
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes,
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes,
- Prélever 0,48 mL du surnageant,
- Ajouter 2,2 mL de la solution tampon TBS,
- Ajouter 0,32 mL de DTNB,
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

Q : Quantité de GSH disparue (oxydée)

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

DO étalon : Densité optique de l'étalon.

0.04 : Concentration du substrat (GSH).

$$\text{L'activité de la GPx (mmole de GSH oxydées/mg de protéines)} = \frac{Q \times 5}{1 \text{ mg de protéines}}$$

3. Etude histologique

Les coupes histologiques du foie et des ovaires ont été réalisées dans le centre hospitalo-universitaire (CHU) de Sidi-Bel-Abbès au niveau du service d'anatomo-pathologie.

Les préparations des coupes histologiques ont été effectuées selon la méthode de Marjota et al en 1967, elle comporte plusieurs étapes : la fixation, déshydratation, inclusion, réalisation des blocs, confection des coupes, coloration.

1. Fixation

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

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

2. Déshydratation

La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine. Une fois le fixateur éliminé par un rinçage à l'eau distillée, on passe à la déshydratation dans un automate qui immerge successivement les pièces dans :

07 bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 90%, 95%, 100%).

03 bains de Xylène.

02 bains de paraffine chauffée à 70 C°.

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

3. Inclusion

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

4. Réalisation des blocs

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

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

5. Confection des coupes

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

6. Coloration

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

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

La coloration suit les étapes suivantes :

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

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



Fixation dans le Bouin



Coupe transversale



Cassette



Circulateur



Appareil à inclusion



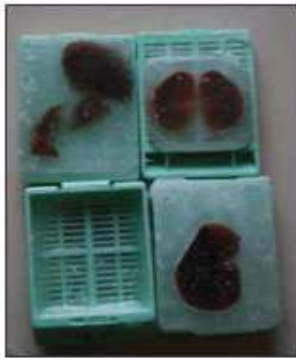
Moule Leukart



Réalisation d'un bloc



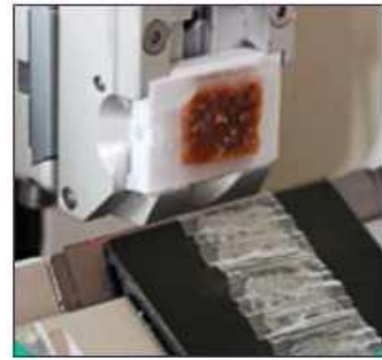
Plaque réfrigérée



Solidification du bloc



Dégrossir un bloc



Réalisation d'un ruban



Lames sur plaque chauffante



Bacs de coloration



Lame colorée

Figure 29 : Le protocole des techniques histologiques

6. Etude statistique

La saisie des données et l'exploitation statistique ont été réalisées par le logiciel SPSS version 18, les paramètres quantitatifs et qualitatifs sont respectivement exprimés en moyenne \pm écart type et en pourcentage (%).

Les différences sont considérées comme significatives comparativement au témoin lorsque : * $P \leq 0,05$, très significative ; ** $P \leq 0,01$, hautement significative et *** $P \leq 0,001$ (Test ANOVA).

Calcul de coefficient de détermination R^2 qui est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire

La détermination de covariance (positive ou négative).

CHAPITRE V

Résultats et Discussion

I. Résultats

1. Effet de l'EGME sur les lapines gravides

Article : L'effet Adverse de L'éthylène Glycol Monométhyl Éther (EGME) sur la Reproduction chez les Lapines de Race Locale Algérienne: Étude Biochimique et Hématologique (Annexe II).

1.1 Effet sur le poids corporels

Le traitement des lapines gravides pendant 32 jours par la dose 50 ppm d'EGME a entraîné une diminution pondérale non significative ($p=0,12$) en comparaison avec les lapines témoins, elles n'ont pas présenté des changements importants et ont continué de prendre du poids, manger éventuellement davantage et leur comportement n'a pas changé non plus. Par contre, elles ont présenté un fort taux de réceptivité (acceptation du mâle pour l'accouplement). En revanche, les lapines traitées par les doses 100 et 150 ppm ont présentées une diminution très significative ($p < 0,01$) et remarquable du poids corporel après seulement deux jours de traitement accompagné par la réduction de la prise alimentaire et hydrique par rapport aux lapines témoins.

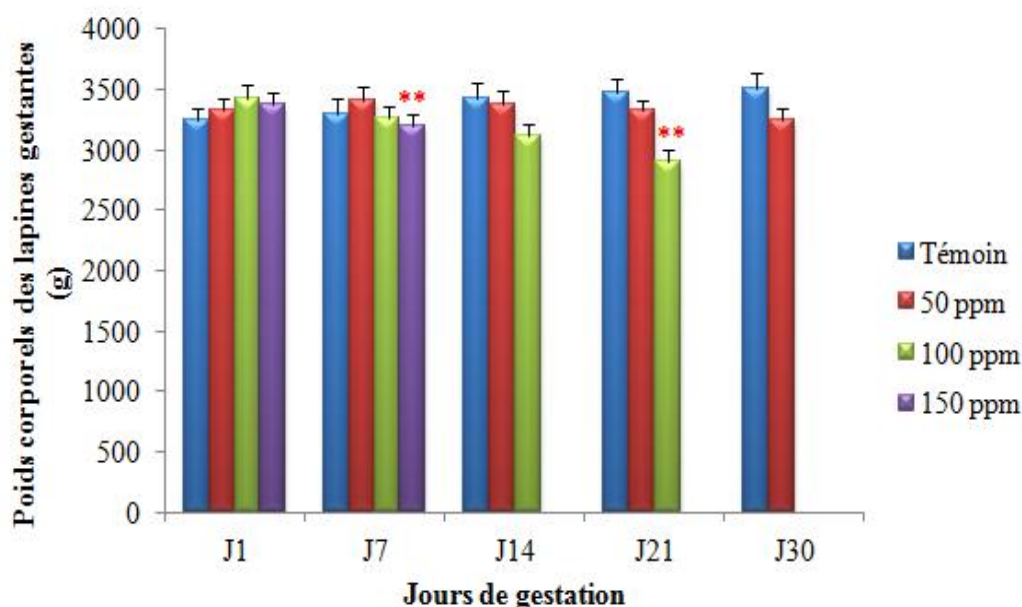


Figure 30 : Effet de l'EGME sur le poids corporel des lapines gestantes (g)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

I.2 Effet de l'EGME sur la survenue de l'avortement

Le deuxième signe toxique de l'EGME est la perte précoce de gestation ou ce qu'on appelle l'avortement spontané précoce qui est survenu aux alentours de J7 à J9 chez toutes les lapines traitées par la forte dose 150 ppm entraînant une embryotoxicité (figure 31).

La résorption fœtale se manifeste par un avortement plus tardif autour de J17 à J 19 chez les lapines traitées par la dose 100 ppm par rapport au groupe de 150 ppm. Ces observations indiquent un effet dose dépendant. Nous avons mentionné également une apparition des saignements hémorragiques quelques jours précédant l'avortement (figures 32, 33).

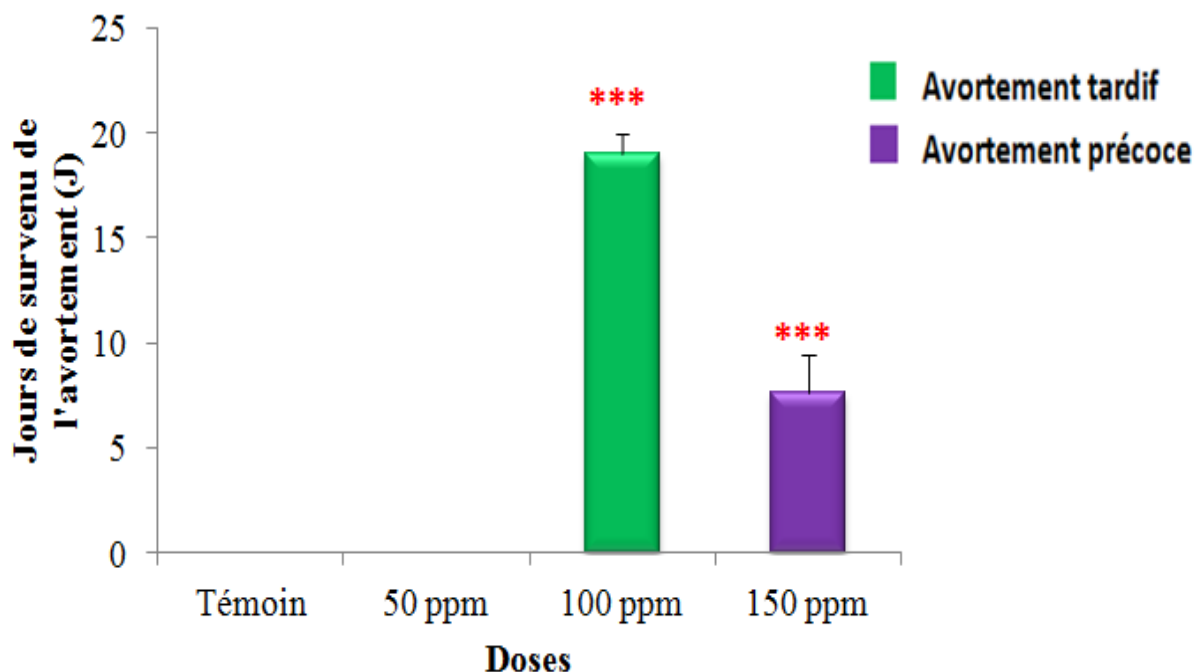


Figure 31 : Effet de l'EGME sur la survenue de l'avortement (j)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).



Figure 32 : Observation du début des saignements hémorragiques chez les lapines traitées par la forte dose d'EGME.



Figure 33 : Les traces d'avortement spontané chez les lapines exposées à la forte dose d'EGME

1.3 La mortalité des lapines causée par l'EGME

Deux jours après l'avortement précoce ou tardif, nous avons enregistré une mortalité chez toutes les lapines exposées à de fortes doses d'EGME, ce phénomène est très significativement dose dépendante ($p < 0,01$) (figure 34).

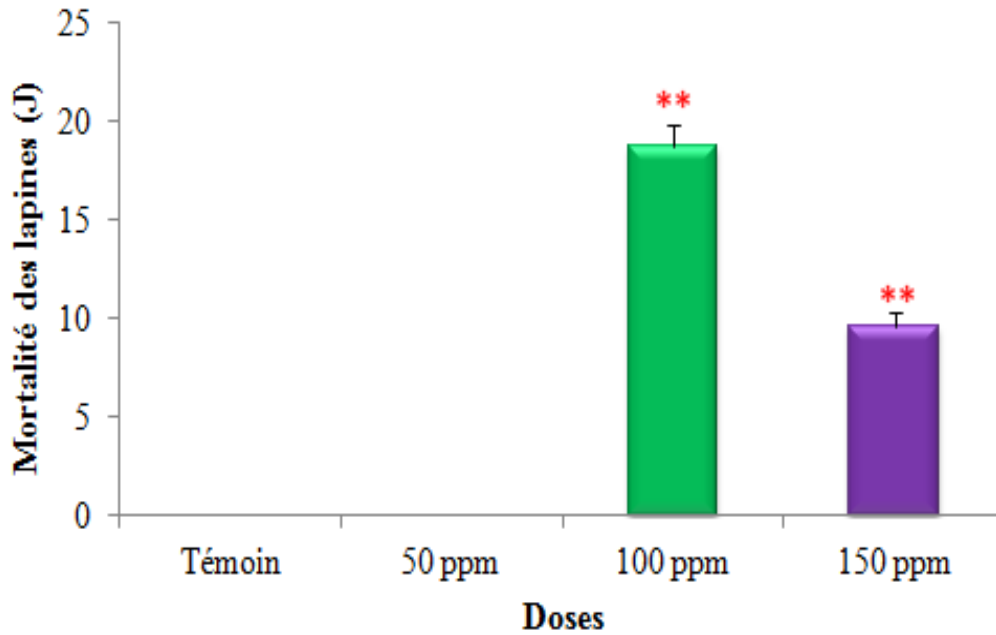


Figure 34 : Mortalité des lapines après de l'avortement spontané (j)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).



Figure 35 : Observation d'une lapine décédée après un avortement

La dissection des lapines décédées suite à un avortement spontané précoce ou tardif nous a permis de constater un aspect hémorragique utérin avec la présence de fœtus morts *in utero* dans les deux cornes utérines chez presque 20% des lapines. De même, la présence des ulcères et des hémorragies gastriques graves a été également signalée chez ces lapines (figures 36- 37).



Figure 36 : observation de fœtus morts *in utéro* dans les deux cornes utérines des lapines qui ont fait un avortement partiel



Figure 37 : Présence d'hémorragie digestive grave chez les lapines décédées suite à un avortement

1.4 Durée de gestation

La gestation chez la lapine dure en moyenne 31-32 jours, avec une variation observée selon la race pouvant aller de 29 à 34 jours. En dessous de 29 jours, les lapereaux ne sont en général pas viables et au dessus de 33 jours ils sont souvent mort-nés (Chavatte *et al.*, 2005)..

Les résultats de notre étude démontrent un prolongement significatif ($P < 0,05$) de la durée (plus 5 jours) de gestation (35j) chez le groupe 50 ppm par rapport aux témoins (J30). Ces derniers, ont fait leur mise bas dans la boîte à nid et à la date habituelle (figure 38).

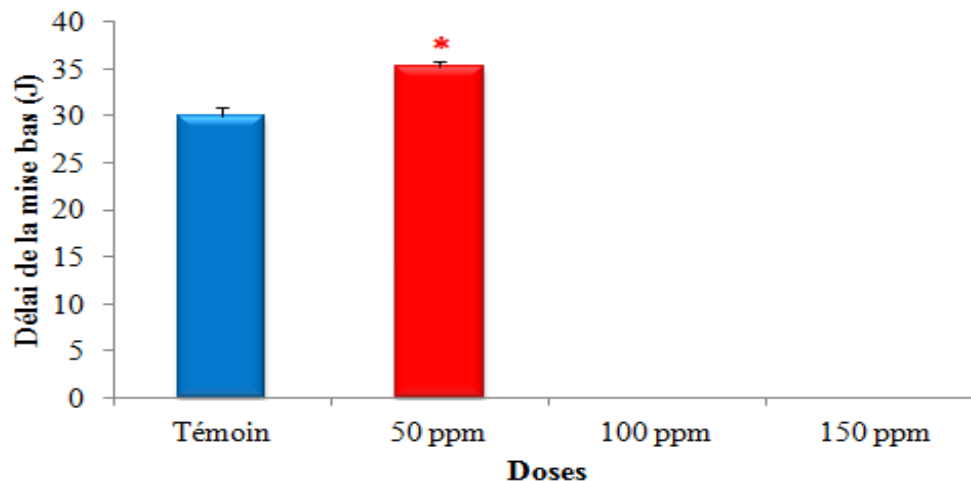


Figure 38 : Délai de la mise bas (J) chez les lapines témoins et celles traitées par l'EGME

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque (* $P \leq 0,05$), très significative (** $P \leq 0,01$), hautement significative (***) $P \leq 0,001$).

1.5 Effet d'EGME sur les poids fœtaux

Les lapereaux morts nés sont pesés dès la naissance, les résultats ont révélé une hypotrophie très significative de leur poids corporels ($p < 0.01$) par rapport au groupe témoin ce qui confirme la fœtotoxicité causée par l'EGME (figure 39). Ceci était le point commun observé dans de nombreux travaux portant sur des animaux de laboratoire.

Par ailleurs, nous avons noté l'absence de comportement de construction de nid chez les lapines traitées par la dose 50 ppm qui ont fait leur mise bas directement à l'intérieur des cages (figure 40).

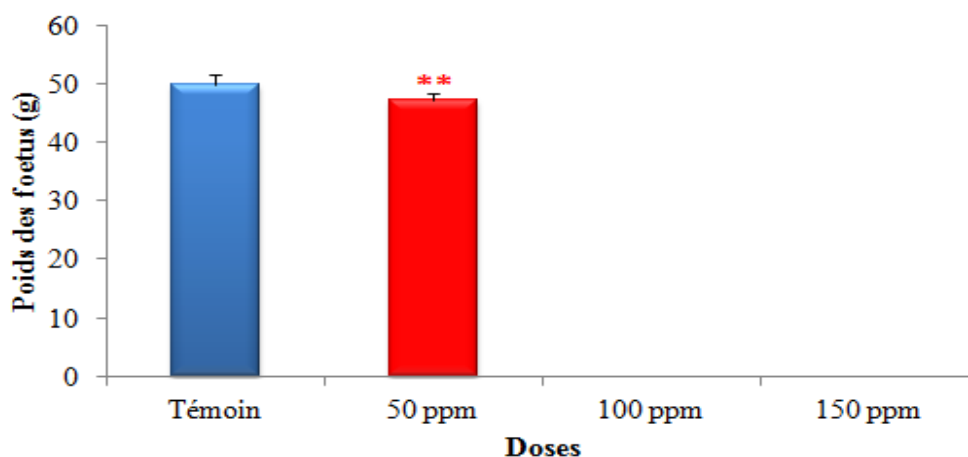


Figure 39 : Evaluation du poids corporel des fœtus après la mise bas

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque (* $P \leq 0,05$), très significative (** $P \leq 0,01$), hautement significative (***) $P \leq 0,001$).



Figure 40 : Naissance de lapereaux morts nés issus des lapines traitées par 50 ppm d'EGME.

1.6. Effet de l'EGME sur les paramètres biochimiques du sang

Les résultats des analyses biochimiques montrent une augmentation très significative d'ALAT, d'ASAT, de créatinine, d'urée et des triglycérides, à l'opposé, une diminution très significative de glucose et de cholestérol a été détectée chez les groupes exposés à l'EGME par rapport aux témoins ($p < 0,01$).

1.6.1. Dosage de glucose plasmatique

Le dosage de la glycémie nous a permis d'enregistrer une diminution significative de taux de glucose chez le groupe traité par la faible dose 50 ppm d'EGME ($P \leq 0,05$), cette baisse du glucose est observée chez la femelle juste avant la mise bas. Cette constatation a été notée chez toutes les lapines gestantes. Par ailleurs, cette chute du taux de glucose est hautement significative chez les groupes traités par les fortes doses 100 et 150 ppm (figure 41)

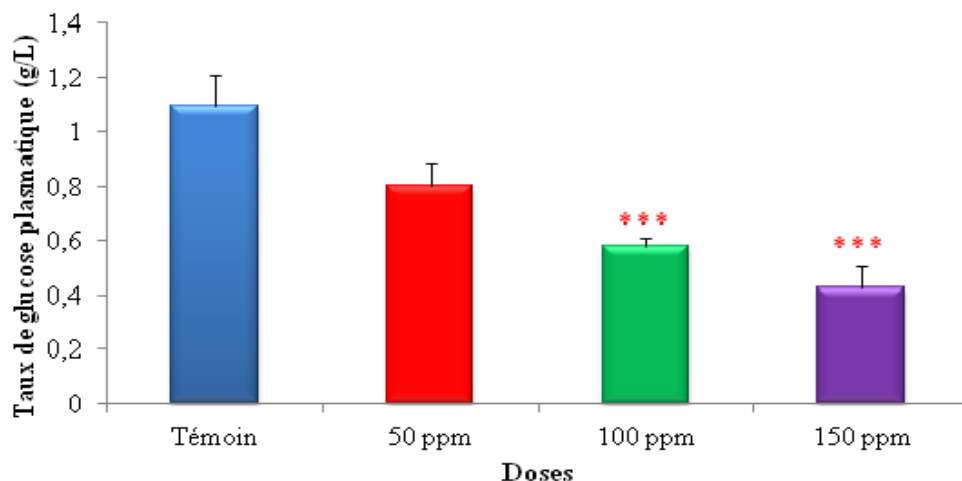


Figure 41: Evaluation du taux plasmatique de glucose (g/L) chez lapines exposées à l'EGME

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.6.2. Dosage de cholestérol plasmatique

Les résultats du dosage du cholestérol plasmatique chez les lapines gravides traitées par l'EGME comparativement aux témoins montrent une diminution très significative du taux du cholestérol chez tous les groupes traités, cette réduction est notamment hautement significative après une exposition à une forte dose 150 ppm (figures 42).

