

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى إسمطبولي

معسكر

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique
des Plantes

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et sécurité sanitaire

THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité : sciences de la Nature et de la Vie

Intitulée

L'évaluation de l'effet d'une exposition aiguë et subchronique au 5-phényl-1,2,4-triazole-3-thione (5PTT) chez des jeunes rats Wistar. Etude hématologique, biochimique, histologique et neurocomportementale.

Présentée par : M^{me} HADJADJ hassina

Le : 28/03/2022

Devant le jury :

Présidente	CHOUITAH Ourida	Professeur	Université Mascara
Examinatrice	AIT HAMADOUCHE Nadia	Professeur	Université Oran
Examineur	ADLI djallal eddine	MCA	Université Saida
Examineur	BOUHADI Djilali	MCA	Université Mascara
Encadreur	KAHLOULA khaled	Professeur	Université Saida
Co-Encadreur	MEDDAH boumediene	Professeur	Université Mascara

**« RIEN NE VAUT LA RECHERCHE, LORSQU'ON VEUT TROUVER
QUELQUE CHOSE. »**

J. R. R. Tolkien, Bilbo le Hobbit

REMERCIEMENTS

Cette thèse vient finaliser des années de travail. Il marque un terme à cette expérience professionnelle mais aussi personnelle qui n'aurait pas été réalisée sans le savoir et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens à remercier en quelques lignes tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à ce travail.

*Je remercie en premier lieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de ce travail.*

*Ma profonde reconnaissance va tout d'abord à **M^R KAHOULA Khaled**, Professeur à l'université D^R Moulay Tahar Saïda, pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ma thèse, pour son encadrement rigoureux et méthodique et ces compétences dont il m'a fait bénéficier tout au long de ma formation. Je lui adresse également ma gratitude pour son aide précieuse, ses conseils fructueux et surtout pour ses qualités humaines et scientifiques.*

J'exprime mes sincères remerciements à mon co-encadreur de thèse,

***Mr MEDDAH Boumediene**, Professeur à l'Université D^R Mustapha Stambouli Mascara, pour ses conseils importants et pertinents donnés toute au cours de la réalisation de ce travail.*

J'exprime mon estime et mes vifs remerciements aux honorables membres de jury pour avoir accepté d'examiner et juger ce modeste travail :

***M^{ME} CHOUITAH Ourida**, Professeur à l'université DR Mustapha Stambouli Mascara pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'être présidente a ce jury. Je tiens à lui exprimer tous mes remerciements.*

***M^{ME} AIT HAMADOUCHE Nadia**, Professeur à l'université d'oran, Je la prie de recevoir toute ma gratitude pour avoir accepté de mettre son expertise à contribution afin de juger ce travail.*

***M^R ADLI djallal eddine**, Maître de conférences A à l'Université D^R Moulay Tahar Saïda. Je le prie d'accepter l'expression de mes sincères remerciements pour ses conseils pertinents au cours de cette thèse et le temps accordé à « l'examen » de ce manuscrit.*

M^r BOUHADI Djilali, Maître de Conférence A l'université DR Mustapha Stambouli Mascara. Pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux en examinant ce mémoire, et pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.

Je remercie tout particulièrement professeur **SLIMANI Miloud** directeur de Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes qui a fait tout ce qui été possible pour faciliter la réalisation de cette thèse, et pour son aide précieuse et ces conseils inestimables.

J'exprime également mes sincères remerciements à professeur **BENALI Omar et Docteur OUICI Houari** (laboratoire de chimie) pour leurs précieuses collaborations

Je vais maintenant remercier toutes les personnes ayant participé à la thèse de près ou de loin. Un énorme merci à tous mes collègues de l'université Dr Moulay Tahar Saïda sans citer de nom pour n'oublier personne.

A mes chers parents qui ont toujours été là pour moi et sans qui je n'aurai jamais réalisé tout ce parcours, « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant rien du tout ». Vous m'avez donné un magnifique modèle de persévérance.

Je voudrais remercier du fond du cœur mon époux pour ses multiples encouragements, son soutien indéfectible et son appui sans failles au quotidien tout au long de mon parcours. Que ce travail soit un témoignage de ma reconnaissance.

A toute ma famille et ma belle-famille.

Mention spéciale à ma chère cousine **Lila** et mes chères amies : **Fatiha, samira et fatima**, qui m'ont témoigné un soutien constant durant toutes les étapes de ma vie, et d'avoir supporté mon stress. Je suis très fière d'être votre amie.

Enfin merci à tous ceux et celles que je ne nomme pas, mais qui se reconnaîtront.

Résumé

Le présent travail consiste à évaluer les modifications d'ordre biochimique, neurocomportemental et histologique suite à une exposition aigue (200 mg/kg pendant trois jours) et subchronique (10 mg/kg pendant trente jours) au 5-phényl 1, 2, 4 triazole 3-thione (5 PTT) chez des jeunes rats Wistar.

Nos résultats ont révélé que l'administration subchronique par voie intra péritonéale des rats au 5 PTT a permis de provoquer une baisse du poids corporel et cérébral ($p < 0,001$; $p < 0,01$) avec une augmentation du poids hépatique ($p < 0,01$), accompagnée d'une augmentation au niveau des biomarqueurs ; hépatiques (TGO, TGP) ($p < 0,01$; $p < 0,01$), métaboliques (glucose, cortisone, cholestérol totale, triglycérides) ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) respectivement, et hématologiques présentant une anémie marquée par une diminution significatives du taux des érythrocytes, des hémoglobine et hématocrites ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) respectivement, et une élévation des taux des leucocytes et des thrombocytes ($p < 0,01$; $p < 0,01$).