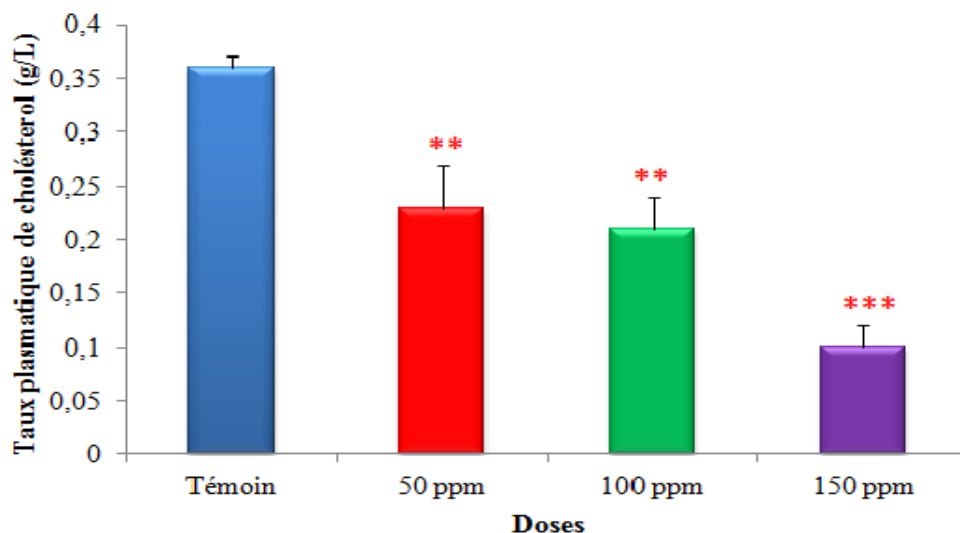


Figure 42 : Evaluation de taux plasmatique du cholestérol (g/L) après l'exposition à l'EGME

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.6.3. Dosage des triglycérides plasmatiques

Les résultats obtenus révèlent qu'il existe une augmentation statistiquement significative et très significative et hautement significative respectivement dans le taux des triglycérides chez les groupes traités comparativement aux témoins (figure 43).

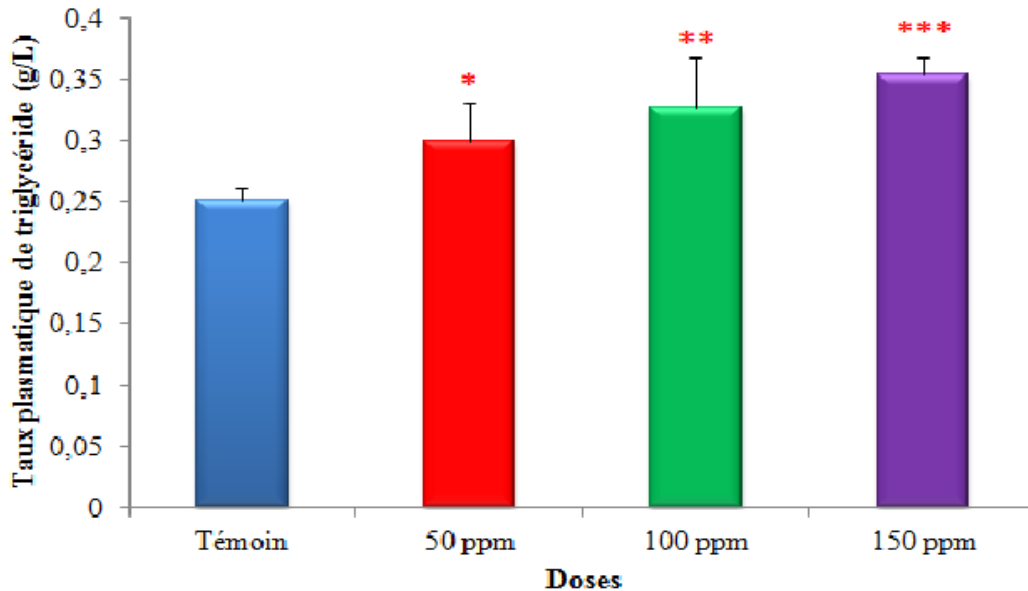


Figure 43 : Evaluation de taux plasmatique des triglycérides (g/L) après traitement à l'EGME
*Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).*

1.6.4. Evaluation de taux des protéines totales plasmatiques

La concentration sérique des protéines totales chez les lapines gestantes présente une augmentation très hautement significative (0,001) chez les groupes traités par les différentes doses de l'EGME par rapport aux témoins (figure 44).

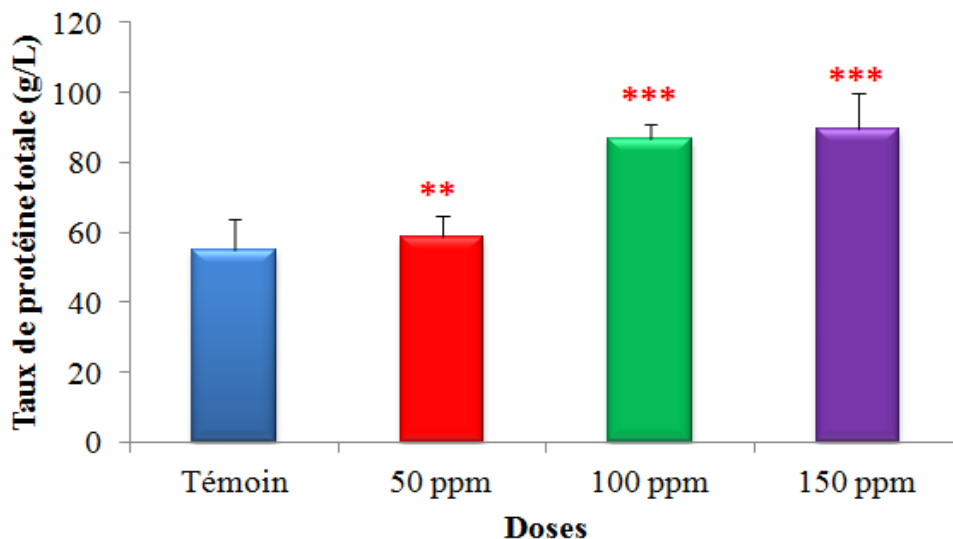


Figure 44 : Evaluation de taux plasmatique des protéines totales (g/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.6.4. Taux sérique d'Aspartate-Aminotransférase (ASAT/TGO)

Les substances dosées en clinique et qui permettent d'apprécier l'existence et l'intensité de la cytolyse hépatique sont les transaminases : ALAT et ASAT.

Le dosage d'ASAT a montré une augmentation hautement significative de façon dose dépendante et progressive chez les lapines fortement exposées à l'EGME (figure 45).

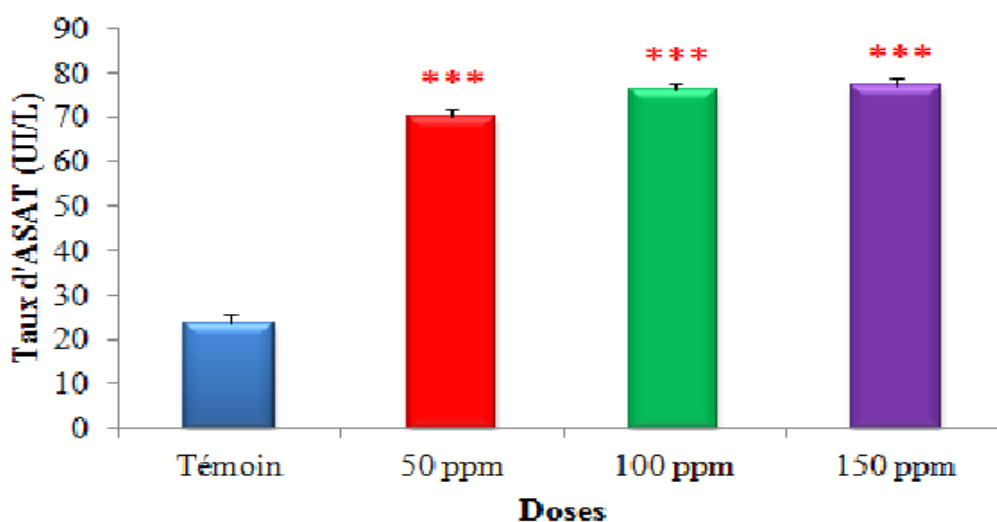


Figure 45 : Evaluation de taux plasmatique d'ASAT (UI/L) après traitement à l'EGME

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.6.5. Taux sérique de l'Alanine-Aminotransférase (ALAT/GPT)

Nous avons enregistré une augmentation hautement significative de taux d'ALAT dans les groupes traités par rapport aux témoins ce qui confirme la destruction des hépatocytes (figure 46).

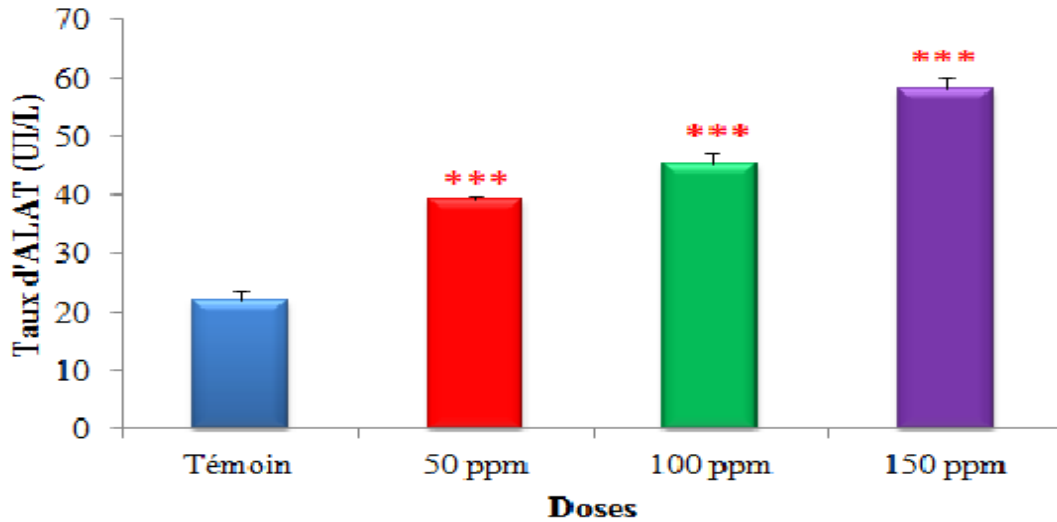


Figure 46 : Evaluation de taux plasmatique d'ALAT (UI/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.6.6. Taux plasmatique de la créatinine plasmatique

L'analyse de taux de la créatinine chez les lapines gestantes exposées aux différentes doses d'EGME montre qu'il y a une augmentation progressive très significative ($p < 0,01$) et hautement significative ($p < 0,001$), elle est deux fois plus élevée chez les lapines exposées à la faible dose comparativement aux témoins (6,23 mg/L vs 12,6 mg/L). Cette augmentation est encore plus accentuée avec l'exposition aux fortes doses (6,23 mg/L vs 16,88 mg/L, 23,3 mg/L) (figure 47).

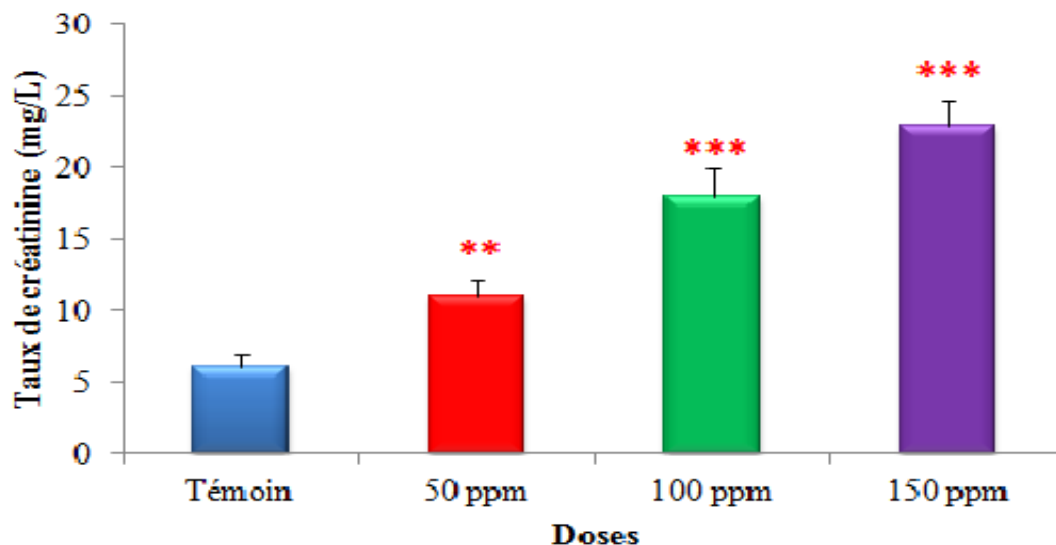


Figure 47: Evaluation de taux plasmatique de créatinine (mg/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.6.7. Taux plasmatique de l'urée plasmatique

La même constatation a été enregistrée pour le dosage de l'urée dont la valeur moyenne des témoins est de 0,23 g/L. En effet, nous avons enregistré une augmentation très significative de taux de l'urée par rapport aux témoins ($p < 0,01$) (0,2 VS 0,35 g/L)

Ce taux est presque deux à trois fois plus élevés chez lapines exposées à différentes doses 50, 100 et 150 ppm respectivement (0,23 g/L vs 0,35 g/L, 0,41 g/L et 0,47 g/L) (figure 48).

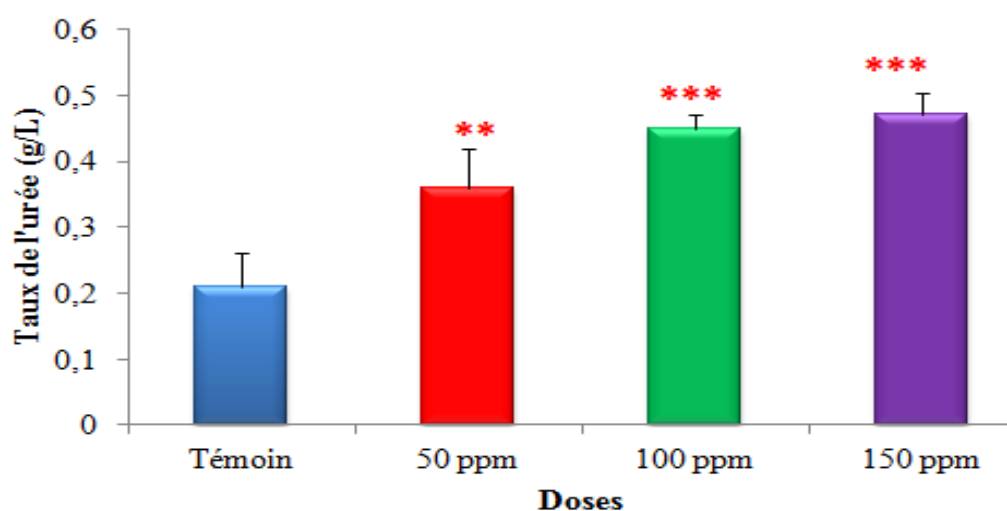


Figure 48: Evaluation de taux plasmatique de l'urée (g/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

1.7. Effet sur les paramètres hématologiques

Quant à l'analyse de l'hémoграмme chez les lapines gestantes, une diminution très significative et hautement significative du nombre des cellules sanguines : (GR), (GB) et (PL) a été révélée respectivement chez les groupes exposés à de forte doses ($p < 0,01$; $p < 0,001$)

Concernant le dosage de l'hémoglobine (Hb), le groupe de 150 ppm objective une diminution statistiquement très significative de ce dernier ($p < 0,01$) (Tableau 18).

Tableau 18 : Evaluation des paramètres sanguins chez les lapines

Paramètres	Témoin	50 ppm	100 ppm	150 ppm
GR (10^6 /L)	5,5±1,12	4,52±1,10	3,63±0,10*	3,40±0,21*
GB (10^9 /L)	10,42±0,23	7,84±0,13	4,80±0,08**	3,30±0,15**
Hb (g/dL)	15,88±0,12	9,24±0,15*	8,33±0,18*	5,80±0,30**
PL (10^3 /L)	463±19,00	352±35,01	139±15,02**	57±3,90***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, Les différences : significatives lorsque ($P \leq 0,05$), très significative (** $P \leq 0,01$), hautement significative (***) $P \leq 0,001$).*

2. Effet de l'EGME sur les lapines non gravides

2.1 Effet de l'EGME sur le poids corporels

Les résultats de l'analyse du poids corporel des lapines non gravides ont mis en évidence une réduction considérable de poids chez les groupes traités à l'EGME en comparaison avec le groupe témoin ($p < 0,05$)

Toutes les lapines exposées à l'EGME étaient dans l'état d'anœstrus (absence de l'œstrus) accompagnées par une forte diarrhée ce qui explique cette perte pondérale (figure 49).

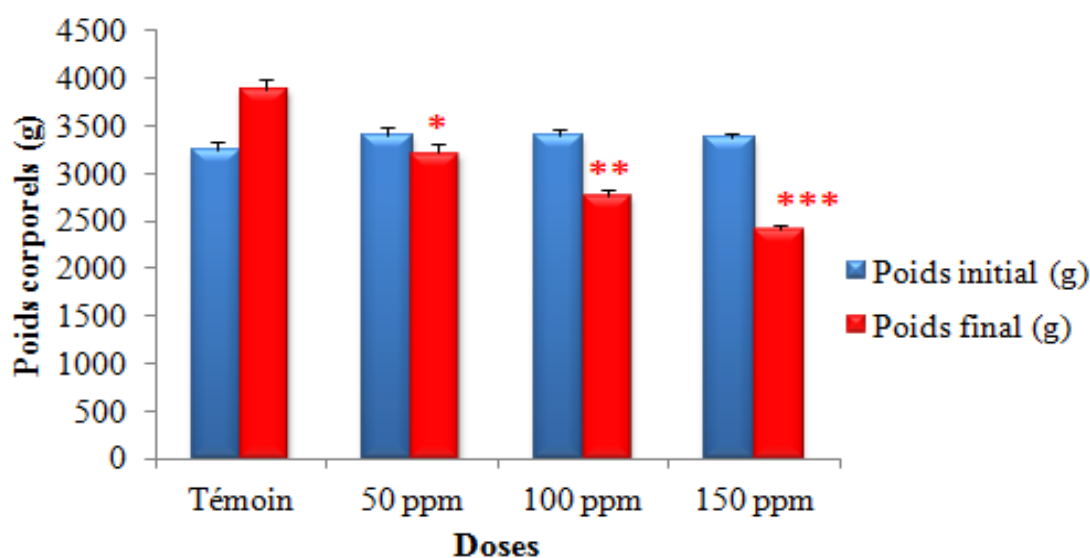


Figure 49 : Effet de l'EGME sur le poids corporel des lapines non gravides (g)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.2 Effet de l'EGME sur les poids hépatiques

L'évaluation de la variation de poids hépatique chez les lapines non gravides traitées par les trois doses d'EGME est indiquée dans la figure 50. Une augmentation très significative et hautement significative ($p \leq 0,01$), ($p \leq 0,001$) est objectivée chez les groupes traités par les différentes doses d'EGME respectivement.

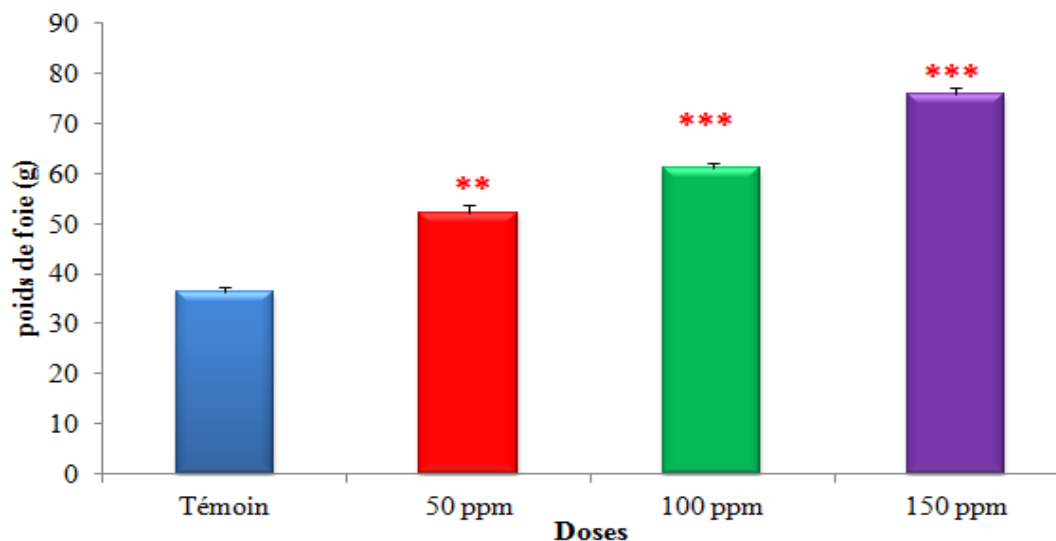


Figure 50: Effet de l'EGME sur le poids hépatique (g)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.3 Effet de l'EGME sur le poids des ovaires

Concernant les résultats de la mesure de poids des ovaires, une diminution significative ($P < 0,05$) a été révélée chez le groupe traité à la dose de 50 ppm d'EGME par rapport au groupe témoin. L'analyse montre aussi qu'en présence d'une dose élevée (100 ,150 ppm) le poids des ovaires diminue d'une manière hautement significative ($P < 0,01$) toujours par rapport au groupe témoin (figure 51).

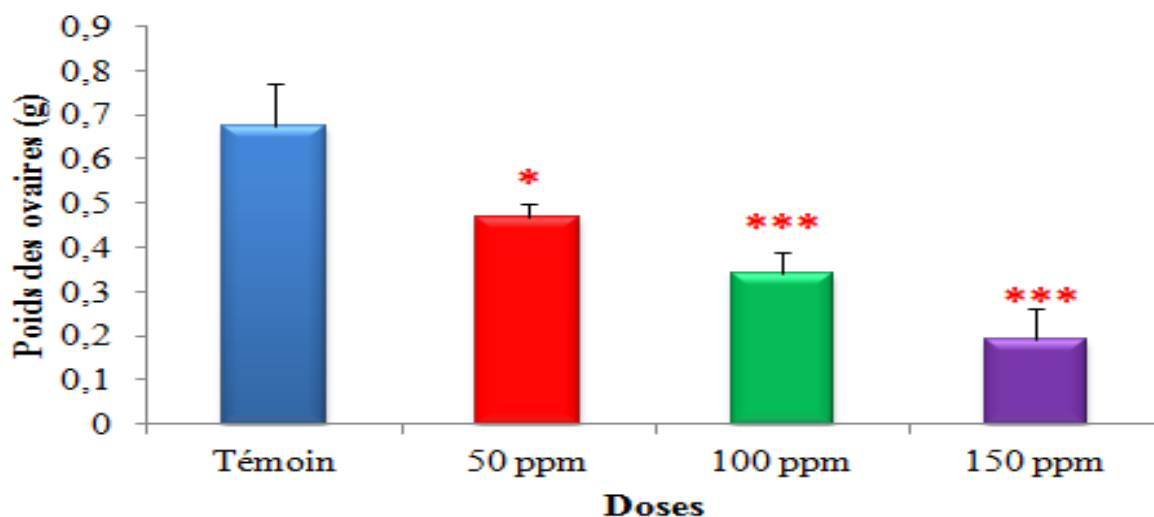


Figure 51 : Effet de l'EGME sur le poids ovarien (g)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.4. Effets sur le taux du glutathion (GSH) :

2.4.1 Evaluation du taux du glutathion hépatique

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une réduction significative ($p < 0.05$) et très significative ($p < 0.01$) du taux de glutathion dans le foie chez les groupes traités par différentes doses d'EGME comparativement aux témoins (62,4 nmol/mg vs 55,4 nmol/mg, 47,26 nmol/mg, 43,1 nmol/mg) respectivement (figure 52).

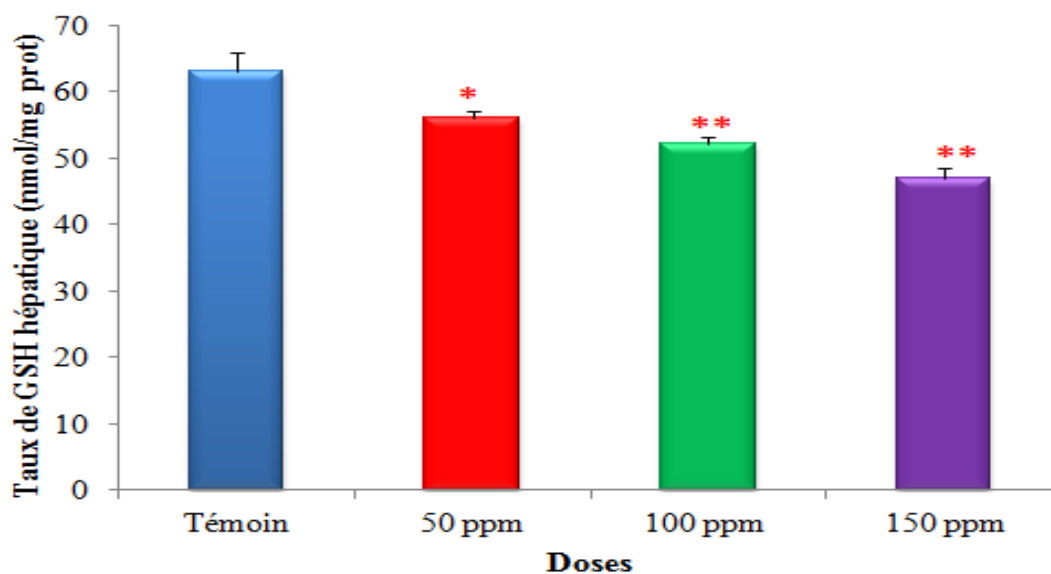


Figure 52 : Evaluation du taux de glutathion hépatique (nmol/mg prot)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.4.2 Evaluation du taux du glutathion dans les ovaires

Le dosage du glutathion dans les ovaires montre qu'il existe une diminution significative chez les lapines exposées à la dose 50 ppm d'EGME ($p < 0.05$) et une diminution très significative ($p < 0.01$) chez les lapines traitées par les dose de ce solvant en comparaison avec les témoins (figure 53)

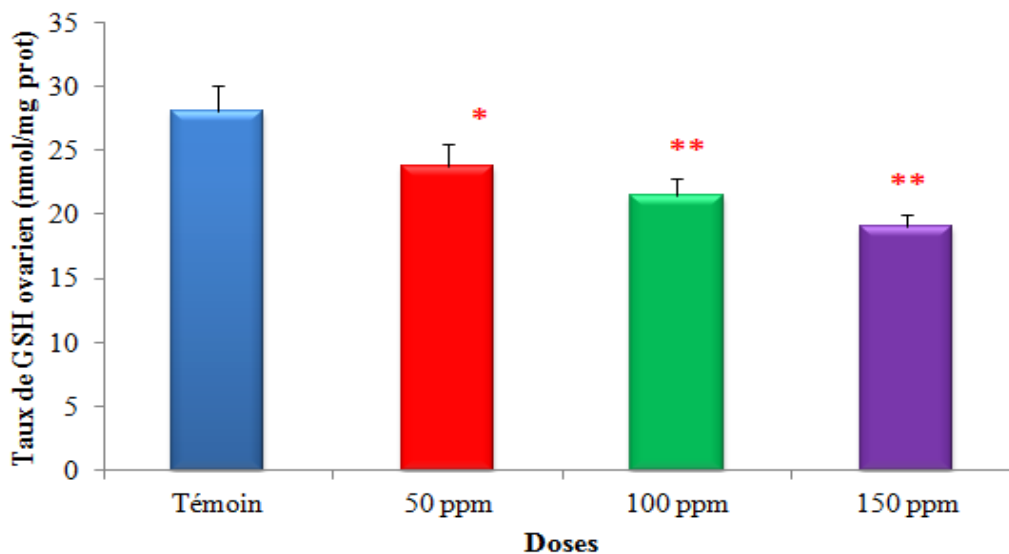


Figure 53: Evaluation du taux de glutathion ovarien (nmol/mg prot)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.5 Effets sur le taux du malondialdéhyde (MDA)

2.5.1 Evaluation du taux du MDA hépatique

Les résultats obtenus montrent une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) et significative du taux de MDA dans le foie chez les lapines exposées aux fortes doses d'EGME par rapport aux témoins (3,46 nmol/g vs 4,11 nmol/g, 4,47nmol/g, 4,89 nmol/g) respectivement (figure 54).

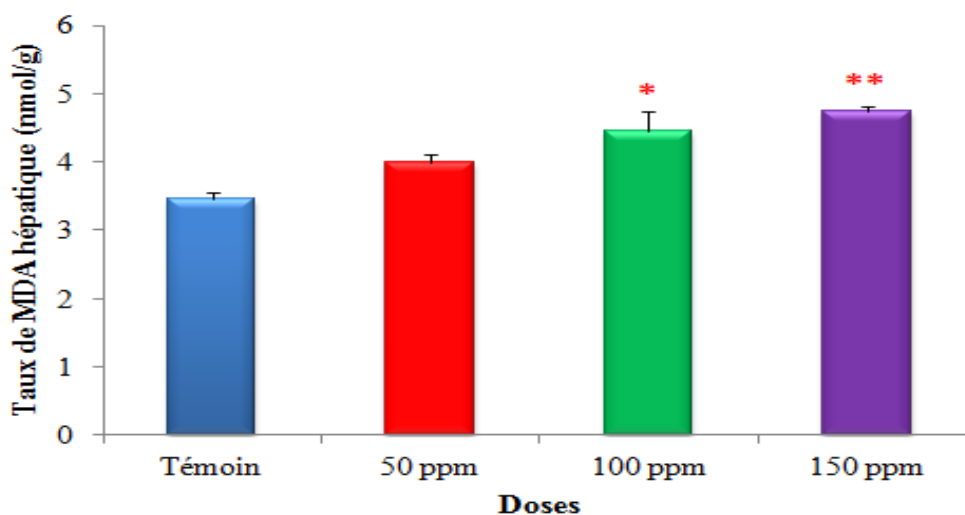


Figure 54 : Evaluation du taux de MDA dans le foie (nmol/g)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.5.2 Evaluation du taux du MDA dans les ovaires

Les résultats du dosage du MDA dans les ovaires ont montré une différence significative chez les lapines traitées par la faible dose d'EGME 50 ppm (2,11 nmol/g vs 3,31 nmol/g). Cette différence est très significative et dose dépendante ($P < 0,01$) dans les groupes traitées par les fortes doses 100 ppm (2,11 nmol/g vs 5,29 nmol/g) et 150 ppm (2,11 nmol/g vs 5,78 nmol/g) (figure 55).

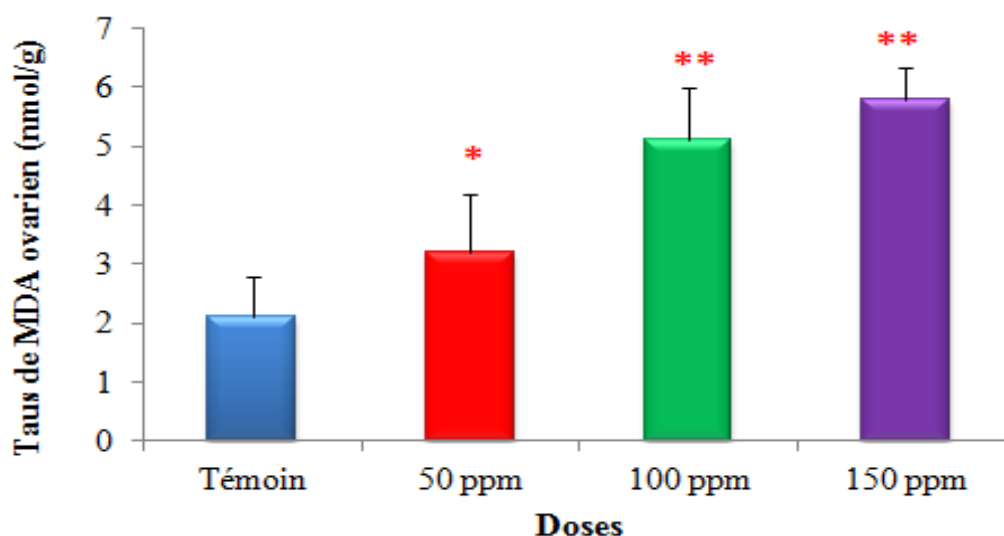


Figure 55: Evaluation du taux de MDA dans les ovaires (nmol/g)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.6 Taux du glutathion peroxydase (GSH-px)

2.6.1 Evaluation de taux de GSH-px hépatique

L'évaluation de l'enzyme antioxydant (GPx) dans le foie montre une diminution significative ($p < 0,05$) chez les lapines exposées à la faible dose du solvant, 50 ppm (0,35 UI/g vs 0,26 UI/g) et très hautement significative ($p < 0,001$) chez les lapines traitées par les fortes doses d'EGME, 100 ppm (0,35 UI/g vs 0,2 UI/g) et 150 ppm (0,35 UI/g vs 0,14 UI/g) en comparaison avec le groupe témoin (figure 56).

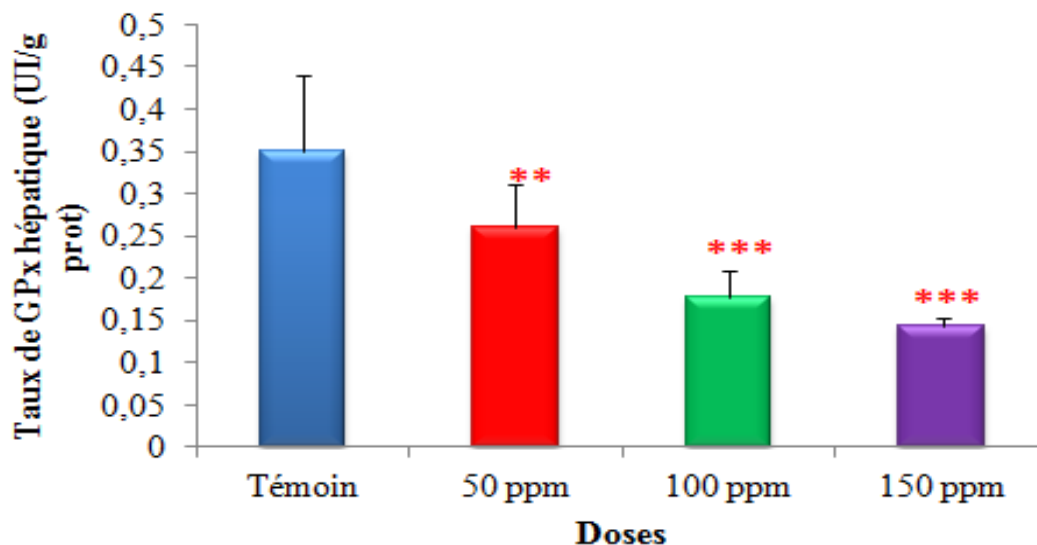
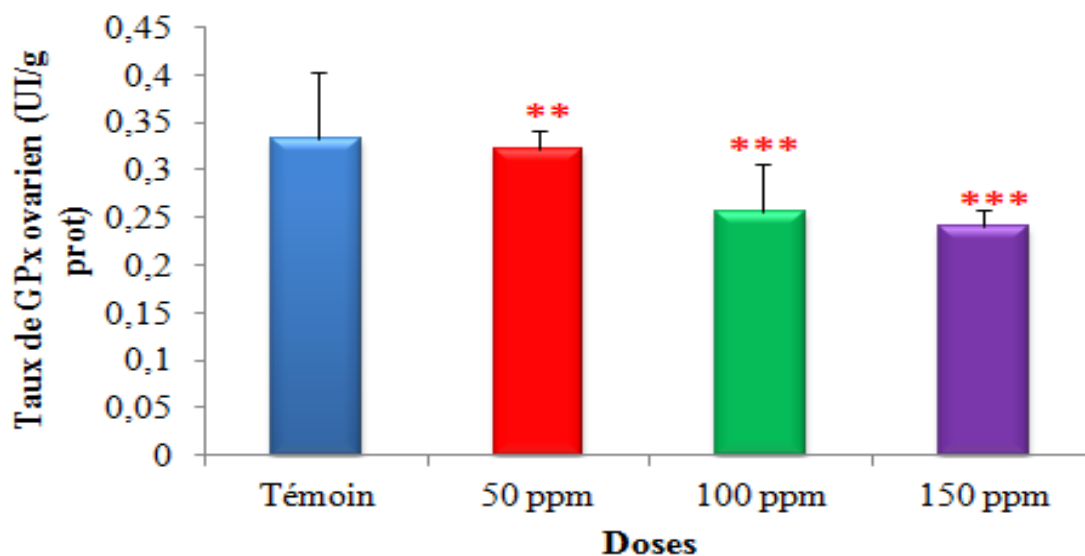


Figure 56 : Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) dans le foie (UI/g prot)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.6.2 Evaluation de taux de GSH-px dans les ovaires

Quant à l'étude du GPx dans les ovaires, cet antioxydant montre une diminution très significative ($P < 0,01$) et hautement significative du taux de GSH-px chez les lapines traitées par les trois doses croissantes de l'EGME par rapport au groupe témoin (figure 57).



Figures 57 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) dans les ovaires (UI/g prot)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7. Effet sur les paramètres biochimiques du sang

Les résultats des analyses biochimiques montrent une augmentation très significative d'ALAT, d'ASAT, de créatinine et d'urée ($p < 0,01$) et une augmentation significative des triglycérides ($p < 0,05$) chez les groupes traités par rapport aux témoins avec une augmentation hautement significative de glucose et de cholestérol ($p < 0,01$).

2.7.2. Dosage de glucose plasmatique

Contrairement, aux résultats obtenus chez les lapines gravides, le dosage de glucose plasmatique montre une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de la glycémie chez les lapines non gestantes exposées à des fortes doses d'EGME (100 et 150 ppm) comparativement aux témoins (figure 58).