De plus, l'application des différents tests neurocomportementaux a savoir : le test de l'open Field, test de labyrinthe de Barnes, test obscurité/lumière, test du labyrinthe en croix surélevé, test de labyrinthe en Y et celui de la nage forcée ; ont permis de révéler que l'exposition aigue et subchronique au 5 PTT, provoque l'instauration d'un état d'anxiété (test de l'open Field, test du labyrinthe en croix surélevé) de dépression (test de la nage forcée) accompagnée d'une atteinte des performances de mémorisation et d'apprentissage spatiale (labyrinthe de Barnes et labyrinthe en Y). Ces résultats montrent bien l'effet délétère du 5 PTT sur les différents systèmes de transmission nerveuse plus particulièrement les voies dopaminergiques et sérotoninergiques.

En effet, l'étude histologique entreprise chez des rats exposés au 5PTT a montré des lésions très marquées au niveau cérébral et hépatique par rapport aux rats témoins.

Par ailleurs, l'analyse du statut antioxydant dans le sang, le foie et le rein indique que l'exposition aigue au 5-PTT à une dose de 200mg/kg perturbe l'activité des différents antioxydants enzymatiques (Catalase et GSH-Px) marquée par une diminution significative de la teneur érythrocytaire, cérébral et hépatique de la catalase ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) respectivement et le glutathion peroxydase ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,05$), et une diminution de taux des antioxydants non enzymatiques (glutathion réduit) au niveau érythrocytaire et cérébral ($p < 0,05$; $p < 0,05$).

L'ensemble de ces résultats dévoilent clairement que l'administration aigue et subchronique au 5 PTT provoque des perturbations d'ordre comportemental avec un degré de potentiel cytotoxique et dommages oxydatif et tissulaires au niveau cérébral et hépatique.

Mots clés :

5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione,cerveau,foie,anxiété, stress oxydatif, érythrocyte, cytotoxique

Abstract

The present work aims at evaluating the biochemical, neurobehavioral and histological alterations through an acute (200 mg/kg for three days) and subchronic (10 mg/kg for thirty days) exposure of young Wistar rats to 5-phenyl 1, 2, 4 triazole 3-thione (5 PTT).

The findings reveal that subchronic intraperitoneal administration of rats to 5 PTT can make it possible to decrease body, liver and brain weight ($p < 0.001$; $p < 0.01$; $p < 0.01$), accompanied by an alteration in biomarkers; hepatic (TGO, TGP) ($p < 0.01$; $p < 0.01$), metabolic (glucose, cortisone, total cholesterol, triglycerides) ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.01$; $p < 0.05$) correspondingly, haematological (haematocrit, haemoglobin, thrombocyte and leukocyte). ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.01$).

In addition, the application of the various neurobehavioral tests, namely: the open field test, the Barnes maze test, the dark/light test, the elevated cross maze test, the Y maze test and the forced swim test. ; have revealed that acute and subchronic exposure to 5 PTT it causes the establishment of a state of anxiety (open field test, elevated cross maze test) of depression (forced swim test) accompanied by impaired memory and spatial learning performance (Barnes maze and Y-maze). These results have obviously demonstrated the deleterious effect of 5 PTT on the various nervous transmission systems, more particularly the dopaminergic and serotonergic pathways. Indeed, the histological study undertaken on rats exposed to 5PTT showed a very marked linkage at the cerebral and hepatic level comparing to the control rats.

In addition, the analysis of the antioxidant status in the blood, the liver and the kidney indicates that acute exposure to 5-PTT at a dose of 200mg/kg disrupts the activity of the various enzymatic antioxidants (Catalase and GSH-Px) marked, respectively by a significant decrease in the erythrocyte, cerebral and hepatic content of catalase ($p < 0.01$; $p < 0.01$; $p < 0.001$) and glutathione peroxidase ($p < 0.001$; $p < 0.05$; $p < 0.05$), and a decrease in the level of non-enzymatic antioxidants (reduced glutathione) at the erythrocyte and cerebral levels ($p < 0.05$; $p < 0.05$).

All of the aforementioned results reveal visibly that acute and subchronic administration of 5 PTT causes behavioural disturbances with a degree of cytotoxic potential and oxidative and tissue damage in the brain and the liver.

Key words:

5-phenyl-1, 2, 4-triazole-3-thione, brain, liver, anxiety, oxidative stress, erythrocyte, cytotoxic

ملخص

يتمثل هذا العمل في تقييم المتغيرات البيوكيميائية ، السلوكية العصبية و النسيجية و هذا بعد التعرض الحاد لمركب thione 5phenyl 1,2,4 (5 PTT) بتركيز (200 مغ /كغ لمدة 3 ايام) و التعرض المزمن لنفس المركب بتركيز (10 مغ / كغ لمدة 30 يوم) لدى جرذان ويستار.

اظهرت النتائج ان هذا التعرض المزمن ادى الى انخفاض وزن الجسم و وزن المخ مقارنة مع الشواهد ($p < 0.001$, $p < 0.01$) اما بالنسبة لوزن الكبد ف لوحظ زيادة في الوزن ($p < 0.01$) بالإضافة الى التغيرات في مستويات انزيمات الكبد (TGO، TGO) ($p < 0.01$, $p < 0.01$) و ارتفاع كل من نسبة السكر في الدم الكورتيزون ، الكوليسترول و الدهون الثلاثية ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.01$; $p < 0.05$) على التوالي. كما اظهرت التحاليل فقر الدم يتسم بانخفاض كبير في مستويات خلايا الدم الحمراء و الهيموغلوبين ($p < 0.01$; $p < 0.05$).

ايضا لوحظ بعد استخدام اساليب اختبار السلوك المختلفة منها السباحة القسري ، اختبار المجال المفتوح ، اختبار المتاهة المرتفعة و المقصورة المزدوجة الداكنة و الفاتحة لدى الجرذان التي تعرضت سواء على المدى الحاد او المزمن للمركب 5PTT ادى الى ظهور اعراض الاكتئاب ، القلق ، نقص الحركة و الاكتشاف و نقص التعلم المكاني .

بالضافة الى ذلك اظهرت الدراسة التشريحية للجرذان المعرضة الى 5PTT انها الحققت بأضرار على المستويات الدماغية و الكبدية مقارنة مع الشواهد .

كما انه يثير تحاليل النشاط المضاد للأكسدة الخلوية على مستوى الدم ، الدماغ ، الكبد و الكلى ان المركب (5PTT) الذي تم حقنه لدى الجرذان لمدة ثلاث ايام بتركيز 200 مغ / كغ يعطل نشاط الانزيمات المسؤولة عن نشاط المضاد للأكسدة (CAT ,GSH-) ($p < 0.001$; $p < 0.01$; $p < 0.01$) بالنسبة (CAT) اما يخص (GSH- PX) لوحظ انخفاض محسوس على مستوى الدم ، المخ و الكبد بالنسبة للجرذان المعرضة لهذا المركب ($p < 0.05$; $p < 0.05$; $p < 0.01$) و يزيد على هذا انخفاض في مستوى المضادات للأكسدة الغير انزيمية مثل (GST) على مستوى الدم و المخ ($p < 0.05$) على التوالي.

و علا على ذلك هذه النتائج تثبت بوضوح ان تعرض الجرذان سواء بصفة حادة او مزمنة لمركب 5PTT ادى الى الاختلال على مستوى السلوكي و يسبب اضطرابات سلوكية بالإضافة الى تسممات خلوية سواء على مستوى الخلوي ، الدماغي و الكبدي .

الكلمات المفتاحية :

thione 5phenyl 1,2,4 ، المخ ، الكبد ، القلق ، التأكسد الخلوي ، الكريات الدموية الحمراء ، التسمم الخلوي.

Table de matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste d'abréviations

Introduction01

Revue bibliographique

Chapitre I : Les triazoles

I. Historique	03
II. Définition de triazole	04
II.1.L'isomérisation des triazoles.....	04
II.1. 1, 2,3-triazole.....	04
II.2. 1,1,2,4-triazole.....	04
IV. Le tautomérisme dans les triazoles	05
V. Méthodes de préparation de 1, 2,4-triazoles	06
V.1. Synthèse des 1, 2,4-triazoles par 3-mercapto-1, 2, 4-triazoles.....	06
V.2. Synthèse des 3-N, N-Dialkylamino-1, 2, 4-triazoles.....	06
V.3. Synthèse des 1,5-disubstituées-1, 2,4-triazoles.....	07
V.4. Synthèse des 1, 2,4-triazoles par cyclisation des thiosemicarbazides.....	07
V.5. Synthèse des 1, 2, 4-triazole dérivés par dérivés d'amidine et le benzonitrile.....	07
VI. Propriétés physicochimique des triazoles	08
VII. Propriétés biologiques des triazoles.....	09
VIII. Propriétés structurelles des triazoles	09
IX. Classification des triazoles	09
IX.1. La première génération	09
IX.1.1.Le fluconazole	09

IX.1.2.L'itraconazole.....	10
IX.2. La deuxième génération	10
IX.2.1.Le voriconazole	10
IX.2.2.Le posaconazole.....	10
IX.2.3.Le ravuconazole.....	10
X. Mécanisme d'action biochimique des antifongiques triazolés	10
XI. Domaines d'application des triazoles	11
XI.1. Applications agricoles.....	11
XI.2. Application pharmaceutique	12
XI.2.1. Activités anticancéreuses.....	12
XI.2.2. Activités antifongiques.....	12
XI.2.3. Activités antibactériennes	13
XI.2.4. Activités anti-inflammatoires	13
VI.2.6. Activités antioxydantes	13
XI.3. Application industrielle	14
XI.4. Application dans la synthèse chimique	15
XII. La toxico-cinétique du triazole	16
XII.1.Absorption	16
XII.2.Distribution.....	16
XII.3.Métabolisme.....	16
XII.4.Élimination.....	17
XIII. Les effets toxiques du triazoles	17
XIII.1. Effets sur la santé humaine	17
XIII.1.1. Effets sur le système nerveux	17
XIII.1.2. Effets géniques.....	18
XIII.1.3. Effets sur la reproduction et développement	18
III.1.4. Effets hépatiques.....	18

XII.1.5. Effet rénale	19
XIII.6. Effets sur le système endocrinien	19
XIII.2. Impact du triazol sur environnementale et les mammifères	20