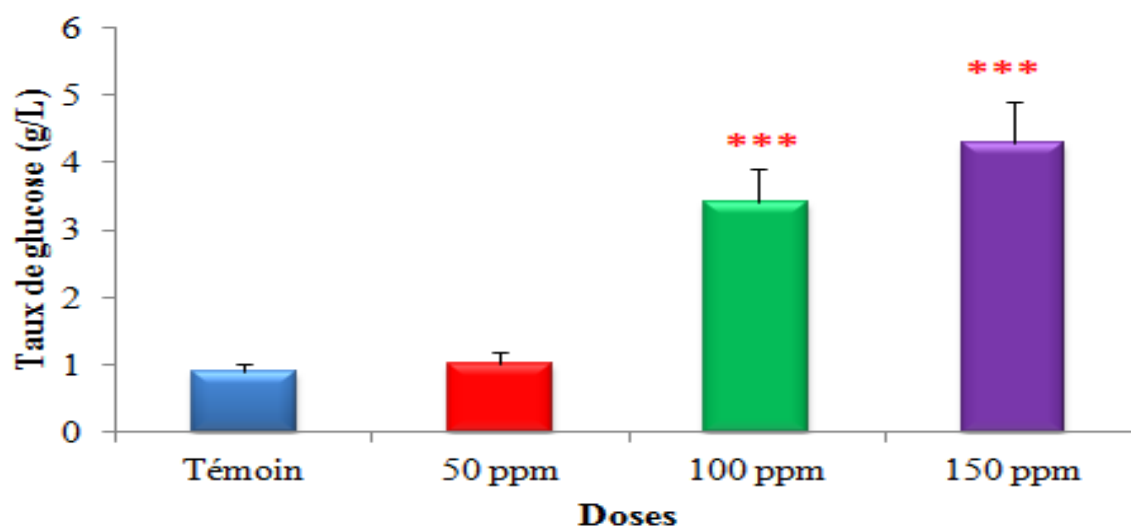


Figure 58: Evaluation du Taux de glucose plasmatique (g/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.3. Dosage de cholestérol plasmatique

Les résultats présentés dans la figure 59 montrent une diminution progressive et hautement significative dans le taux du cholestérol chez toutes les lapines non gravides traitées par l'EGME comparativement aux témoins, c'est le cas par rapport aux lapines gravides exposées aux mêmes doses d'EGME.

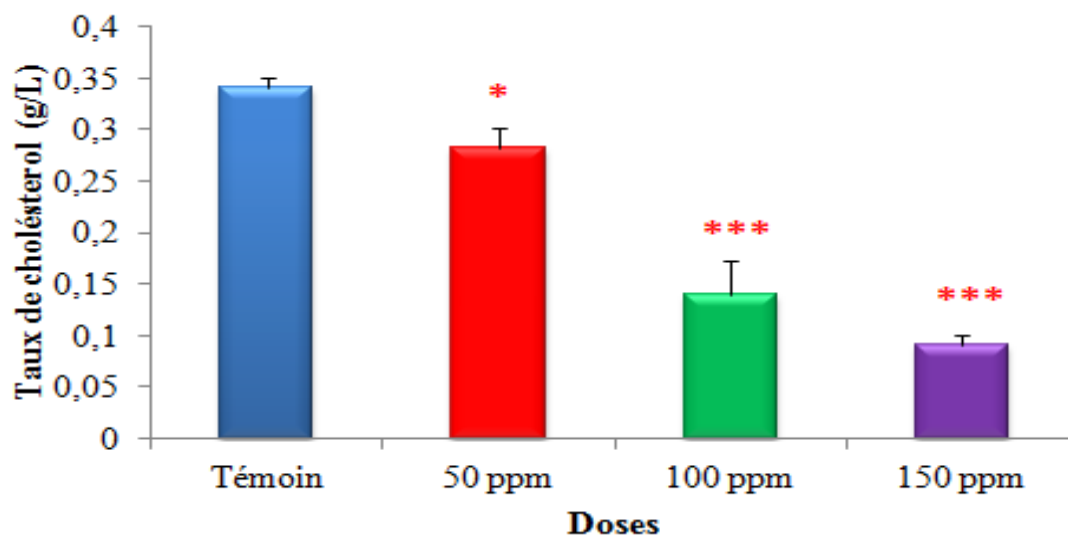


Figure 59: Taux plasmatique du cholestérol (g/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.4. Dosage des triglycérides plasmatiques

Les résultats obtenus révèlent qu'il existe une augmentation significative ($p < 0,05$) dans le taux des triglycérides chez les groupes traités en comparaison aux témoins (figure 60), cette augmentation est semblable à celle obtenue chez les lapines gravides.

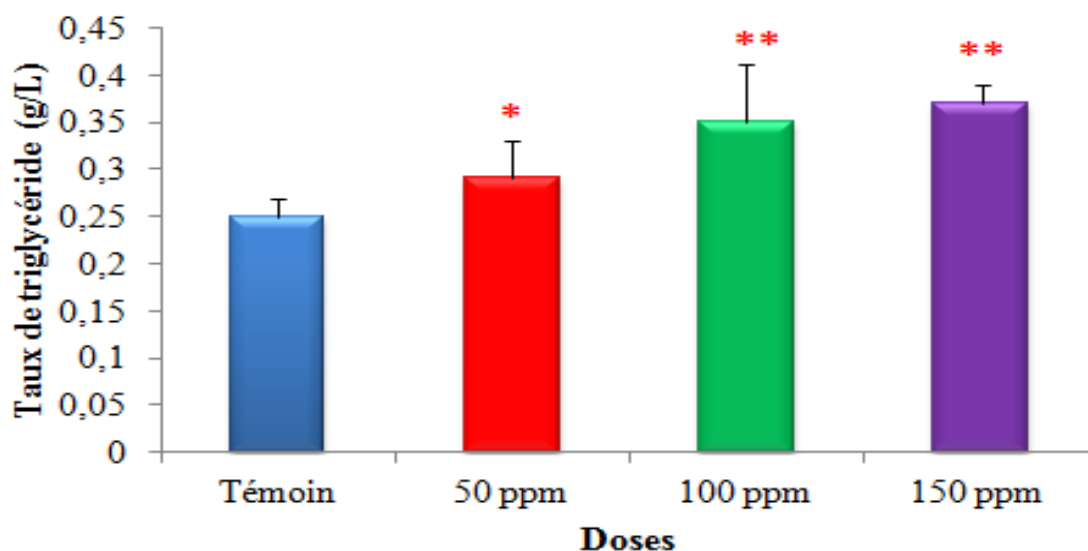


Figure 60: Taux plasmatique des triglycérides (g/L).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.5. Evaluation de taux des protéines totales plasmatiques

Après le dosage des protéines totales chez les lapines non gestantes, nous avons mentionné une augmentation hautement significative (0,001) chez les tous groupes traités à l'EGME par rapport aux témoins (figure 61).

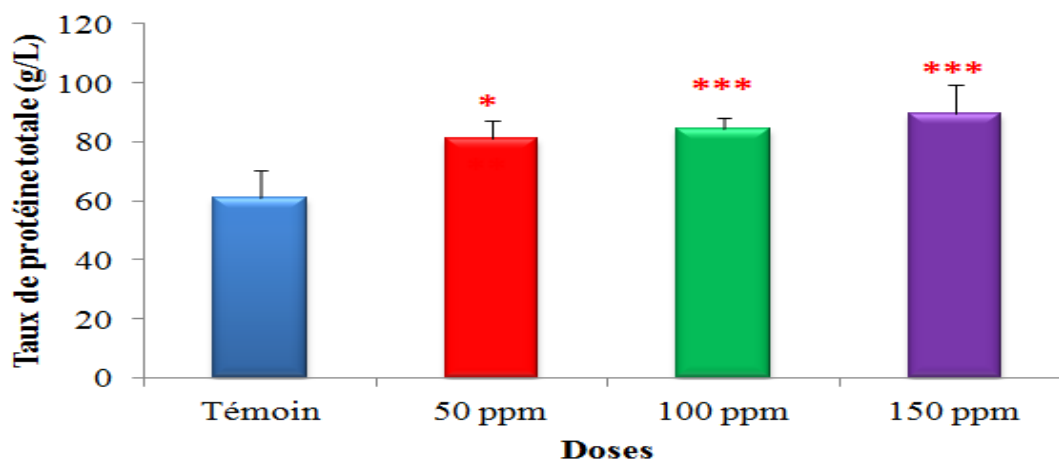


Figure 61: Taux plasmatique des protéines totales (g/L).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.5. Dosage de taux sérique d'Aspartate-Aminotransférase (ASAT/TGO)

Les résultats obtenus révèlent une augmentation hautement significative d'ASAT chez les lapines non gravides traitées en comparaison avec les témoins (22,15 VS 41,8 UI/L), (22,15 VS 80,8 UI/L) et (22,15 VS 93,13 UI/L) respectivement (figure 62). La même observation a été mentionnée chez les lapines gravides.

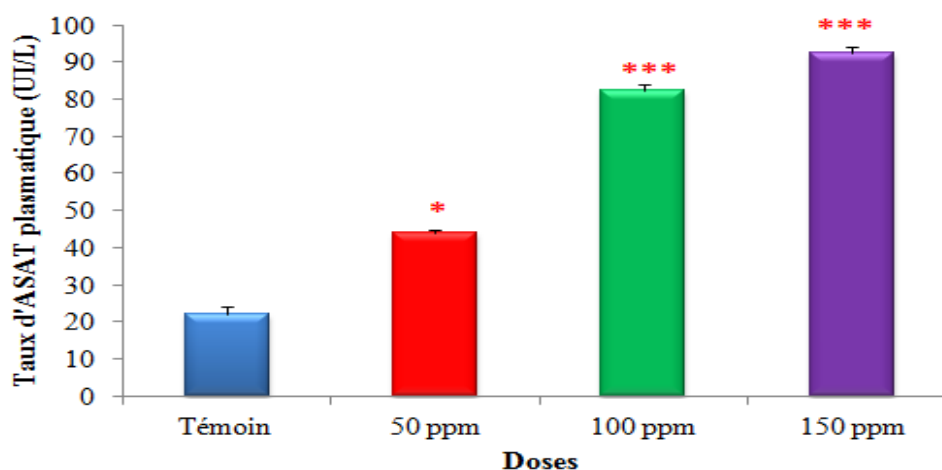


Figure 62: Evaluation de taux plasmatique d'ASAT (UI/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.6. Evaluation de taux sérique de l'Alanine-Aminotransférase(ALAT/GPT)

Nous avons enregistré une augmentation très significative et hautement significative du taux d'ASAT dans les groupes traités par rapport au témoin ($p < 0,001$) (42,3 VS 45,7 UI/L), (42,3 VS 53,5 UI/L), (42,3 VS 71,05 UI/L) respectivement (figure 63).

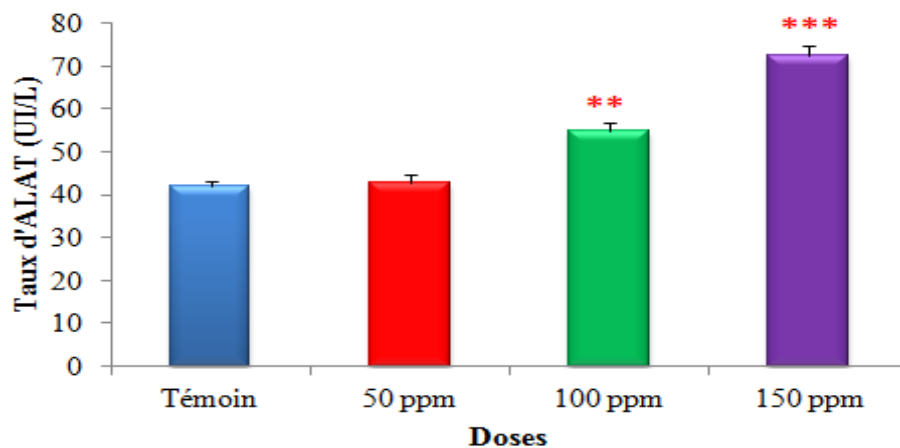


Figure 63: Evaluation de taux plasmatique d'ALAT (UI/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.7. Taux plasmatique de la créatinine

Le dosage biochimique de la créatinine montre une augmentation hautement significative chez les lapines gestantes par rapport aux témoins ($p < 0,001$) (figure 64).

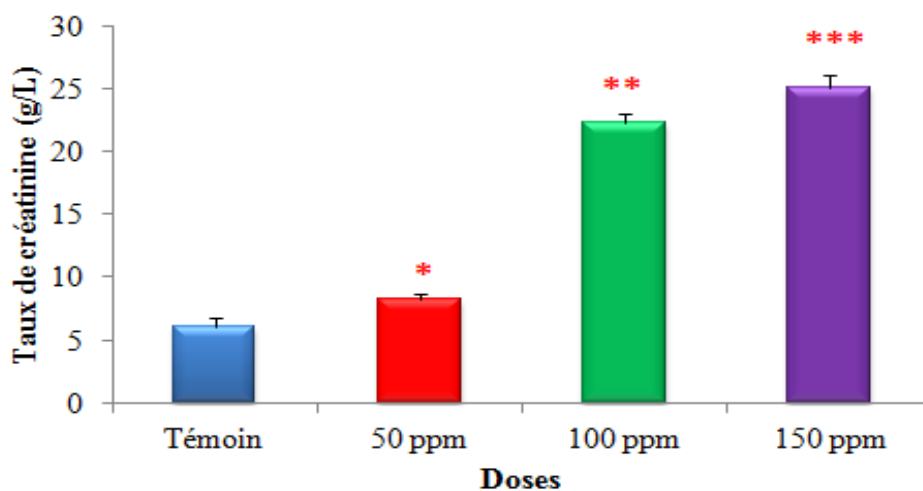


Figure 64: Evaluation de taux plasmatique de créatinine (g/L)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$).

2.7.8. Taux plasmatique de l'urée

Le taux plasmatique de l'urée montre une augmentation hautement significative chez les lapines non gestantes exposées aux de doses fortes de l'EGME par rapport au témoin ($p < 0,001$) figure 65).

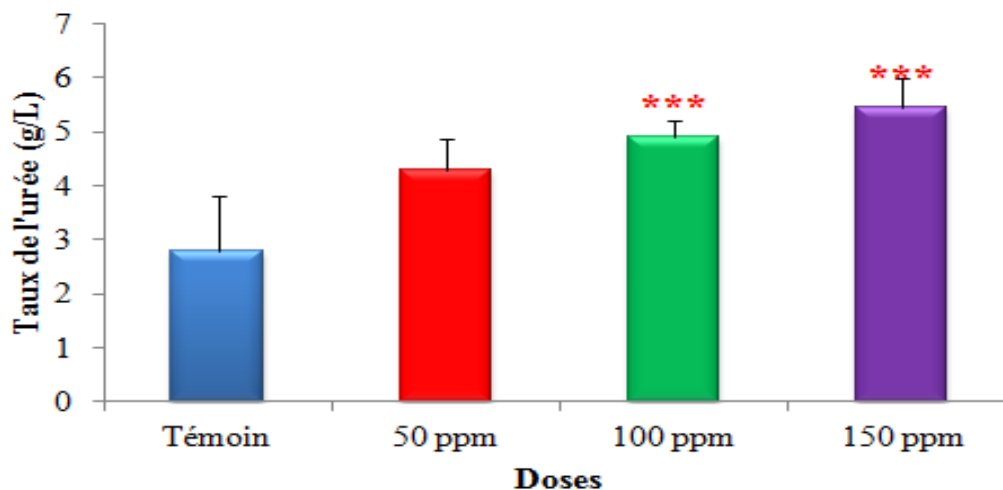


Figure 65: Taux plasmatique de l'urée (g/L) chez les lapines

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, Les différences : significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative ($**P \leq 0,01$), hautement significative ($***P \leq 0,001$)

II.8. Effet sur les paramètres hématologiques

Sur le plan hématologique, les résultats des paramètres de sang mentionnés dans le tableau 19 révèlent une diminution hautement significative des (GR), (Hb) et (GB) dans le groupe traités par la forte dose d'EGME (100 ppm et 150 ppm) ($p < 0,01$), cette variation et dose dépendante.

Tableau 19 : L'évaluation des paramètres sanguins chez les lapines non gravides

Paramètres	Témoin	50 ppm	100 ppm	150 ppm
GR (10⁶/L)	6,514 ± 0,61	6,31 ± 0,53	3,21 ± 0,27*	2,73 ± 0,29***
Hb (g/dL)	17,30 ± 0,10	10,2± 0,80*	8,70±0,20**	8,11±0,22***
GB (10⁹/L)	12,29±0,41	12,738 ± 0,54	12, 22±0,56	12,018 ± 0,64**
PL (10³/L)	432,8±62,4 0	433,6±63,60*	433,8±60,80*	434,4±62,80**

II.9.Résultats de l'étude histologique

1. Etude histologique du foie

L'évaluation histologique du foie chez les animaux témoins et traités par les différentes doses 50, 100 et 150 ppm d'EGME est motionnée dans la figure 66.

L'observation microscopique des coupes histologiques hépatiques chez les lapines non gravides montre une apparence normale des hépatocytes chez les témoins (A) avec un aspect histologique normal chez les lapines traitées par la dose 50 ppm (B)

L'exposition des lapines à la forte dose du solvant (100 ppm) a induit des modifications dégénératives dans le foie. En fait, l'EGME a provoqué une dilatation du parenchyme hépatique (C)

Les observations microscopiques du foie des lapines traitées à l'EGME (C, D) révèlent une modification cellulaire bien visible versus témoin.

En effet, une vacuolisation des hépatocytes ainsi qu'un phénomène de nécrose hépatocytaire étaient également bien mis en évidence dans le groupe traité par les forte doses (C, D).

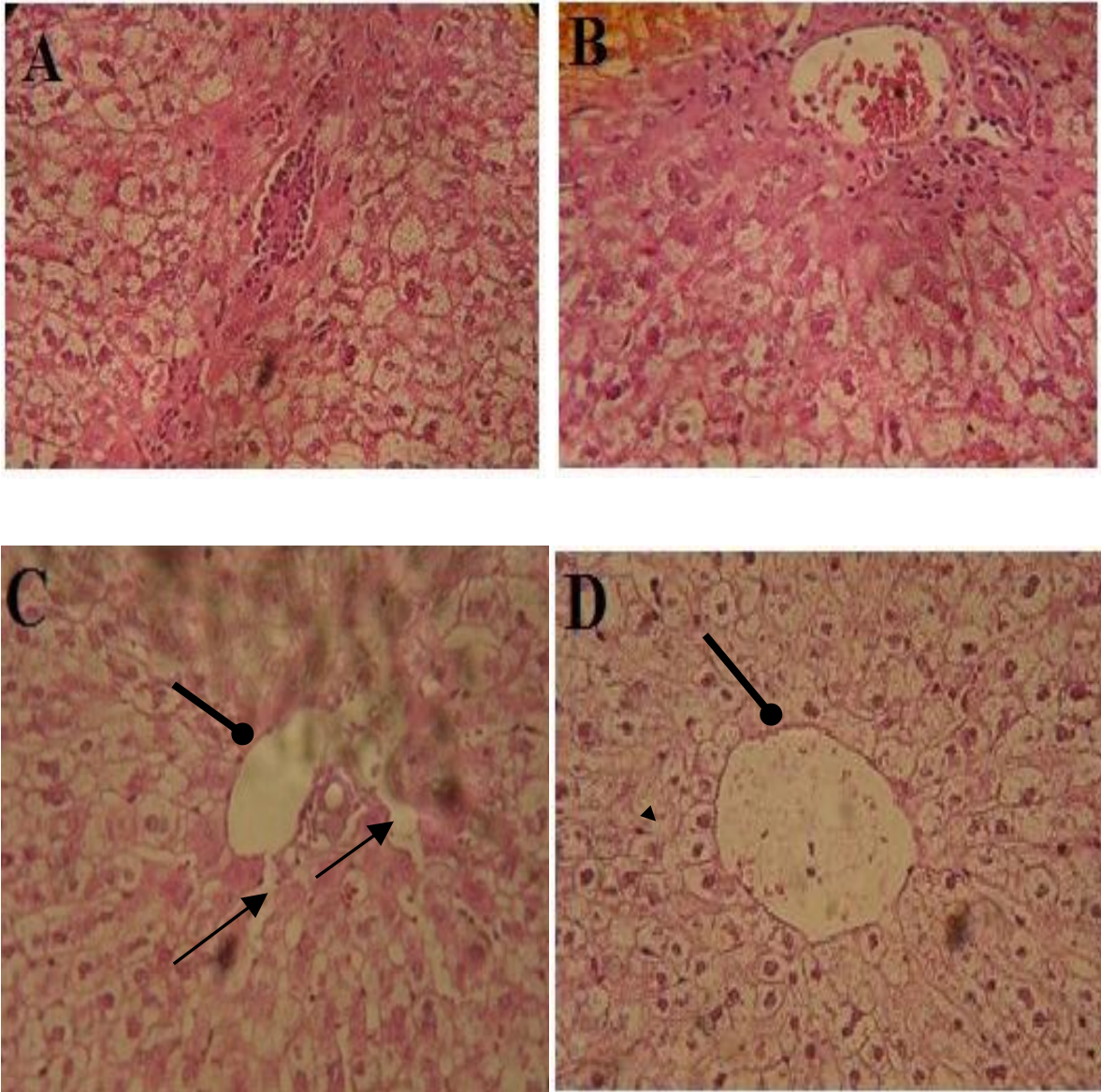


Figure 66: Observations microscopique des coupes histologiques du foie chez les lapines témoin (A) et traitées soit par 50 ppm (B) soit par 100 ppm (C) soit par 150 ppm (D) d'EGME pendant les 4 semaines expérimentales. Les photomicrographies ont été prises à grossissement de X400 suite à une coloration d'hématoxyline et d'éosine. Dans les Figures A et B, aucun changement de signes de lésion hépatique dans le groupe témoin et le groupe traité à n'a été observé. Par contre, dans les figures C et D, une dilatation des parenchymes hépatiques, une fibrose, une superficie accrue de vacuolisation et une lésion tissulaire dans les échantillons ont été notées.