Chapitre II : Le stress oxydant

I. Introduction.....	20
II. Les radicaux libres.....	21
III. Les cibles des radicaux libres.....	21
IV. Espèces oxygénés réactives « EOR, ROS ».....	22
V. Origines et destinée des EOR	23
VI. Dégâts oxydatifs cellulaires.....	26
VI.1. La peroxydation lipidique.....	26
VI.2. L'oxydation des sucres.....	27
VI.3. L'oxydation des protéines.....	27
VI.4. L'oxydation de l'ADN.....	27
VII. Les défenses antioxydantes	28
VII.1. Définition des antioxydants	28
VII.2. Le système antioxydant enzymatique.....	29
VII.2.1. Les super oxydes dismutase (SOD)	29
VII.2.2. La catalase	29
VII.2.3. Les glutathions peroxydases (GPX)	29
VII.2.4. Glutathion S-Transférases (GSTs).....	29
VII.3. Le système antioxydant non enzymatique.....	30
VII.3.1. Glutathion réduit (GSH).....	30
VII.4. Antioxydants exogènes.....	30

Matériels et méthodes

I. L'objectif.....	32
II. Protocole expérimentale.....	32
II. Matériel biologique utilisé	32
II.1 Animaux d'expérimentations	32
II.2 La synthèse de 5-phényl 1,2,4 triazole 3-thione	33
II. 3 Préparation de la solution d'injection	34
III. Protocole expérimental.....	34
III.1 Le traitement des rats.....	34
Partie I : exposition subchronique.....	34
I.1 Répartition des groupes.....	34
I.2 Evaluation du poids corporel.....	35
I.3 Etude du comportement de l'animal.....	35
IV.3.1 Test l'open Field	35
IV.3.2.Labyrinthe de Barnes	36
IV.3.3.Test obscurité/lumière.....;	38
IV.3.4 Test du labyrinthe en croix surélevé LCS.....	39
IV.3.5 test du labyrinthe en Y	40
IV.3.6. Comportement de type dépressif : Test de la nage forcée.....	41
V. Sacrifices des rats et prélèvement sanguins.....	41
VI. Prélèvement des organes.....	42
VII. Détermination des paramètres hématologiques.....	42
VIII. Techniques de dosage biochimique.....	43
VIII.1 Dosage de glucose.....	43
VIII.2 Dosage du cortisone	43
VIII.3 Dosage de cholestérol.....	44
VIII.4 .Dosage des triglycérides plasmatiques.....	44

VIII.5. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO)	45
VIII.6. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP)	45
VIII.7. Dosage d'urée.....	45
VIII.8. Dosage de créatinine	46
IX. La technique histologique	46
IX.1. Etude macroscopique.....	46
IX.2. Etude microscopique	46
IX.2.1. Fixation	46
IX.2.2. Déshydratation	46
IX.2.3. La clarification	47
IX.2.4. Imprégnation et inclusion à la paraffine.....	47
IX.2.5. Réalisation des coupes.....	47
IX.2.6. Coloration.....	47
IX.2.7 .Montage des coupes.....	48
Partie 2 : exposition aigue	50
1. Sacrifices et prélèvements du sang et organes.....	50
II. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	50
II.1. Protocole de l'homogénéisation des érythrocytes et organes.....	50
II.2. Préparation de l'homogénat.....	51
II.3. Dosage des protéines.....	51
II.4. Dosage du glutathion réduit (GSH).....	52
II.5. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px).....	53
II.6. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase(CAT).....	54
III. Expression et analyse statistique des résultats.....	54
<u>Résultats</u>	
1^{ère} Partie : Exposition subchronique	
1 .La croissance pondérale et poids de cerveau ,foie et reins	56

2. Les tests neurocomportementaux	57
2.1 .Test de l'open Field.....	59
2.2. Le test de labyrinthe de Barnes	59
2.3 .Test du compartiment obscurité /lumière	60
2.4. Comportement de type dépressif (Test de la nage forcée).....	61
3. Taux de glycémie et la cortisonémie	62
4. Résultats hématologiques	63
5. Dosage des paramètres biochimiques.....	65
5.1. Action sur certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique.....	66
5.1.1. Profile lipidique (cholestérol, triglycérides).....	66
5.1.2. Activité des transaminases l'aspartame aminotransférase (ASAT ou TGO) et l'alanine aminotransférase (ALAT ou TGP).....	67
5.2. Action sur la variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine.....	68
6. Etude histologique de tissus prélevé	69
6.1. Histologie du cortex cérébral.....	69
6.2. Histologie du foie.....	70
6.3. Histologie des reins.....	72
2^{eme} partie : Exposition Aigue	
1. Les tests neurocomportementaux.....	73
1.1. Evaluation d'un comportement d'exploration : test de l'open Field.....	73
1.2. Le test du labyrinthe en croix surélevé.....	74
1.3. Le test du labyrinthe en Y.....	74
1.4 Dosage de la glycémie.....	75
2. Effet sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes tissulaires.....	75
2.1. Activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	75
2.2. Activité de la catalase (CAT).....	78
3. Activité des bio-marqueurs non enzymatiques du statut oxydant Glutathion réduit.....	80
4. Etude histologique de tissu prélevé	82