—▶ Dilatation des parenchymes hépatiques —● Nécrose hépatique

Discussion

Les reprotoxiques affectent la fécondité et/ou la fertilité, soit par une toxicité directe pour les gonades ou le système reproducteur, soit en induisant un comportement ne permettant plus la reproduction. Ces produits peuvent dans le cas des perturbateurs endocriniens agir à très faible dose. Ils peuvent parfois aussi agir *in utero* en bloquant le développement normal des organes sexuels ou de glandes les contrôlant, bien avant la naissance de l'individu ; on les dit alors embryotoxiques ou foetotoxiques (Cicollela *et al.*, 2006).

Pendant ces dix dernières années, la diminution de la fertilité féminine en particulier a été l'une des majeures préoccupations de la santé publique. C'est pour cela nous avons tenté, dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact de l'EGME (polluant chimique de la famille des solvants) sur la reproduction des lapines gravides et non gravides de l'espèce locale *Oryctolagus Cuniculus*, le deuxième objectif visait à identifier les effets de ce polluant sur certains paramètres hématologiques et biochimiques.

Les résultats obtenus chez les lapines gravides ont montré une diminution significative des poids corporels des lapines gestantes traitées par l'EGME par rapport aux témoins. Cette diminution est semblable aux observations de Hanley qui démontre que la toxicité maternelle n'a été observée que chez les lapines exposées à 50 ppm EGME.

Dans toutes les études pour lesquelles une toxicité maternelle a été observée, il est toujours noté une restriction de l'alimentation maternelle et/ou une diminution de la prise de poids durant la gestation (Hanley et al, 1984).

La foetotoxicité se traduit par la survenu d'avortement spontané qui a été constatée particulièrement chez les groupes exposés à 100pp et 150 ppm. Elle est plus précoce chez le dernier groupe (première semaine de gestation). Nos résultats rejoignent ceux de Nelson en 1989 qui révélaient une létalité embryonnaire totale chez les groupes de rats exposés à une concentration supérieure ou égale à 73 ppm (Nelson et al, 1989). Une mortalité embryonnaire a été également rapportée dans un groupe de rats exposés à 250 ppm /j, et augmente en fonction des doses d'exposition pour atteindre 100 % à la plus forte dose (500 ppm) (Nagano, 1984).

Dans notre série, nous avons constaté que la mortalité est totale chez toutes les lapines traitées par les fortes doses d'EGME (100 ppm et 150 ppm) suite à un avortement précoce ou tardif..

Nous sommes en accord avec les résultats observés chez Wickramaratne qui a montré que l'exposition à la dose la plus élevée a conduit à la mort de toutes les rates en gestation, l'apparition de signes sévères témoignant d'une forte toxicité maternelle (Wickramaratne, 1986).

Suite à une forte mortalité à la dose la plus élevée (150 ppm), les animaux ont été sacrifiés et l'on a observé chez eux une grande fréquence d'ulcères gastriques, probablement responsable de la mortalité.

Par ailleurs, nos résultats signalent un prolongement dans le délai de gestation chez le groupe 50 ppm, Le prolongement de gestation est dû souvent à la mort fœtale *in utero* qui est vraisemblablement due à l'effet toxique de l'EGME qui est responsable de la fœtotoxicité.

Par ailleurs, nous avons noté l'absence de comportement de construction de nid chez les lapines traitées par la dose 50 ppm qui ont fait leur mise bas directement à l'intérieur des cages

La même observation a été rapportée par Hardin en 1983 chez les rates femelles (Hardin, 1983).

Il a été rapporté que l'EGME et l'EGEE augmentaient le temps de gestation chez la rate et la souris en absence de toxicité maternelle. Marty et Loch-caruso ont testé l'hypothèse que cet effet pourrait être la conséquence d'une inhibition des jonctions communicantes de la musculature lisse du myomètre (Marty et al, 1998).

L'étude de l'évaluation de poids corporels des fœtus montre une diminution très significative ($p < 0.01$) de poids corporel de ces fœtus traités par l'EGME par rapport aux témoins.

Ces résultats sont en corrélation avec les travaux de Cicollela en 2000 et Hardin en 1983 qui ont prouvé que l'embryotoxicité a été également traduite par une réduction du poids corporel des fœtus issus des rates exposées à la dose 100 ppm de l'EGME.

L'EGME est un solvant foetotoxique et tératogène même à des concentrations inférieures à ce qui est nécessaire pour induire une toxicité maternelle. Hanley *et al* en 1984 ont exposé des rats, des souris et des lapines gestantes à 3, 10 et 50 ppm d'EGME pendant 6 heures/jour (6-15 jours de gestation chez les rats et les souris), (6-18 jours de gestation chez les lapines), leur

résultats démontrent une baisse transitoire du gain de poids corporel maternel chez les rats, les souris et les lapines exposées à 50 ppm, les seuls signes cohérents d'effets maternels. Une augmentation statistiquement significative de l'incidence des variations du squelette a été observée chez les rats et les souris après une exposition maternelle à 50 ppm d'EGME

En outre, une diminution significative du poids du fœtus a été observée chez les lapines après exposition maternelle à 50 ppm d'EGME et une augmentation significative du taux de résorption fœtale a été observée dans le groupe d'exposition à 10 ppm (Hanley *et al.*, 1984).

Sur le plan biochimique, les résultats ont également mis en évidence une perturbation des produits du métabolisme physiologique notamment, chez les groupes des lapines traitées à raison de 100 et 150 ppm d'EGME, nous avons remarqué l'augmentation hautement significative du taux d'ALAT, d'ASAT, des triglycérides et les protéines totales ainsi qu'une diminution du taux du cholestérol. Par contre, le taux de glucose varie selon l'état physiologique des lapines. En effet, chez les lapines gestantes nous avons remarqué une réduction très significative de glucose, contrairement, les lapines non gravides ont présenté une augmentation remarquable de la glycémie. Selon Mitra et Metcalf en 2009, la propriété glucogénique du foie est habituellement la dernière fonction qui pourrait être perdue suite à la défaillance hépatique (Mitra et Metcalf, 2009).

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).

Concernant l'évaluation de la toxicité hématologique, l'administration d'EGME à entrainer une diminution des globules rouges, de l'hémoglobine, des plaquettes et des globules blancs.

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 progénitures en particulier granulocytaires et érythrocytaires. Ces effets sont responsables de leucopénie avec neutropénie et une anémie (Ghanayem, 1996).

La toxicité des EG sur la fonction de reproduction chez la femelle non gravide a été très peu étudiée. Chez l'animal, le seul indicateur recherché a été celui de la fertilité (femelles

exposées et accouplées à des mâles non exposés). Au cours de ces dernières années, des travaux se sont intéressés aux effets des EG sur le cycle ovarien.

De ce fait, il nous a semblé important d'explorer les effets du l'EGME à différentes doses sur les lapines non gestantes et mettre en évidence son impact sur le système antioxydant.

L'analyse des résultats obtenus ont tout d'abord mis en évidence une réduction considérable du poids corporel chez les groupes traités à l'EGME en comparaison avec le groupe témoin, Cet effet, peut être expliqué par l'action de l'EGME sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminés, le glucose, et les minéraux essentiels comme le zinc, magnésium et le fer...) par le sang et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le corps. On a remarqué aussi que la ration alimentaire a changé et les lapines ont perdu leur appétit accompagné par une forte diarrhée ce qui a provoqué une diminution du poids.

Ces constatations sont en accord avec celles rapportées par Miller *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983; Hanley *et al.*, 1984a qui ont observé une perte pondérale chez la femelle exposée à 100 ppm (311 mg/m³) d'EGME. nos résultats sont également similaires avec les travaux de Hobson *et al.*, 1986 qui ont constaté que l'exposition par voie cutanée des cobayes à 1 000 mg/kg-mc de l'EGME par jour pendant 13 semaines engendre une réduction du poids des gonades et une perte pondérale.

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

Les effets de ce solvant sont hautement spécifiques sur la structure et le fonctionnement des ovaires provoquant la diminution du poids ovarien chez tous les groupes traités. Cette diminution est due à l'action des métabolites de ces produits sur les tissus induisant des lésions cellulaires qui vont conduire à une atrophie ovarienne soulignant que la toxicité est de manière dose- dépendante (Lee et Kinney, 1989).

En ce qui concerne le poids des organes, nous remarquons une augmentation très significative ($p < 0,01$) du poids du foie chez les lapines traitées à l'EGME, par rapport aux témoins. Ceci est explicable, d'une part, par l'hypertrophie tissulaire de cet organe causé par

ce solvant et d'autre part, par l'accumulation intense de l'EGME dans cet organe cible aux solvants. Ce résultat est en accord avec les travaux de Djabali en 2009, Bendjeddou en 2014 et Boucif en 2015 qui ont exposé des lapins mâles à des doses croissantes (50, 100, 150, 200 et 300 ppm) de l'EGME par différentes voies d'administration soit par ingestion, soit par inhalation soit par voie sous cutané.

En effet, l'administration répétée d'EG 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 (Kawamoto *et al.*, 1991).

Concernant l'évaluation de la toxicité hématologique, nous avons enregistré une diminution significative dans le taux d'hémoglobine (Hb) et celui des globules rouges (GR), cette diminution est non significative au niveau de taux des globules blancs (GB). Certaines études ont indiqué que l'EGME est toxique pour les cellules sanguines à cause de sa propriété amphiphile qui peut diffuser dans tous les cellules sanguines et affecter leur fluidité membranaire par changement de la perméabilité, en augmentant la solubilité lipidique des membranes (Gulati *et al.*, 1985) qui peut permettre à plusieurs xénobiotiques d'atteindre différents organes.

Les effets sur la moelle osseuse, principale manufacture des globules rouges, sont dangereux. Il a été montré que l'EGME a un effet gravissime sur le développement des globules rouges et peut les attaquer directement engendrant l'hémolyse (Boiron *et al.*, 1994).

D'autres études ont indiqué que l'exposition à un solvant toxique conduit à une perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle au niveau de la membrane des cellules sanguines, par augmentation de la peroxydation des lipides entraînant une modification dans le fonctionnement des protéines membranaires, ainsi que les acides nucléiques et les protéines cytoplasmiques (Moller et Wallin, 1998) et peut induire une modification de la composition de la membrane par changement dans le cholestérol, les phospholipides et les acides gras, ce qui provoque la modulation de la fluidité membranaire (Berrettini *et al.*, 2004).

Ces changements dans la fluidité de la membrane peuvent également survenir à la suite de l'interaction des radicaux libres avec les protéines et les lipides dans la bicouche. La

conséquence de cette interaction est la modification de l'état physique des lipides et des protéines dans la membrane plasmique (Borst *et al.*, 2000).

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).

Nous avons tenté également dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact de l'EGME sur la fonction hépatique et rénale.

Le foie est impliqué dans de nombreux processus métaboliques et physiologiques indispensables dans l'organisme. Parmi les principales fonctions du foie figurent les fonctions biliaire, glycogénique, uréopoiétique, antitoxique et martiale. Il joue un rôle fondamental également dans le métabolisme des lipides, de l'acide urique, des protéides et en particulier de la sérine, de la prothrombine et du fibrinogène, ainsi que dans la désamination (Alliot, 1950 ; Mitra et Metcalf, 2009). Il est aussi le site privilégié du métabolisme de plusieurs substances y compris l'EGME. Cette substance est largement utilisée dans l'industrie (Alliot, 1950 ; Mitra et Metcalf, 2009).

A long terme, l'exposition de cette substance endommage le foie, elle provoque la stéatose qui est caractérisée par l'accumulation des triglycérides et de graisse dans le foie ce qui explique l'augmentation hautement significative des triglycérides chez les lapines traitées.

Le syndrome de cytolysse traduit une atteinte de la membrane hépatocytaire. Cette atteinte peut être une destruction de la membrane qui définit la nécrose hépatocytaire ou une augmentation de la perméabilité membranaire. Par conséquent, les substances normalement contenues dans l'hépatocyte vont être relarguées dans les sinusoides et leur concentration dans le sang périphérique va augmenter. Les substances dosées en clinique et qui permettent d'apprécier l'existence et l'intensité de la cytolysse sont les transaminases.

Les transaminases (ou amino transférases) sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé à un acide alpha-cétonique. Il existe 2 transaminases dont le coenzyme est la vitamine B6 (phosphate de pyridoxal) : L'ALAT (Alanine Amino Transferase) et l'ASAT (Aspartate

Amino Transferase) qui ne sont pas spécifiquement hépatocytaires. D'autres cellules contiennent des ASAT, en quantité toutefois inférieure à celle contenue dans les hépatocytes.

Il s'agit surtout des cellules musculaires, notamment myocardiques. Il faut donc savoir évoquer la nature musculaire d'une cytolyse lors des élévations modérées des transaminases qui prédominent en ASAT.

Le taux des transaminases revient rapidement à la normale lorsque la cause de l'atteinte hépatocytaire est supprimée. La demi-vie de l'ASAT est plus courte que celle de l'ALAT. Ces atteintes hépatocytaires ont été retrouvées dans notre série et ont été confirmées lors de l'analyse des résultats du taux de transaminases hépatiques (ASAT, ALAT) qui a montré une augmentation très significative et dose dépendante chez les groupes exposés par rapport au groupe témoin.

Chez l'homme, Il a été rapporté qu'un patient âgé de 40 ans a été hospitalisé plusieurs heures après avoir ingéré environ 250 mL de l'EGME. A l'arrivée en milieu hospitalier, il était comateux et on notait une hyperventilation. Il est décédé 5 heures plus tard, sans avoir repris connaissance. L'autopsie a montré une gastrite et une pancréatite hémorragiques, une stéatose hépatique et une atteinte tubulaire rénale (INSERM, 1999).

Les reins jouent le rôle de filtre. Ils permettent d'éliminer les déchets qui proviennent du fonctionnement de l'organisme et maintiennent l'équilibre chimique du sang. Si les reins ne fonctionnent plus, ces déchets s'accumulent dans le sang et deviennent toxiques.

D'après les résultats obtenus dans notre séries , le traitement des lapins pendant 4 semaines a provoqué une réduction du poids des reins accompagnée d'une augmentation significative et dose dépendante du taux de l'urée et de la créatinine chez les groupes traités par rapport au groupe témoin, ces deux paramètres sont essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Finco, 1997). L'augmentation de ces deux paramètres dans note série d'étude peut être expliquée par une lésion tissulaire au niveau des reins chez les lapines traitées par l'EGME.

La quantité d'urée produite chaque jour varie avec l'état de nutrition, elle augmente avec une situation de catabolisme ou un apport protéique important et baisse par conséquent sous un régime pauvre en protéines (Tsinalis et Binet, 2006). Et comme l'urée est soumise à une réabsorption tubulaire importante, dépendant pour l'essentiel de la quantité d'eau libre présente dans le néphron, son excrétion est de plus irrégulière. Il est donc impossible d'en

tirer des conclusions précises sur la fonction rénale (Levey, 1990). Cependant, son dosage est moins fiable que celui de la créatinine pour évaluer la fonction rénale.

La créatinine est un produit de dégradation du phosphate de créatine dans le muscle. Elle est généralement produite par le corps à un taux constant, en fonction de la masse musculaire, pour un individu donné. Cette molécule est éliminée dans sa totalité par le rein. Le glomérule en filtre une très grande partie, le reste étant sécrété par les tubules. Elle n'est, par contre, pas réabsorbée dans le sang au niveau du rein (Rabb, 1998 ; Traynor *et al.*, 2006).

La teneur du sang en créatinine est la mesure la plus répandue de la fonction rénale par comparaison avec l'urée et l'acide urique car la créatinémie n'est pas affectée par le repas, l'exercice ou les hormones (Bauer *et al.*, 1982 ; Choudhary *et al.*, 2003 ; Levey, 1990 ; Suc et Legrain, 1995; Teeter et Franciscus, 2004).

Ces résultats peuvent être expliqués par les effets toxiques de l'EGME sur la fonction rénale. Différentes études montrent que ce produit est néphrotoxique (Thurman *et al.*, 1999, Bendjeddo *et al.*, 2014, Boucif *et al.*, 2015).

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactives, les fameux radicaux libres ou oxyradicaux. Lorsqu'ils restent à un niveau normal, les radicaux libres seront utilisés par l'organisme pour différentes fonctions, comme par exemple être synthétisées par les globules blancs pour détruire les bactéries nuisibles. Mais lorsqu'ils sont en excès, ils entraînent des dommages à notre organisme (CPSN, 2014).

Face au dommage oxydatif causé par les dérivés actifs de l'oxygène (les radicaux libres) et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification (Kaplowitz & Awy-Okhtens, 1985).

Le stress oxydant est une circonstance anormale dans laquelle sont placés les tissus de notre organisme lorsqu'ils sont face à un flux accru de radicaux libres, et qu'ils n'arrivent plus à piéger ou à détruire. Evaluer le stress oxydant consiste donc à estimer les mécanismes de défense et analyser les produits secondaires qui peuvent en résulter.

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des plus importants marqueurs du stress oxydatif. Il a été mesuré dans le foie et les reins pour refléter le degré de la peroxydation lipidique. Impliquant principalement les acides gras polyinsaturés, ce processus endommage la structure et la

fonction cellulaire responsable de la perte de l'intégrité membranaire, et la lyse cellulaire (Romero *et al.*, 1998 ; Stark, 2005).

Dans notre étude, le gavage par l'EGME a entraîné une augmentation significative du taux d'MDA dans le foie et les ovaires, expliquant que la peroxydation lipidique a eu lieu au niveau des tissus incriminés (Ogur, 2005).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques (Halliwell, 1994). Parmi ces derniers, on retrouve principalement le glutathion réduit (GSH), il permet à l'organisme de se débarrasser des toxines et polluants indésirables, en formant avec eux un composé hydrosoluble susceptible d'être excrété dans l'urine ou la bile. Lorsque le glutathion est oxydé sous forme (GS•) il peut réagir avec un autre anion de glutathion pour former la molécule oxydée (GS-SG). Par la suite, elle peut être réduite en GSH de nouveau par la glutathion réductase NADPH dépendante (Valko *et al.*, 2007). Il est donc intéressant d'étudier le niveau de GSH dans le foie et les ovaires.