4.1. Le cerveau.....	82
4.2. Le foie	83
Discussion	84
Conclusion et perspectives	96
Références Bibliographique	8

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de 1,2,3- et 1,2,4-triazoles.....	05
Figure 2 : Structures chimiques des triazoles et leurs formes tautomères.....	05
Figure 3 : Synthèse des 1, 2,4-triazoles par 3-mercapto-1, 2, 4-triazoles.....	06
Figure 4 : Synthèse des 3-N, N-Dialkylamino-1, 2, 4-triazoles	06
Figure 5 : Synthèse des 1,5-disubstituées-1, 2,4-triazoles	07
Figure 6 : Synthèse des 1, 2,4-triazoles par cyclisation des thiosemicarbazides	07
Figure 7 : Synthèse des 1, 2, 4-triazole dérivés par dérivés d'amidine et le benzonitrile	08
Figure 8 : mécanisme d'action des triazoles	11
Figure 9 : Agents antifongiques triazole utilisés en thérapie clinique	13
Figure 10 : Activités pharmacologiques des dérivés de 1,2,4-triazoles	14
Figure 11 : Balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants	20
Figure 12 : L'O ₂ , à l'origine des radicaux libres	22
Figure 13 : Source endogènes des espèces réactives	23
Figure 14 : Origines et actions des espèces oxygénées réactives	24
Figure 15 : Voie métabolique de l'oxygène et des espèces oxygénés réactives	25
Figure 16 : Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production	28
Figure 17 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule	29
Figure 18 : Les rats d'expérimentation.....	32
Figure 19 : Schéma représentant les étapes de synthèse de 5-PTT.....	33
Figure 20 : la molécule du 5-phényl 1,2,4-triazole 3-thiol (5-PTT).....	33
Figure 21 : la solution d'injection.....	34
Figure 22 : mesure du poids des rats.....	35
Figure 23 : test open Field.....	36
Figure 24 : test labyrinthe de Barnes.....	37

Figure 25: test drak and light.....	38
Figure 26: Dispositif expérimental du LCS.....	39
Figure 27 : Dispositif expérimental du test du labyrinthe en y.....	40
Figure 28: l'épreuve de la nage forcée.....	41
Figure 29 : prélèvement des organes (cerveau, foie et reins).....	42
Figure 30 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	49
Figure 31 : réaction d'Ellman.....	52
Figure 32 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	55
Figure 33 : L'évolution du poids corporel des rats pendant 30 jours d'expérimentation...56	
Figure 34: Comparaison du poids du cerveau entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins.....	57
Figure 35: Comparaison du poids de foie entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins.....	57
Figure 36 : Comparaison du poids du rein des sujets témoins et des sujets exposés au 5-PTT.....	58
Figure 37 : Effet de l'exposition des rats au 5 PTT sur l'activité locomotrice et comportement stéréotypé (Test open Field) comparés aux témoin.....	59
Figure 38 (A et B) : effet de l'exposition des rats au 5 PTT sur l'apprentissage et la mémoire spatiale (le labyrinthe de Barnes) par rapport aux rats témoins.....	59
Figure 39: Exploration lors du test obscurité /lumière des rats.....	60
Figure 40 : Comparaison du temps d'immobilité durant le test du la nage forcée entre les sujets témoins et les sujets exposés au 5PTT.....	61
Figure 41 : Comparaison entre la glycémie entre rats traités par 5-PTT et rats témoins.....	62
Figure 42: Comparaison du taux de cortisol entre les rats témoins et les rats exposés au 5 PTT.....	62
Figure 43 : L'effet du 5 PTT sur le taux d'hématocrite.....	63
Figure 44 : L'effet du 5 PTT sur le taux d'hémoglobine.....	63
Figure 45: Comparaison du taux d'érythrocytes entre les animaux témoins et animaux traités au 5 PTT	64
Figure 46: Comparaison du taux des Leucocytesentre les sujets témoins et sujets exposés au 5 PTT.....	64

Figure 47 : L'effet du 5 PTT sur le taux des thrombocytes.....	65
Figure 48 : Comparaison du taux de cholestérol entre les rats traités par 5-PTT et les rats témoins.....	66
Figure 49: Comparaison du taux de triglycérides entre les rats traités par 5-PTT et les rats témoins.....	66
Figure 50 : Comparaison du taux du TGO entre les rats témoins et les rats traites par le 5-PTT.....	67
Figure 51: Comparaison du taux du TGP les rats traités par 5 PTT et les rats témoins.....	67
Figure52 : L'effet du 5 PTT sur le taux sérique de l'urée.....	68
Figure 53: Comparaison du taux de la créatinine entre les rats témoins et les rats exposés au 5 PTT.....	68
Figure 54 : vue au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébral coloré à l'hématoxyline et de l'éosine (G×40).....	69
Figure 55 : Coupe histologique du tissu hépatique des rats traités par le 5 PTT avec la dose(10 mg/kg).....	70
Figure 56 : Coupe histologique d'une section du tissu hépatique des rats traités par le 5 PTT avec la dose (10 mg/kg)	70
Figure 57 : Coupe histologique d'une section du tissu hépatique des rats traités avec la dose (10 mg/kg)	71
Figure 58 : Dans des sections de foie des rats témoins	71
Figure (59) : La Microscopie optique de tissus rénal coloré a l'hématoxyline éosine (Gr.x40).....	72
Figure 60 : Effet de l'exposition au 5 PTT sur l'activité locomotrice et comportement stéréotypé (Test open Field).....	73
Figure 61 : Comparaison entre le nombre d'entré dans le bras ouverts et le temps de séjour dans le bras ouvert chez les deux groupes expérimentaux.....	74
Figure 62 : Comparaison entre pourcentage d'alternance spontanées chez les différents groupes traités et non traitées.....	74
Figure 63: L'effet du 5 PTT sur le taux de la glycémie.....	75
Figure 64: comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau érythrocytaire des rats traites par le 5PTT avec les rats témoins	76