Lors du traitement des lapines avec l'EGME, les taux de GSH sont nettement diminués. Cet effondrement est peut être dû à sa conjugaison directe avec les espèces radicalaires produites par ce xénobiotique et/ou en raison de l'inhibition des enzymes antioxydantes qui sont impliquées dans sa régénération. Nos résultats corroborent avec ceux de Djebballi *et al.*, 2009, Bendjeddo *et al.*, 2014 et Boucif *et al.*, 2015).

Le glutathion (GSH) exerce son rôle en synergie avec les enzymes antioxydantes, parmi lesquelles figure la glutathion peroxydase (GSH-Px). Dans cette étude, nous avons dosé la GSH-Px qui a besoin de glutathion et de sélénium pour fonctionner correctement, en plus son rôle principal d'éliminer les peroxydes lipidiques (Valko *et al.*, 2007).

L'analyse des résultats a mis en évidence une diminution de la teneur hépatique et ovarienne en glutathion chez les lapines traitées par la faible et les fortes dose de l'EGME par rapport aux témoins. Cette diminution est expliquée par la participation du foie et des ovaires dans l'élimination des différents métabolites toxiques résultant de la dégradation des xénobiotiques tels que les peroxydes lipidiques, les électrophiles et les radicaux libres responsables des lésions tissulaires importantes (Duke *et al.*, 1996 ; Saka *et al.*, 2003). Le glutathion est un tripeptide qui joue un rôle essentiel à divers niveaux dans la lutte contre les substances chimiques toxiques (Masella *et al.*, 2005).

A l'issue de tous ces analyses nos résultats démontrent, que l'EGME a la capacité d'altérer le statut antioxydant dans chez les lapines traitées.

Sur le plan statistique, on utilise le coefficient de détermination R^2 qui est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire de l'effet des différentes concentrations si elle est forte ou faible. Nous avons obtenu dans notre étude des R^2 égaux environ à 1, donc la relation entre la concentration du solvant introduit aux lapines et le taux de paramètres biochimiques et hématologique est très forte.

Nous avons calculé les covariances pour chaque essai :

1. Chez les lapines gravides

La covariance est positive donc il existe une corrélation positive, à chaque augmentation de la concentration du solvant, le taux de certains paramètres augmente (l'ASAT, l'ALAT, la créatinine, l'urée, les protéines totales, les triglycérides).

Si la covariance est négative donc la corrélation est négative, à chaque augmentation de la concentration du solvant, le taux de certains paramètres diminue (poids corporels, poids des fœtus, cholestérol, globules rouges, globules blancs, hémoglobine et plaquettes).

2. Chez les lapines non gravides

La covariance est positive il existe une corrélation positive dans les paramètres suivants (poids de foie, l'ASAT, l'ALAT, la créatinine, l'urée, les protéines totales, les triglycérides, le glucose et le MDA).

Si la covariance est négative donc la corrélation est négative, à chaque augmentation de la concentration du solvant, le taux de certains paramètres diminue (poids corporels, poids des ovaires, cholestérol, GSH, GPx, globule rouge, globule blanc, hémoglobine et plaquettes).



*CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES*

Conclusion et perspectives

L'administration de l'Ethylène Glycol Monométhyl Ether (EGME) de trois doses à raison de 50, 100 et 150 ppm aux lapines gravides pendant la durée de gestation et les lapines non gravides pendant quatre semaines expérimentales par voie orale a provoqué des perturbations de plusieurs fonctions de l'organisme.

Les principaux résultats obtenus ont confirmés

Chez les lapines gravides

- La toxicité maternelle : Une baisse transitoire du gain de poids corporel maternel.
- Embryotoxicité : létalité embryonnaire totale chez les lapines traitées par une forte dose de l'EGME se traduit par un avortement spontané.
- Prolongement de la durée de gestation.
- Fœtotoxicité : hypotrophie fœtale et une mortinatalité.
- Hématotoxicité : traduite par une diminution dans le taux d'hémoglobine, des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes.
- Hépatotoxicité : hypertrophie de foie accompagné par une altération significative des paramètres biochimiques.
- Néphrotoxicité : atteinte rénale avec une augmentation de taux de créatinine et d'urée.

Chez les lapines non gravides:

- Une diminution du poids corporel des lapines durant la période du traitement par l'EGME.
- Une atrophie des ovaires et une hypertrophie de foie.
- Hépatotoxicité et néphrotoxicité se traduisant par une augmentation très significative du bilan hépatique et rénal.
- Quant à l'étude biochimique et hématologique ont confirmé de nouveau l'effet toxique de l'EGME.
- En ce qui concerne l'étude de quelques paramètres du stress oxydatif, nos résultats montrent que le traitement par l'EGME induit :

- Une diminution de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase (GSH-Px) au niveau des ovaires et de foie.
- Une augmentation significative des taux de peroxydation lipidique (MDA).
- un effondrement du taux de glutathion (GSH) hépatique et ovarien ce qui confirme que l'EGME peut minimiser le potentiel détoxifiant.
- Sur le plan histologique, nous avons remarqué une altération structurale du foie avec une hyperplasie. En effet, nos résultats illustrent la dégénérescence hépatocellulaire Ceci témoigne de l'effet cytotoxique local de l'EGME sur les hépatocytes.

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

- ✓ Etude de l'effet d'EGME sur l'axe hypothalamo-hypophysaires-ovarien.
- ✓ Compléter l'étude des effets génotoxiques des éthers de glycol de la série éthylénique, en particulier des effets 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.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- **Ahmed, A.E., Jacob, S., AU, WW.** (1994). Quantitative whole body autoradiographic disposition of glycol ether in mice: effect of route of administration. *Fundam. Appl. Toxicol.* **22** : 266-276.
- **Arteaga-Martinez, D., B., Saavedra-Ontiveros, F., Serrano-Medina, Reynoso-Arizmendi, N., Prada-garay, and Cornejo-Roldan** (2005). Contamonacion industrial con solvents organicos como causa de teratogenesis, *Publica de Mexico* 38,pp. 3-12.

B

- **Ballantyne B and Vergnes JS (2001).** *In vitro* and *in vivo* genetic toxicology studies with diethylene glycol monohexyl ether. *J. Appl. Toxicol.* **21**: 449-460.
- **Barbee, SJ., Terril, JB., Desousa, DJ., Conaway, CC.** (1984). Subchronic inhalation toxicology of ethylene glycol monoethyl ether in the rat and rabbit. *Environ Health Perspect.*, **57** : 157-163.
- **Barber, ED., Teetsel, NM., Kolberg, KF., Guest, D.** (1992). A comprative study of the rates of *in vitro* percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. *Fundam Appl Toxicol .*, **19**: 493-497.
- **Barone R, Pavaux C, Blin PC, Cuq P.** (1973) Angiologia. In *Atlas d'Anatomie du Lapin*. Paris : Masson & Cie, p. 113-144.
- **Barone R, Pavaux C, Blin PC, Cuq P.** (1973) Glandulae Sine Ductibus. In *Atlas d'Anatomie du Lapin*, Paris : Masson & Cie, p. 185-190.
- **Barone R.** (1990) Lapin. In : *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Tome 4. Paris : Vigot, p. 896-905.
- **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.
- **Bartnik, FG., Reddy, AK., Klecak, G., Zimmermann, V., Hostynek, JJ., Kunstler, K.** (1987). Percutaneous absorption, metabolism, and hemolytic activity of n-butoxyethanol. *Fundam Appl Toxicol .*, **8**: 59-70.
- **Bendridi N, LeJeune H & Pugeat M (2001).** Xénobiotiques et altération de la fonction de reproduction chez l'homme. *Métabolimes. Hormones. Nutrition.* **6**:281-285.

- **Benjeddou M, Boucif A & Khelili K (2012).** l'effet du solvant éthylène glycolmonométhyl éther (EGME) sur la fertilité chez les lapins mâles *oryctolagus cuniculus*. Toxicologie. Bull. Soc. Zool. Fr. **138(1-4)** : 151-163.
- **Benjeddou M (2014).** Evaluation des effets de l'éthylène Glycol Mono méthyle Ether (EGME)_administré par voie cutanée sur la reproduction et les paramètres hématologiques des lapins male (*Oryctolagus Cuniculus*).Thèse doctorat. Annaba. Spécialité physiologie animale.
- **Berger JR & Ayyar DR (1999).** Neurological complications of ethylene glycol intoxication « Report of a case ». *Archives of neurology*. **38 (11)**: 724–726.
- **Boatman, R., Schum, DB., Guest, D., Stack, CR. (1993).**Toxicology of diethylene glycol butyl ether: 2. Disposition studies with ¹⁴C-diethylene glycol butyl ether and ¹⁴C-diethylene glycol butyl ether acetate after dermal application to rats. *J Am Coll Toxicol .*, **12**: 145-154.
- **Boiti C, Bensenfelder U, Brecchia G, theau-clément M, Zerani M (2006)** Reproductive physiopathology of the rabbit doe. In *Recent Advances in Rabbit Sciences*. Melle : Institute for Agricultural and Fisheries Research, p. 3-19.
- **Boucif A, Benjeddou M & Khelili K (2014).** Evaluation of the effects of Ethylene Glycol Mono Methyl Ether (EGME) administered by inhalation on male reproductive rabbits (pubescent) (*Oryctolagus cuniculus*). *Annals of Biological Research*, 2014, **5 (5)**:106-112
- **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.
- **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.
- **Bringmann, G., Kuehn, R. (1978).** Grenzwerte der Schwadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Blaualgen (*Microcystis aeruginosa*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*), *Im. Vom Wasser.*, **50**: 45-60.
- **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 spermatogénèse. *Contracept. Fertil. Sex.* **26 (1)**: 39-48.

C

- **Carpenter CP, Pozzani UC & Weil CS (1956).**The toxicity of butyl cello solve solvent. *AMA Arch. Ind. Health*, **14**:114–131.
- **Carpenter DO, Arcaro KF & Bush B (1998).** Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ. Health. Perspect.* **106**: 1263-1270.
- **Catalina P & Roure-Mariotti MC,(2002).**Médecine et risque au travail. Guide de médecin en milieu de travail. Ed Masson.
- **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.
- **Cheeke PR, Patton NM, Lukefahr SD, Mcnitt JI (1987)** *Rabbit Production*, 6^e édition. Danville: Interstate Printers and Publishers. 472 p. ISBN 0813425808.
- **Cicolella A (1992).** Les éthers de glycol: état actuel des connaissances,perspectives de recherche. INRS, Cahiers de Notes Documentaires ND, 1890-148-92.
- **Cicolella, A (2000).** Ether de glycol, Encyclopédie, *Médico-chirurgicale* 5.
- **Cicolella A (2006).** Effets des éthers de glycol sur la reproduction. *Gynécologie. Obstétrique. Fertilité.* **34 (10)**: 955-963.
- **Chavatte-palmer P, Laigre P, Simonoff E, Challah M, Chesne P, Renard JP (2005)** Caractérisation de la croissance foetale in utero par échographie chez la lapine. In *11èmes Journées de la Recherche Cunicole*
- **Clarke DO, Elswick BA, Welsch F & Conolly RB (1993).** Pharmacokinetics of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid in the pregnant mouse: a physiologically based mathematical model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **121**: 239-252.

- **Clarke, DO., Welsch, F., Conolly, RB .** (1991a). Development of physiologically based description of 2- methoxyethanol (2-ME) pharmacokinetics in the pregnant mouse. *Teratology.*, **43** :437.
- **Cooper TK, Adelsohn D AND Gilbertson SR** (2006) Spontaneous Deciduosarcoma in a Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Pathology*, **43**(3), p. 377-380.
- **Corley RA, Markham DA, Banks C, Delorme P, Masterman A & Houle J (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.
- **CSHPF (2002).** Groupe d'experts du. *Les éthers de glycol dans les produits de consommation: un état des lieux*. In: Les éthers de glycol dans les produits de consommation et la santé, Rapport d'avancement au Directeur Général de la Santé.Paris: Direction générale de la Santé, pp.14-18.

D

- **DMER (Don Mackay Environmental Research) ., AEL (Angus Environmental Limited).** (1996). Pathways analysis using fugacity modelling of 2-methoxyethanol for the second Priority Substances List. Rapport préparé pour la Division de l'évaluation des produits chimiques, Direction de l'évaluation des produits chimiques commerciaux, Environnement Canada, par DMER, Peterborough (Ont.), et AEL, Don Mills (Ont.), mars 1996.
- **Daniel, FB., Cheever, KL., Begley, KB., Richards, DE., Weigel, WW., Eisenmann, CJ.** (1991). Bis (2- methoxyethyl) ether: metabolism and embryonic disposition of a developmental toxicant in the pregnant CD-1 mouse. *Fundam Appl Toxicol .*, **16**: 567-575.
- **Davis BJ, AlmeKinder JC, Flagler N, Travlos G, Wlsol R & Maromlpot RR(1997).** Ovarien lutel cell toxicity of ethylene glycol monomethylether and methoxyacetic acid in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**: 328-337.
- **Djabali N (2009).** 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*.Thèse doctorat.Annaba. Spécialité physiologie animale.
- **Djabali N, Khelili K & Hamdi L (2009).** 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*. **27(1)**: 93-103.
- **Devanbéry 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.
- **Donnelly TM (2004)** Rabbit: Basic Anatomy, Physiology and Husbandry. In *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. 2nd edition. Philadelphia : Saunders, p. 136-146.

E

- **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 personal and residential concentrations indoor, outdoor and workplace microenvironments samples in Expolis-Helsinki, Finland. *Atmospheric Environment*. **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.
- **Elias Z, Daniere MC, Marande AM, Poirot O, Terzetti F, Schneider O(1996)**. Genotoxic and/or epigenetic effects of some glycol ethers: Results of different shortterm 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 éthers de glycol: une toxicité variable selon les composés. *Actu. Chim.* **1**: 145-149.

F

- **Favier A**. Oxidative stress in human disease. *Ann. Pharm. Fr.* 2006 ; 64(6) : 390-396.
- **Fastier A, Herve-Bazin B & McGregor D (2005)**. Activities on risk assessment of glycol ethers. *Toxicol. Letters*. **56**: 59-76.

- **Guetteridge JM.** Free radicals in disease processes : a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res.* 1993 ; 19 : 141-158.
- **Mitchell H, Schonle H, Grindley H.** The origins of nitrate in urine. *J. Biol. Chem.* 1916 ;24 : 461-490
- **Figa TI, 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.
- **Foote RH et al (1995).** Ethylene glycol monomethyl ether effects on health and reproduction in male rabbits. *Reprod. Toxicol.* **9:** 527-539.
- **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 reproductive toxicity assay using *Xenopus laevis*: boric acid, cadmium and ethylene glycol monomethyl ether. *J. Appl. Toxicol.* **21 (1):** 41-52.
- **Furelaud G, Calvino B.** Rappel : l'axe hypothalamo-hypophysaire [en ligne]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/cybernetique/03homme.htm> (consulté le 17/10/2012)

G

- **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.
- **Gulati, D.K., Hope, E., Barnes, L.H., Hommell, L., Russell, S., Poonacha, K.B. (1990a)**. Reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether (CAS No. 109-86-4) in Sprague-Dawley rats, litter two, 1-76. Environmental Health Research and Testing Inc. Rapport inédit (NTIS-PB 90-252313) [cité par ECETOC, 1995].
- **Gulati, D.K., Hope, E., Christman, K.L., Barnes, L.H., Russell, S. (1990b)**. Reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether (CAS No. 109-86-4) in Sprague-Dawley rats, litter two, 1-72. Environmental Health Research and Testing Inc. Rapport inédit (NTIS-PB 90-252321) [cité par ECETOC, 1995].

H

- **Hansch, C., Leo, A.J. (1985)**. *Medchem project. Issue No. 26*, Pomona College, Claremont (Calif.).
- **Hanley, T.R., Jr, Yano, B.L., Nitschke, K.D., John, J.A. (1984b)**. Comparison of the teratogenic potential of inhaled ethylene glycol monomethyl ether in rats, mice, and rabbits, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **75**: 409-422.
- **Hanley, T.R., Jr, Young, J.T., John, J.A., Rao, K.S. (1984a)**. Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) and propylene glycol monomethyl ether (PGME): Inhalation fertility and teratogenicity studies in rats, mice and rabbits, *Environ. Health Perspect.*, **57**: 7-12.
- **Hardin BD, Goad PT & Burg JR (1984)**. Developmental toxicity of four glycol ethers applied cutaneously to rats. *Environ. Health. Perspect.* **57**: 69-74.
- **Hardin BD (1983)**. *Reproductive toxicology of glycol ethers*. Toxicology, **27** : 91-102.
- **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 administered 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.

I

- **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.
- **INRS: Institut National de Recherche et de Sécurité (2010).** 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)*.

J

- **Jakasa I, Mohammadi N, Kruse J & Kezic S (2004).** Percutaneous absorption of neat and aqueous 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.
- **Johanson G & Boman A(1990).** Percutaneous absorption of 2-butoxyethanol vapour in humansubjects. *BrJInd Med*, **48**: 778-792.
- **Johanson G (2000).** *Toxicity review of ethylene glycol monomethyl ether and its acetate ester.* *Critical Reviews in Toxicology*, **30 (3)**:307-345.
- **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.

K

- **Kalf GF, Post GB & Snyder R (1987).** *Solvent toxicology: recent advances in the toxicology of benzene, the glycol ethers and carbon tetrachloride.* *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **27** : 399-427.
- **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. Surgery.* **37 (8)**: 23.

- **Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Hirai M & Arashidani K (1990a).** 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 (1990b).** 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. *Occupational 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 & Smialowicz 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.

ℒ

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

- **Larese, F., Fiorito, A., Dobetti, L., Furlan, G., Fernetich, E., Bussani, R. (1994).** Skin absorption of solvents: evaluation in experimental conditions. *Occup Hyg.*, **1**: 191-198.
- **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 éthers de glycol sur la reproduction et le développement de rongeurs en administration répétée 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.
- **Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982).** *Handbook on chemical property estimation methods. Environmental behavior of organic compounds,* McGraw-Hill, New York (N.Y).

M

- **Multigner L (2002).** Fenêtre critique des effets des éthers de glycol sur la reproduction. In: Groupe d'experts du CSHPF. Les éthers de glycol dans les produits de consommation et la santé. Paris: Direction générale de la Santé. 11-15.
- **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, J.L. (2002).** Prévention des risques liés à la fabrication et à l'utilisation des éthers de glycol. *Travail Sécurité.*, **616**: 2-10.
- **Marty, M.S., R., Loch-Carusio (1998).** 2-methoxyethanol inhibits gap junctional communication in rat myometrial myocytes, *Cell. Biol. Toxicol* **14**, pp. 199-210.
- **Martoja R & Martoja M (1967).** Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Ed. Masson & Cie.* 329.

- **Miller RR (1987)**. Metabolism and disposition of glycol ethers. *Drug. Metab. Rev.* **18**: 1-22.
- **Moret B (1980)** Comportement d'oestrus chez la lapine. *Cuniculture*, **3**(33), p. 159-161.

N

- **Nagano K, Nakayama E, Koyano M, Oobayashi M, Adachi M & Yamada T (1979)**. Testicular atrophy of mice induced by ethylene glycol monoalkyl ethers. *Jap. J. Ind. Health*.**21**: 29-35.
- **Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI**. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychoph.* 2008 ; 21 : 1-26.

O

- **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.

P

- **Patton NM (1994)** Colony Husbandry. In *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2nd édition. London : Academic Press Limited, p. 28-46.
- **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.

R

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

S

- **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.
- **Saillefait 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.
- **Salveti P (2008)** *Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine : Application à la gestion des ressources génétiques.* Thèse Universitaire Interdisciplinaire Sciences Sante, Claude Bernard Lyon 1, 179 p.
- **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.
- **Simonet N (2005).** évaluation et prévention des risques liés à l'utilisation de produits contenant des éthers de glycol. Thèse doctorat. Spécialité pharmacie. Nancy.
- **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.
- **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 Pololike 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.

V

- **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007 ; 39 : 44-84.

- **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.

W

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

Y

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



ANNEXES

I. Les réactifs utilisés dans le dosage des paramètres biochimiques

1. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique du glucose

Les réactifs	Composition	Concentration
R1 tampon	Tris pH 7.4	92 m mol/L
R2 enzymes	Phénol	0.3 m mol/L
	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
	Peroxydase (POD)	1000 U/L
Glucose cal	4- Aminophenazone (4-AP)	0.6 m mol/L
	Etalon de glucose aqueux primaire	100 mg/dL

2. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique des triglycérides

Les réactifs	Composition	Concentration
R1 tampon	GOOD PH 7.5	50 m mol/L
R2 enzymes	P-Chlorophénol	2 m mol/L
	Lipoprotéine lipase	15000 U/L
	Glycérol kinase	500 U /L
	Glycérol 3 phosphate Peroxydase (POD)	2500 m mol/L
	4-Amin antipyrine (4-AP)	440 U/l m mol/L
Triglycérides cal	ATP	0.1 m mol/L
	Etalon de Triglycérides aqueux primaire	200 mg/dL

3. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique des protéines totales

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

4. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique du cholestérol

Les réactifs	Composition	Concentration
R1 tampon	PIPES PH 6.9	90 m mol/L
	Phénol	26 m mol/L
R2 enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U /L
	Peroxydase (POD)	1250 m mol/L
	4- Aminophenazone (4- AP)	0.4 m mol/L
Cholestérol cal	Etalon de cholestérol aqueux primaire	200 mg/dL

5. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique de créatinine

Les réactifs	Composition	Concentration
R1	Acide picrique	17.5 mol/L
R2	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/L
R3	Etalon de la créatinine aqueux primaire	2 mg/dL

6. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique de l'urée

Les réactifs	Composition	Concentration
R1 tampon	phosphate	50 mol/L
	EDTA	2 m mol/L
	Salicylate de sodium	60 m mol/L
	Nitroprusside de sodium	3.2m mol/L
R2 NaCLO	Hypochlorite de sodium	140 m mol/L
	Hydroxyde de sodium	150 m mol/L
R3 Enzyme	Uréase	3000 U/L
R4 Étalon	Étalon de l'urée aqueux primaire	50 mg/dL

7. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique d'ASAT

Les réactifs	Composition	Concentration
R1 solution tampon 200 m mol/L	Tampon Tris pH 7.8 à 30C	80 m mol/ L-Asperate
R2 substrat et enzymes	NADH	0.18 m mol/L
	LDH	800 U/L
	MDH	600 U/L
	Oxoglutarate	12 m mol/L

8. Réactifs utilisés pour le dosage plasmatique d'ALAT

Les réactifs	Composition	Concentration
R1 solution tampon	Tampon Tris pH 7.5 à 30C°	100 m mol/L
	Alanine	500 m mol/L
R2 substrat et	NADH	0.18 m mol/L
Enzymes	LDH	1200 U/L
	Oxoglutarate	15 m mol/L

10. Les normes biochimiques**III.1. Les constantes biochimiques usuelles du lapin, d'après Boussarie (2003), Stein et Walshaw (1996).**

Paramètre	Unité	Valeurs usuelles
Urée	g / L	0,15 - 0,30
Créatinine	mg / L	5 - 25
Glucose	g / L	0,5 - 1,6
Protéines totales	g / L	54 - 80
ALAT	UI / L	48 - 80
PAL	UI / L	4 - 16
Bilirubine totale	mg / L	2 - 7
Albumine	g / L	24 - 46
Cholestérol	g / L	0,1 - 0,8
Ca ²⁺	mg / L	55 - 125
K ⁺	mmol / L	3,7 - 10,0

III.2. Valeurs de référence de biochimie clinique (Kaneko, 1989).

Paramètres et unité	Valeurs	Paramètres et unité	Valeurs
· Glucose (mmol/l)	7,3 ± 0,6	· Chlore (mmol/l)	100 ± 3
· Triglycérides (mmol/l)	0,75 ± 0,04	· Aspartate aminotransférase (U/l)	18,5 ± 3.2
· Magnésium (mmol/l)	1,01 ± 0,01	· Alanine aminotransférase (U/l)	25,5 ± 6.5
· Sodium (mmol/l)	144 ± 5	· Lactate déshydrogénase (U/l)	220 ± 27
· Potassium (mmol/l)	4,5 ± 0,4		

L'effet Adverse de L'éthylène Glycol Monométhyl Éther (EGME) sur la Reproduction chez les Lapines de Race Locale Algérienne: Étude Biochimique et Hématologique

Bouchikhi Nour Elhouda

*Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Université Djillali Liabes, Sidi-Bel-Abbés, 22000, Algérie*

E-mail: bouchikhi.norelhouda32@gmail.com

Tel: +213665521613

Bendahmane Malika

*Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Université Djillali Liabes, Sidi-Bel-Abbés, 22000, Algérie*

Zahzeh Touria

*Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Université Djillali Liabes, Sidi-Bel-Abbés, 22000, Algérie*

Résumé

Les éthers de glycol (EG) sont des solvants organiques ont de nombreuses applications industrielles, domestiques et cosmétiques, ils sont connus pour induire des perturbations de la fonction de reproduction.

Ce travail est consacré à évaluer l'effet toxique d'un solvant: l'Éthylène glycol monométhyl éther (EGME) sur les paramètres de la reproduction, les paramètres hématologiques et biochimiques chez les lapines de race locale Algérienne.

Trois lots d'animaux ont été traités à l'EGME par gavage quotidien de 1 mL de solutions (50 ppm, 100 ppm et 150 ppm) pendant toute la durée de la gestation (31 jours). Un suivi journalier des lapines gestantes (poids corporel, déroulement de la gestation) a été effectué.

Un dosage de certains paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, créatinine et urée) et hématologiques: globules rouges (GB), hémoglobines (Hb), globules blancs (GB), plaquettes (PL) a été réalisé.

Le poids du foie a été mesuré après dissection des animaux morts des groupes 100 et 150 ppm après avortement et de ceux des groupes 50 ppm et témoin après la mise bas.

La comparaison entre les animaux témoins et traités montre la reprotoxicité de l'EGME (réduction du poids des lapines, avortement spontané, mortalité maternelle, prolongement de la gestation, hypotrophie fœtale), l'hépatotoxicité (augmentation du poids du foie), l'hématotoxicité (détérioration significative des paramètres hématologiques) et l'altération hautement significative des paramètres biochimiques.

Motsclés: EGME, lapines, reprotoxicité, hépatotoxicité, hématotoxicité.

Abstract

Glycol ethers are a family of a widely use in industrial and household products substances. They are known to induce disturbances of a number of physiological functions including the function of reproduction.

The aim of this work is to assess the toxic effect of a solvent: Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) on reproductive, hematological and biochemical parameters among local breed Algerian rabbit.

Three groups of animals are treated daily by gavage EGME 1 mL of solutions (50 ppm, 100 ppm and 150 ppm) for the duration of gestation (31 days). A daily monitoring of pregnant rabbits (body weight, course of gestation) was performed.

The determination of certain biochemical parameters (ALAT, ASAT, urea and creatinin) and hematological: red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb), white blood cell (WBC), plate (PL) has been carried out, the liver weight was mesured after dissection of dead animals of groups 100 and 150 ppm after abortion and those of groups 50 ppm and controls after calving.

The comparison between controls and treated animals showed reproductive toxicity of EGME (weight reduction rabbits, spontaneous abortions, maternal mortality, prolongation of gestation, low birth weight), hepatotoxicity (increasing of liver weight), hematotoxicity (significant deterioration in hematological parameters) and highly significant alteration of biochemical parameters.

Keywords: EGME, rabbits, reproductive toxicity, hepatotoxicity, hematotoxicity.

1. Introduction

L'un des problèmes majeurs de ce siècle est la préservation de la qualité de l'environnement face à la croissance industrielle exceptionnelle et à la pollution engendrée par le développement économique. Le rejet des substances naturelles ou industrielles constitue l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'homme. L'une des caractéristiques de la pollution d'origine humaine consiste en la dispersion, volontaire ou non volontaire, de substances (pesticides, solvants, etc.) qui sont susceptibles de contaminer divers compartiments de la biosphère (Lagadic et al, 1997).

Les EG forment une famille de solvants dont l'utilisation s'est développée de façon importante à partir des années 1960, au plan domestique et professionnel, principalement dans les produits dits à l'eau (peintures, encres, vernis, produits d'entretien). Il existe deux sous- groupes: la série E et la série P. Dans la série E, l'EGME, la molécule la plus étudiée sert de référence (Cicoletta, 2006).

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

Ils accèdent à tous les compartiments dans les minutes qui suivent l'absorption, quelle que soit la voie d'administration (Sabourin et al, 1992., Ahmed et al, 1994., Johanson, 1994).

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, l'EGME qui appartient à la catégorie éthylénique des EG 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 (Wang et al, 2000).

Depuis la première publication de Nagano en 1979, de nombreuses études réalisées chez l'animal de laboratoire ont montré que des EG dérivés de l'éthylène glycol l'EGME présentaient des effets adverses sur la reproduction et le développement (Inserm, 1999).

L'EGME est un toxique de la reproduction qui induit une infertilité et une atteinte de l'appareil génital sur les deux sexes, ainsi qu'une atteinte du développement embryo-fœtal après exposition maternelle (malformation et altération du développement). Les données épidémiologiques publiées à partir de la fin des années 1980 ont confirmé les données animales (malformation, avortement spontané, hypofertilité). Cette atteinte peut perdurer même après retrait de l'exposition.

Les études d'évaluation des risques invitent à penser que l'exposition massive aux EG reprotoxiques pendant plusieurs décennies peut avoir un impact important sur la santé reproductive de la population. L'ensemble des études menées à l'échelle internationale se sont intéressées aux effets des EG sur les paramètres de reproduction y compris la fertilité féminine (Cicolella, 2006). Il s'agit de l'altération de l'ovogenèse ou de la perturbation du développement embryonnaire. Sa toxicité 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).

Chez l'Humain, des études chez les femmes sont plus ambiguës. Elles semblent montrer une tendance à une baisse de la fertilité sans qu'elle soit statistiquement significative. Des augmentations du taux d'avortements ont également été observées dans l'industrie des semi-conducteurs lors de l'exposition aux EG de la famille éthylénique (Cicolella, 2006).

Une étude cas-témoins a mis en évidence, sur 44 patients atteints des malformations congénitales et souffrants des retards mentaux, un lien avec l'exposition professionnelle des mères à un mélange d'EGME et d'éthylène glycol pendant leur grossesse. Les enfants présentaient des signes et symptômes tels que des anomalies faciales, des retards mentaux, des anomalies sensorielles et des malformations des muscles squelettiques (Arteaga et al, 2005).

En 2002, EL-ZEIN a étudié 41 bébés nés de 28 femmes exposées professionnellement à l'EGME du six étaient exposées durant leur grossesse. Leurs six enfants présentaient des aspects dysmorphiques caractéristiques, non observés chez les 35 autres enfants (El-zein et al, 2002)

La toxicité des EG sur la fonction de reproduction chez la femelle gravide a été très peu étudiée. Chez l'animal, le seul indicateur recherché a été celui de la fertilité (femelles exposées et accouplées à des mâles non exposés).

L'objectif de ce travail réalisé au niveau de l'atelier d'élevage cunicole du centre de formation professionnelle et d'apprentissage d'OULED MIMOUNE- TLEMCEN (Ouest algérien) est de mettre en évidence l'impact de L'EGME administré par voie orale sur la reproduction des lapines. L'évaluation de la toxicité du solvant se fait par un suivi quotidien des lapines gestantes pendant 31 jours (poids corporel des femelles et des fœtus) et par la réalisation des dosages biochimiques et hématologiques.

2. Matériels et Méthodes

Notre étude a concerné un groupe de 40 lapines multipares âgées de neuf mois et matures sexuellement de poids corporel moyen de $3367,1 \pm 30,47g$.

Les paramètres d'ambiance du bâtiment d'élevage: la ventilation, l'humidité relative, la température ainsi que l'éclairage (16h de lumière/j) sont contrôlés. Les animaux sont logés individuellement dans des cages grillagées galvanisées de type Flat Deck, munies d'une trémie, d'une tétine d'abreuvement et de boîtes à nid, fixées à l'extérieur. Ils sont nourris ad libitum à base d'un aliment granulé constitué de maïs et d'orge fabriqué à Bouzaréah (Alger).

L'expérimentation consiste à administrer aux lapines trois doses croissantes d'EGME: 50, 100, et 150ppm. Pour cela nous avons réparti les lapines en quatre groupes comprenant chacun dix lapines, il s'agit du: groupe 01 ou témoin; groupe 02 traités par l'EGME à raison de 50 ppm; groupe 03 traité par l'EGME à raison de 100ppm et groupe 04 traités par l'EGME à raison de 150ppm.

Les lapines sont accouplées avec des mâles non exposés puis retirées une fois l'accouplement accompli.

Le produit est administré par voie de gavage une fois par jour (1ml), six jours par semaine pendant toute la durée de gestation à l'aide d'un pistolet.

Un suivi pondéral des lapines a été réalisé de façon hebdomadaire en prenant en considération plusieurs paramètres de la reproduction à savoir: l'avortement spontané, la mortalité maternelle, la mortalité post natale des fœtus et l'hypotrophie fœtale.

A la fin de l'expérimentation, Nous avons prélevé, centrifugé le sang pour faire l'analyse biochimique et hématologique

Le poids du foie a été noté après dissection des animaux morts des groupes 03 et 04 après avortement et de ceux des groupes 01 et 02 après la mise bas.

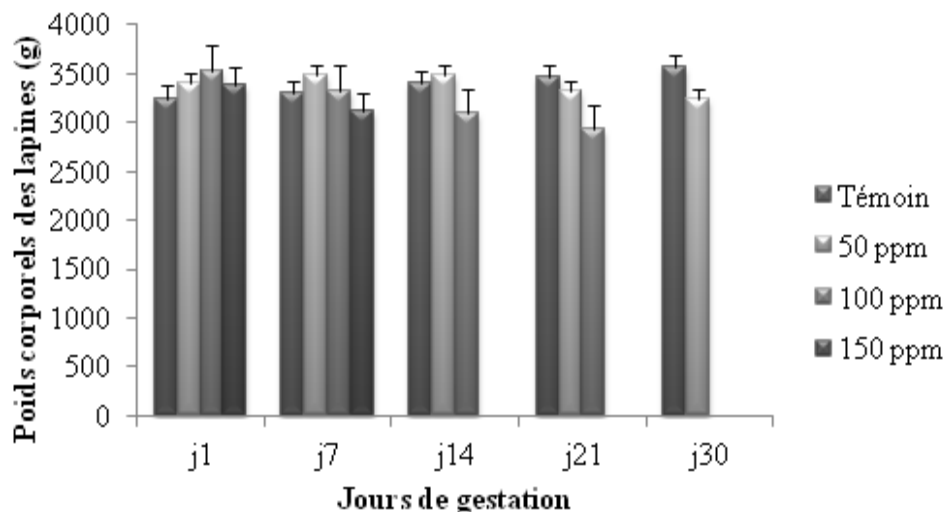
La saisie des données et l'exploitation statistique ont été réalisées par le logiciel SPSS version 18, les paramètres quantitatifs et qualitatifs sont respectivement exprimés en moyenne \pm écart type et en pourcentage (%), Les différences sont considérées comme significatives lorsque ($*P \leq 0,05$), très significative comparant au témoin ($**P \leq 0,01$), hautement significative comparant au témoin ($***P \leq 0,001$) (Test ANOVA).

3. Résultats

3.1 Effet de l'EGME sur les Poids Corporels des Lapines Durant la Gestation

Nos résultats (Figure 1) montrent que l'intoxication à l'EGME durant la gestation affecte les poids corporels (groupes 02, 03 et 04). Elle entraîne une diminution significative de ceux-ci ($p < 0,05$).

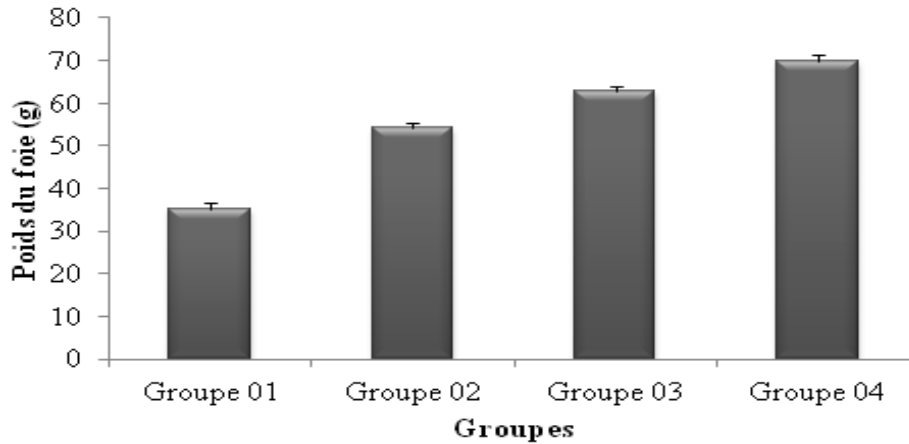
Figure 1: Variations moyennes ($X \pm SD$) du poids corporels (g)



Mean changes ($X \pm SD$) in corporal weight (g)

3.2 Effet de l'EGME sur les Poids Hépatiques

Ils sont indiqués dans la figure 2. Une augmentation hautement significative est objectivée chez les groupes traités à l'EGME ($P \leq 0,001$).

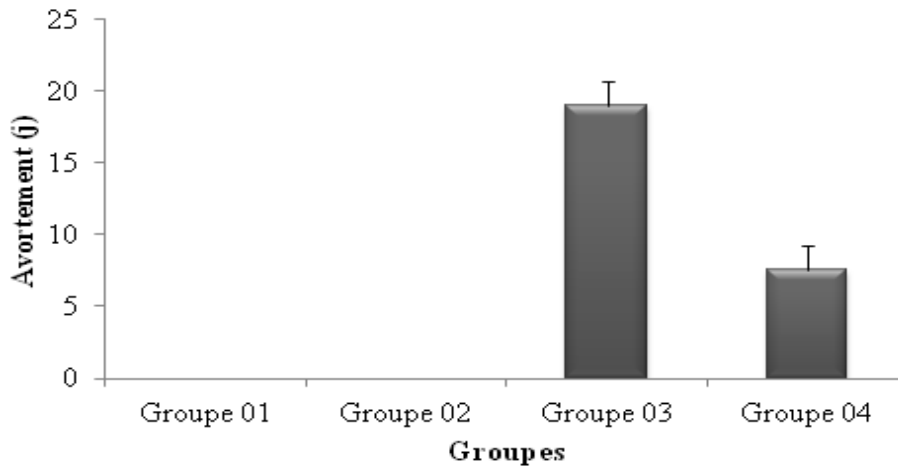
Figure 2: Variations moyennes ($X \pm SD$) du poids de foie (g)

Mean changes in liver weight ($X \pm SD$) (g)

3.3 Effet de l'EGME sur la Survenue D'avortement

L'EGME a entraîné un avortement chez la totalité des lapines de groupe 03 et 04 celui-ci est précoce car il survient dès la première semaine de gestation.