Figure 65: comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau cérébral des rats traites par 5PTT avec les rats témoins	76
Figure 66 : Comparaison de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase au niveau hépatique des rats traites par 5-PTT avec les témoins.....	77
Figure 67 : Comparaison de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase au niveau rénal des rats traites par 5-PTT avec les témoins.....	77
Figure 68: Comparaison de l'activité enzymatique de la Catalase au niveau des érythrocytes des rats traités par 5PTT avec les témoins.....	78
Figure 69 : comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau cérébral chez les rats traites au 5PTT et les rats témoins.....	78
Figure 70: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau hépatique chez les rats traités par 5PTT et les rats témoins.....	79
Figure 71: comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau rénal des rats traites par 5PTT avec les rats témoins.....	79
Figure 72: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau des érythrocytes des rats traités par 5PTT avec les témoins.....	80
Figure 73 : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau cérébral chez les rats traités par 5PTT avec les témoins.....	80
Figure 74 : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau hépatique des rats traités par 5PTT avec les témoins.....	81
Figure 75: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau rénal des rats traités par 5PTT avec les témoins.....	82
Figure 76 : vue au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébral coloré à l'hématoxyline et de l'éosine.....	82
Figure 77: Observation microscopique d'un tissu hépatique coloré à éosine hématoxyline	83
Figure 78: Histologie de section d'un tissu hépatique coloré à éosine hématoxyline.....	83

Liste des Tableaux

Tableau 01 : les propriétés physico chimiques des triazoles	09
Tableau 02 : Les principales espèces réactives.....	22
Tableau 03 : Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage.....	51

LISTE DES ABBREVIATIONS

5PTT: 5phenyl -1, 2, 4 triazole-3 thione
ADN : Acide désoxyribonucléique
AG : Acide Gras
AGPI : Acide Gras Polyinsaturé
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
ANOVA : Analyse de variance
ASS : l'acide sulfosalysilique
ATP : Adénosine Triphosphate
AVS : accident vasculaire cérébral
C₂H₃N₃ : Triazole
CAT : catalase
CYP51 : Sterol 14 α -demethylase
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique.
DRO : Dérivés Reactives de l'Oxygene
DTNB : Acide 5 ,5_dithiobis 2_nitrobonzoïque
EAA : Espèce azotées actives
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
EOA : Espèce oxygénés active
EROs : Espèces Réactive de l'Oxygène
ESA : Espèce soufrées actives
Fd : Facteur de dilution
Fe : Fer
FST : Forced swim test
IP : intrapéritonéa
GPx : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Disulfure de glutathion (Glutathion oxydé)
GST : Glutathion S-transférase
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HCl : Acide chlorhydrique
HNE : 4-hydroxy-2-hexéanal
Mn : Manganèse
MR: Méthicilline-resistant
NO₂ : Dioxyde d'azote
NaCl : Chlorure de sodium
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH : Nicotinamide adénine diphosphate réduit
NaOH : Hydroxyde de sodium
NO• : Monoxyde d'azote
O₃ : Ozone

ONOO• : Peroxynitrite
ONOOH : Nitroperoxyde
OH• : Radical hydroxyle
O₂⁻ Anion superoxyde
¹O₂ : Oxygène singulet
pH : Potentiel hydrogène
RL : Radicaux libres
Se : Sélénium
SEM : Moyenne standard d'erreur
SNC : Système nerveux central
T: lot témoin
TBS : Solution saline tamponnée
U/l : Unité internationale / litre

Introduction :

En médecine moderne, beaucoup des progrès ont été réalisés dans la thérapie antifongique au cours des trois dernières décennies (**Djeffal *et al.*, 2015**).

Le triazole et ces dérivés représentent la catégorie la plus importante des fongicides qui ont acquis beaucoup d'intérêt dans ces derniers temps, ils constituent une classe cruciale des hétérocycles biologiquement actifs (**Rajkumar *et Pancholi.*, 2011 ; Thakur *et al.*, 2016**).

Cette évaluation a porté principalement sur leurs mécanismes d'action, les propriétés pharmacologiques favorables et les spectres d'activité contre un large éventail d'agents pathogènes systémiques (**Heise *et al.*, 2015**).

Parmi les deux types de triazole, les 1, 2, 4-triazole ont attiré une grande attention en raison de leurs grande variété d'activité, de faible toxicité et de bons profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (**Kaur *et al.*, 2016 ; Thiago *et al.*, 2019**) tel que l'effet antibactérien (**Rao *et al.*, 2014**), antifongique (**Hamdi *et al.*, 2019**), anti-inflammatoire (**Desai *et al.*, 2013**) et agrochimique (**Mohamed Oukessou, 2014**).

Cependant, les dérivés triazoliques sont aujourd'hui au cœur d'une problématique d'ordre sanitaire et qui peuvent nuire la survie humaine par la perturbation des fonctions de différents organes dans le corps, y compris les systèmes nerveux, endocrinien, immunitaire, reproducteur, hépatique et rénal. A cet égard, il existe un lien entre l'exposition aux composés azolés et l'incidence des maladies chroniques chez l'homme, telles que : le cancer (**Inrs., 2006**), les maladies neurodégénératives (**Anses., 2011**) et les atteintes hépatique et rénales (**Schmidt *et al.*, 2016 ; Heise *et al.* 2018**).