En revanche, les lapines de groupe 02 n'ont pas présenté d'avortement

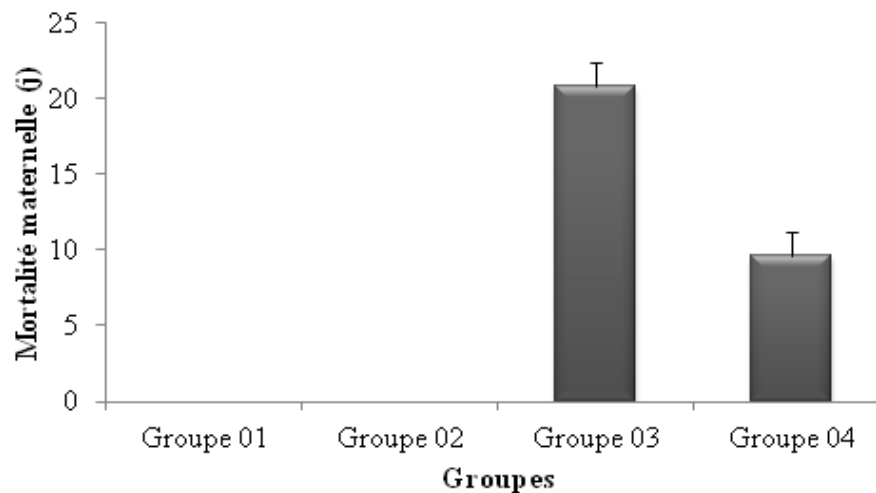
Figure 3: Variations moyennes ($X \pm SD$) de délai de survenue de l'avortement

Mean changes ($X \pm SD$) of delay occurred of abortion

3.4 Mortalité des Lapines

Une mortalité de toutes les lapines soumises aux doses 100 et 150 ppm après deux jours d'avortement a été constatée.

Figure 4: Variations moyennes ($X \pm SD$) de la mortalité des lapines

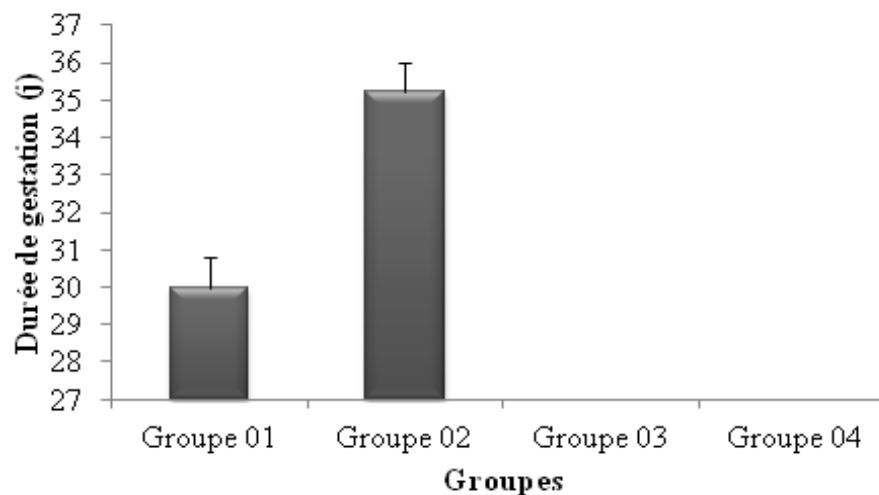


Mean changes ($X \pm SD$) of the mortality of rabbits

3.5 Durée de Gestation

Les résultats montrent un prolongement de la durée de gestation chez le groupe 02 par rapport aux témoins ($P < 0,01$).

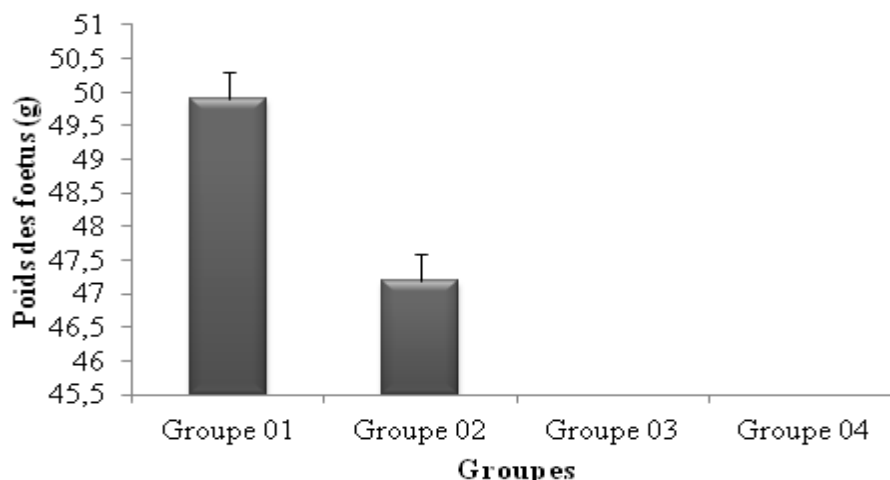
Figure 5: Variations moyennes ($X \pm SD$) du délai de mise bas (jours) entre le groupe témoin et groupe 02



Mean changes ($X \pm SD$) calving period (days) between the witness group and group 02

3.6 Effet d'EGME sur les Poids Fœtaux

Le solvant a entraîné une diminution très significative des poids corporels des fœtus ($p < 0,01$).

Figure 6: Variations moyennes ($X \pm SD$) du poids des fœtus (g) entre le groupe témoin et groupe 02

Mean changes ($X \pm SD$) fetal weight (g) between the control group and group 02

3.7 Analyses Biochimiques

Les résultats des analyses biochimiques montrent une augmentation très significative d'ALT, AST, créatinine, urée chez les groupes traités par rapport aux témoins.

Tableau 01: Effet de l'EGME sur l'ASAT, ALAT, créatinine et urée

Table 01: Effect of EGME in the ASAT, ALAT, creatinin and urea

Paramètres	Groupes 01	Groupes 02	Groupes 03	Groupes 04
ASAT (UI/L)	26 ± 1	35 ± 0,8**	40,35 ± 1,6***	61 ± 0,7***
ALAT (UI/L)	42 ± 0,7	45 ± 1,3***	58 ± 2,6***	72 ± 1,5***
Créatinine (mg/l)	6,8 ± 0,1	9,5 ± 0,25*	10,1 ± 0,4**	11,8 ± 0,22***
Urée (g/l)	0.48 ± 0.52	0.57 ± 0.03*	0.62 ± 0.04*	0.74 ± 0.02**

($M \pm SD$, n=10; Degrés de signification: * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$).

3.8 Analyses Hématologiques

Une diminution très significative et hautement significative des nombres des (GR) de (GB) et (PL) a été révélée chez les groupes 03 et 04 respectivement ($p < 0,01$; $p < 0,001$)

Le groupe 04 objective une diminution significative d'Hb ($p < 0,05$).

Tableau 02: Effet de l'EGME sur les GR, GB, Hb et PL

Table 02: Effect of EGME in RBC, WBC, Hb and PL

Paramètres	Groupes 01	Groupes 02	Groupes 03	Groupes 04
GR ($10^6/l$)	5,5 ± 1,12	4,52 ± 1,1	4,1 ± 0,99*	3,4 ± 0,8*
GB ($10^3/l$)	10,4 ± 0,23	7,8 ± 0,13	3,8 ± 0,18**	3,3 ± 0,1**
Hb (g/dl)	15,9 ± 0,12	10,91 ± 0,15*	8,33 ± 0,18*	5,8 ± 0,3**
PL ($10^3/l$)	463 ± 19	352 ± 35,01	139 ± 15,02***	57 ± 3,9***

($M \pm SD$, n=10; Degrés de signification: * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$).

4. Discussion

La fonction de reproduction est un processus biologique essentiel. Malheureusement, pendant ces dernières années, le monde a connu une large utilisation de produits chimiques comme les éthers de glycol qui constituent un grand danger pour la reproduction.

Nous avons tenté, dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact d'un solvant toxique, l'(EGME), sur la reproduction des lapines de race locale Algérienne.

Nous avons constaté une diminution significative des poids corporels des lapines gestantes traitées par l'EGME par rapport au groupe témoin. Cette diminution est semblable aux observations de Hanley qui démontre que la toxicité maternelle n'a été observée que chez des lapins exposés à 50 ppm EGME.

Dans toutes les études pour lesquelles une toxicité maternelle a été observée, il est toujours noté une diminution de la prise d'aliments par la mère et/ou une diminution de la prise de poids durant la gestation (Hanley et al, 1984).

Après dissection des lapines une augmentation très significative ($p < 0,01$) des poids du foie est notée selon les doses d'EGME.

En effet, l'administration répétée d'EG 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 (Kawamoto et al, 1991).

La survenue d'avortement a été constatée chez les groupes 03 et 04. Elle est plus précoce chez le dernier groupe (première semaine de gestation). Nos résultats rejoignent ceux de Nelson et al qui révélaient une létalité embryonnaire totale chez des groupes des rats exposés à une concentration supérieure ou égale à 73 ppm (Nelson et al, 1989).

Une mortalité embryonnaire est visible dans le groupe d'animaux exposés à 250 ppm /j, et augmente en fonction des doses d'exposition pour atteindre 100 % à la plus forte dose (Nagano, 1984). Nous avons constaté que la mortalité est totale de toutes les lapines de la dose 100 ppm et 150 ppm suite à un avortement. Nous sommes en accord avec les résultats observés chez Wickramaratne qui a enregistré que les applications de la dose la plus élevée ont conduit à la mort de toutes les rates en gestation, l'apparition de signes sévères témoignant d'une forte toxicité maternelle (Wickramaratne, 1986).

Nos résultats montrent un prolongement de gestation chez le groupe 50 ppm. La même observation a été observée chez les rates femelles (Hardin, 1983).

Il avait été rapporté que l'EGME et l'EGEE augmentaient le temps de gestation chez la rate et la souris en absence de toxicité maternelle Marty et Loch-caruso ont testé l'hypothèse que cet effet pourrait être la conséquence d'une inhibition des jonctions communicantes de la musculature lisse du myomètre (Marty et al, 1998).

Le solvant a entraîné une diminution très significatif ($p < 0,01$) de poids corporel des fœtus traité par l'EGME par rapport aux témoins.

Ces résultats sont corrélés avec les travaux de Ciccollela en 2000 et Hardin en 1983 qui prouvent que l'embryotoxicité a également traduit par une réduction du poids corporel des fœtus.

Ces effets sont retrouvés chez toutes les espèces traitées: souris, rat, lapin et singe quelle que soit la voie d'exposition (gavage, eau de boisson, inhalation, cutanée).

Sur le plan biochimique, nos résultats ont montré une perturbation au niveau des paramètres biochimiques, notamment chez les groupes des lapines traitées à raison de 100 et 150 ppm, L'analyse de nos résultats, montre une augmentation d'ALAT, ASAT, créatinine et l'urée.

Différentes études montrent que ce produit provoque une altération des paramètres biochimiques (Inserm, 1999).

Concernant l'évaluation de la toxicité hématologique, l'administration d'EGME à entrainer une diminution des globules rouges, hémoglobine, plaquettes et des globules blancs.

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 progénitures en particulier

granulocytaires et érythrocytaires. Ces effets sont responsables de leucopénie avec neutropénie et une anémie (Ghanayem, 1996).

5. Conclusion

EGME est l'éther de glycol le plus testé et sert en quelque sorte de molécule de référence pour les autres EG.

Sur toutes les espèces animales (souris, rat, lapin), EGME induit une atteinte du développement en cas d'exposition maternelle de nature reprotoxique chez la femelle.

Chez l'animal, l'EGME et ses métabolites passent la barrière placentaire dont ses effets toxiques sur le développement semblent dépendre de la formation d'acide méthoxyacétique (MAA), un de ses métabolites lui-même classé reprotoxique catégorie 2 (R60-R61).

Nous avons montré que l'administration d'EGME à 50, 100 et 150 ppm par voie orale chez les lapines gestantes pendant 31 jours provoque divers effets reprotoxiques (réduction du poids des lapines, les avortements spontanés, mortalité maternelle, prolongement de la gestation, hypotrophie fœtale), hépatotoxique (augmentation du poids du foie), hématotoxique (détérioration significative des paramètres hématologiques, GR, Hb, GB, PL) et altération hautement significative des paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, Créatinine, urée).

Ces résultats ouvrent la voie à d'autres recherches qui peuvent comprendre plus d'échantillons et d'autres paramètres pour évaluer l'embryo-foetotoxicité de l'EGME.

Références

- [1] Ahmed, A.E., S., Jacob, and W.W., Au, 1999. Quantitative whole body autoradiographic disposition of glycol ether in mice: effect of route of administration, *Fundam. Appl. Toxicol* 22, pp. 266-276.
- [2] Arteaga-Martinez, D., B., Saavedra-Ontiveros, F., Serrano-Medina, Reynoso- Arizmendi, N., Prada-garay, and Cornejo-Roldan, 2005. Contamonacion industrial con solvents organicos como causa de teratogenesis, *Publica de Mexico* 38, pp. 3-12.
- [3] Cicolella, A, 2000. Ether de glycol, Encyclopédie, *Médico-chirurgicale* 5.
- [4] Cicolella, A, 2006. Effets des éthers de glycol sur la reproduction, *Gynécologie. Obstétrique Fertilité* 34, pp. 955-963.
- [5] El.zein, R.A., S.Z., Abdel.rahman, D.L., Morris, and M.S., Legator, 2002. Exposure to ethylene glycol monoethyl ether: clinical and cytogenetic findings, *Arch. Environ. Health* 57, pp. 371-76.
- [6] Etiemble, J, 2003. Les éthers de glycol: une toxicité variable selon les composés, *Ed. Chimie et santé publique*, pp. 145-149.
- [7] Fastier, A., B., Herve-Bazin, and D., Mcgregor, 2005. Activities on risk assessment of glycol ethers, *Ed. Toxicol. Letters*, pp. 59-76.
- [8] Ghanayem, B.I., L.T., Burka, and H.B., Matthews, 1987. Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) toxicity: role of alcohol and aldehyde dehydrogenases, *Pharmacol. Exp* 24, pp. 222-231.
- [9] Hanley, T.R., B.L., Yano, K.D., Nitschke, and J.A., John, 1984. Comparison of the teratogenic potential of inhaled ethylene glycol monomethyl ether in rats, mice and rabbits, *Toxicol. Appl. Pharmacol* 75, pp. 409-422.
- [10] Hardin, B.D, 1983. Reproductive toxicity of the glycol ethers, *Toxicology* 27, pp. 91-102.
- [11] Inserm, Ethers de glycol. Quels risques pour la santé, *Ed. Inserm*, 1999.
- [12] Johanson, G, 1994. Inhalation toxicokinetics of butoxyethanol and its metabolite butoxyacetic acid in the male Sprague-Dawley rat, *Arch. Toxicol* 68, pp. 588-594.

- [13] Kawamoto, T., K., Matsuno, F., Kayama, M., Hirai, and K., Arashidani, 1991. Induction of r-GTP by ethylene glycol monomethyl ether, *Toxicol and Health* 7, pp. 473-478.
- [14] Lagadic, L., T., Caquet, J.C., Amiard, and F., Ramade, Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de l'environnement, Lavoisier, Tec Doc.
- [15] Maldonado, G., E., Delzell, R.W., Tyl, and L.E., Sever, 2003. Occupational exposure to glycol ethers and human congenital malformations, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76, pp. 405-23.
- [16] Marie, J.L, 2002. Prévention des risques liés à la fabrication et à l'utilisation des éthers de glycol, *Tra. Sec* , pp. 2-10.
- [17] Marty, M.S., R., Loch-Caruso, 1998. 2-methoxyethanol inhibits gap junctional communication in rat myometrial myocytes, *Cell. Biol. Toxicol* 14, pp. 199-210.
- [18] Nagano, K., E., Nakayama, H., Oobayashi, and T., Nishizawa, 1984. Experimental studies on toxicity of ethylene glycol alkyl ethers in Japan, *Environ. Health. Perspect* 57, pp. 75- 84.
- [19] Nelson, B.K., C.V., Vorhees, W.J., Scott, and L., Hastings, 1989. Effects of 2 methoxyethanol on fetal development, postnatal behavior, and embryonic intracellular pH of rats, *Neurotoxicol. Teratol* 11, pp. 273-84.
- [20] Sabourin, P.J., M.A., Medinski, F., Thurmond, L.S., Birnbaum, and R.F., Henderson, 1992. Effect of dose on the disposition of methoxyethanol, ethoxyethanol, and Butoxyethanol administered dermally to male F344/N rats, *Fundam. Appl. Toxicol* 19, pp. 124-132.
- [21] Wang, W., R.N., Win, and R.E., Chapin, 2000. Rat testicular: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis, *Ed. Toxicol. Appl. Pharmacol*, pp. 125-134.
- [22] Wickramaratne, G.A, 1986. The teratogenic potential and dose-response of dermally Administered ethylene glycol monomethyl ether (EGME) estimated in rats with the Chernoff Kavlock assay, *J. Appl. Toxicol* 6, pp. 165-66.

Résumé

Les éthers de glycol sont des solvants organiques ayant de nombreuses applications industrielles, domestiques et cosmétiques, ils sont connus pour induire des perturbations de la fonction de reproduction. Cette étude a pour objectif de mettre en évidence l'effet reprotoxique, embryo-foetotoxique et hématotoxique de l'Éthylène Glycol Monométhyl Ether (EGME) et d'évaluer son stress oxydatif en évaluant son pouvoir oxydant *in vitro* chez les lapines gravides et non gravides de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Pour cela, dans la première partie de l'étude, trois groupes des lapines gravides (n=10) ont reçus par gavage trois doses croissantes de l'EGME à raison de 50, 100 et 150 ppm pendant (32 jours). Un suivi journalier du poids corporel et du déroulement de la gestation des lapines gestantes a été effectué. La deuxième partie a concerné l'étude de trois groupes de lapines non gravides (n=10) traitées par les mêmes doses précédentes pendant quatre semaines successives. Les résultats de l'exposition à l'EGME des lapines gravides indiquent l'existence d'un signe de toxicité maternelle traduit par une réduction remarquable très significative ($p < 0.01$) de poids corporel des lapines traitées accompagné par la réduction de la prise alimentaire et hydrique par rapport aux témoins. Le deuxième signe toxique est la résorption fœtale précoce qui est survenue autour de J7 à J9 de gestation chez toute les lapines traitées par la forte dose 150 ppm. La dissection des lapines décédées (autopsie) après l'avortement nous a permis de constater un aspect hémorragique utérine avec la présence des ulcères et des hémorragies gastriques graves vraisemblablement responsable du décès. Une véritable fœtotoxicité s'est manifestée par un prolongement anormal de gestation et une hypotrophie fœtale avec un changement comportemental très remarquable par rapport aux témoins. Concernant les lapines non gravides, nous avons démontré une toxicité gonadique (atrophie ovarienne) et une hépatotoxicité (hypertrophie du foie avec un aspect histopathologique), L'implication de l'EGME dans le stress oxydant est confirmée par une augmentation significative de la MDA témoignant une forte peroxydation lipidique, une réduction significative de l'activité enzymatique antioxydante de glutathion peroxydase (GSH-Px) et un effondrement du glutathion réduit (GSH) au niveau des ovaires et le foie. L'hématotoxicité de ce solvant a été confirmée chez les deux études par la détérioration significative des paramètres hématologiques : globules rouges (GB), hémoglobines (Hb), globules blancs (GB), plaquettes (PL) et l'altération hautement significative des paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, créatinine, urée, triglycéride, cholestérol et glucose).

En conclusion, la présente étude a montré que l'EGME est capable d'induire une forte reprotoxicité et altérer le système antioxydant.

Mots clés : EGME, lapines, reprotoxicité, hépatotoxicité, hématotoxicité.