C'est ainsi que nous sommes intéressés à entreprendre ce travail qui a comme objectif L'étude de l'effet d'une exposition aigue et subchronique au 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione (5-PTT) sur les fonctionnements : cérébral, hépatique et rénal selon deux parties :

- La première partie présente une synthèse bibliographique dans laquelle nous apportons un premier chapitre qui consiste à étudier des généralités sur les triazoles et leurs toxicités, un second chapitre qui traite les effets du stress oxydant sur les macromolécules (lipides, protéines, polysaccharides) et les mécanismes de défense contre ce stress.

- La deuxième partie est l'approche expérimentale, répartie en deux volets :
 - Le premier volet consiste à évaluer l'effet d'une exposition subchronique au 5 PTT à une dose de 10 mg/kg pendant 30 jours chez des jeunes rats Wistar selon deux approches :
 - ❖ Approche neurocomportementale à savoir l'activité locomotrice, test de dépression, test d'anxiété et le test d'apprentissage et mémorisation spatiale.
 - ❖ Approche biochimique et histologique consacré à l'étude des paramètres biochimiques de certains biomarqueurs hépatiques et rénaux ainsi que d'étudier les modifications architectural des tissu cérébral, hépatique et rénal chez des jeunes rats.
 - Le deuxième volet a pour objectif d'étudier l'impact d'une exposition aigue suite à une administration chez des jeunes rats 200 mg/kg de 5 PTT pendant 03 jours pour but de :
 - ❖ Une contribution a une étude sur le comportement cognitif chez des jeunes rats Wistar
 - ❖ Exploration du profil du stress oxydant au niveau hépatique, rénal, cérébral et érythrocytaire ainsi que l'aspect histologique du cerveau et du foie.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
LES TRIAZOLES

I. Historique

Plus que toutes les autres classes antifongiques, les dérivés azolés sont de loin les antifongiques les plus utilisés en clinique. Pour cette raison, ce sont aussi les antifongiques les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode d'action (**Vandeputte, 2008 ; Thiago et al ., 2019**).

Les azolés ont donc été constamment étudiés et améliorés depuis 50 ans. Ces molécules sont utilisées aussi bien dans le traitement des infections fongiques locales que systémiques. On distingue deux catégories d'antifongiques azolés : les imidazolés (Kétoconazole, Nizoral® ; Fluconazole, Triflucan®) et les triazolés (Itraconazole, Sporanox® ; Voriconazole, Vfend® ; Posaconazole, Noxafil®). Les derniers ont été obtenus par N-substitution des imidazolés (**Hincky-vitrat , 2011**). Ils sont plus récents, moins toxiques, plus efficaces (**Yu et al., 2010**) et sont les plus susceptibles d'être améliorés (**Kumari et al ., 2010**).

En 1960, Potts a noté l'utilisation de complexes triazole d'argent pour des applications dans l'industrie photographique (**Zhang et al., 2015**). Le fait que 1, 2,4-triazoles sont assez similaires en géométrie à imidazoles, qui se produisent massivement dans la nature, est deuxième propriété qui a fait les triazoles et les complexes de triazole très prisés composés pour imiter les processus naturels (**Tabassum et al ., 2016**).

Par conséquent, de nombreux chercheurs ont synthétisé ces composés en tant que structures cibles et évalués leurs activités biologiques. Ces observations aident les chercheurs pour le développement de nouveaux composés triazole avec des activités biologiques améliorées (**Dheer et al ., 2017**).

Les chimistes médicaux ont considéré la synthèse de 1, 2, 3 hétérocycles base-triazole que la pierre d'angle de la chimie, dans la première partie du XXe siècle, les chercheurs ont commencé à travailler sur la possibilité d'utiliser 1, 2,3-triazole pour le traitement du cancer et de tumeurs malignes (**Dalvie et al., 2002 ; Kaur et al ., 2016**). A titre d'exemple on peut citer que **Kolb et al**, ont montré que ces composés se comportent comme des unités de liaison rigides, donc ils peuvent imiter les propriétés électroniques des liaisons amides sans la même susceptibilité de clivage hydrolytique (**Kolb et al ., 2003 ; El-Sayed et al ., 2017**).

L'arrivée des triazolés dans les années quatre-vingt-dix a élargi les possibilités thérapeutiques (**Zhang et al., 2015 ; Singh et al., 2017**).

En 1983, le premier triazolé fait son apparition : le kétoconazole, suivi de près par la terbinafine, représentant de la classe des allylamines, ensuite plusieurs triazolés vont être introduits successivement sur le marché le fluconazole (1990), l'itraconazole (1993), le voriconazole (2002) et le posaconazole (2006) (**Hincky, 2011**).

II. Définition de triazole

Le mot triazole fut donné pour la première fois par Bladin en 1885 aux systèmes cycliques carbone-azote de formule moléculaire $C_2H_3N_3$ (**Priscila et al., 2018**). Les triazoles ont été développés dans les années 1970-1980 (**Regnault, 2014**). Ils sont utilisés en agriculture depuis une bonne trentaine d'années (**Petricca et al., 2019**).

Les fongicides à base de triazole sont la deuxième catégorie de fongicides la plus importante selon leur valeur de marché à l'échelle mondiale (**Consulting, 2016**). Tous les triazoles sont d'origine synthétique, ils n'existent pas dans la nature.

III. L'isomérisation des triazoles

En fonction de la position de l'atome d'azote dans l'anneau (**Sharma et al., 2011**). Ils existent 2 types des triazoles (**Khatak et Vema, 2014**) :

III. 1. Les 1, 2,3- triazoles

Les 1,2,3-triazoles sont des composés hétérocycliques non naturels dont leur première a été décrite à la fin de 19^{ème} siècle par Pechmann (**Dehaen et Bakulev, 2015**), ils possèdent une structure pseudo-aromatique, qui se traduit notamment par une interaction entre les liaisons π , ainsi qu'un grand moment dipolaire et une grande capacité à former des liaisons hydrogène ainsi, les 1,2,3-triazoles existent sous la forme 2H-1,2,3-triazole en phase gazeuse et sous les formes 1H-1,2,3-triazole et 2H-1,2,3-triazole en phases solides et liquide (**Thakur et al., 2016**).

III.2. Les 1, 2,4-triazole

Des différentes réactions chimiques montre que le 1,2,4-triazole est un noyau extrêmement stable il peut être considéré comme un composé aromatique (**Kashyap et Silakari, 2018**).

Il existe sous deux formes tautomère, la dénomination adoptée dans les * chemical abstract * reste néanmoins celle de 1,2,4-triazole en précisant sur quel azote se trouve l'hydrogène. Afin de réaliser la représentation correcte de sa structure elle est nécessaire de prendre en considération leur caractère amphotère, la mobilité de l'atome d'hydrogène lié à l'atome de l'azote, la grande stabilité du cycle, ainsi que l'importance du moment dipolaire. (INERIS, 2014).

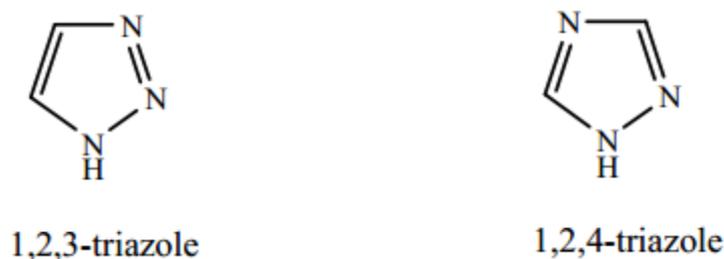


Figure 1 : Structure chimique de 1,2,3- triazole et 1,2,4-triazoles

(Xiao-bo *et* Shanghai 007).

IV. Le tautomérisme dans les triazoles

Le tautomérisme est possible à la fois dans les 2 isomères structuraux de triazoles (Shneine *et* Alaraji., 2014). Chacun d'eux existe sous deux formes tautomères (Oukessou, 2014).

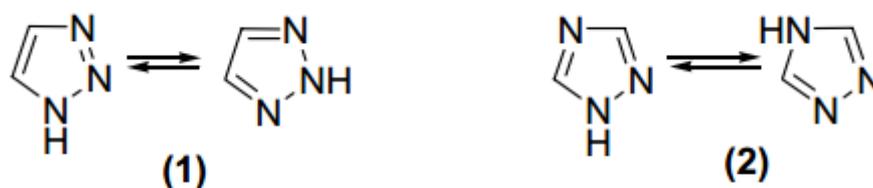


Figure 2: (1): les deux tautomères de v-triazoles (2) : les deux tautomères de s-triazole
(Namratha *et* Santosh, 2014)

V. Méthodes de préparation de 1, 2,4-triazoles

Les composés 1, 2,4-triazole peuvent préparer par plusieurs méthodes, parmi ces méthodes :

V.1. Synthèse des 1, 2,4-triazoles par 3-mercapto-1, 2, 4-triazoles

La méthode la plus simple pour la synthèse de 1, 2, 4-triazole, un mélange,

carbohydrazides(A-3) avec CS₂ (A-4) dans l'hydroxyde de potassium éthanolique pour donner dithiocarbazate (A-5), qui a ensuite réagi avec l'hydrate d'hydrazine pour former le 4-amino-5-aryl-4 H-1, 2, 4-triazole-3-thiol (A-6) (**Namratha et Santosh, 2014**).

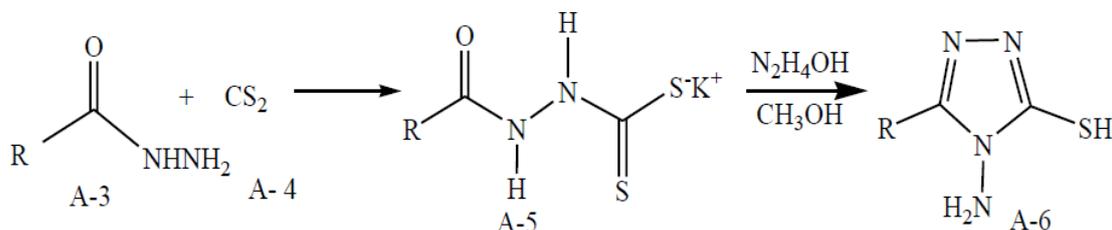


Figure 3: Synthèse de 3-mercapto-1, 2, 4-triazoles (**Nadeem et al ., 2010**)

V.2. Synthèse des 3-N, N-Dialkylamino-1, 2, 4-triazoles:

Le N, N -dialkylamino-1, 2,4-triazoles (A-9) peut être préparé à partir de Sméthylisothiourées(A-7) et d'acyl hydrazides (A-8)en présence de trifluoroacetaldehyde et le tétrahydrofuranne, Les conditions de la réaction sont relativement doux et tolérer un large éventail de groupes fonctionnels (**Batchelor et Beal, 2008**).

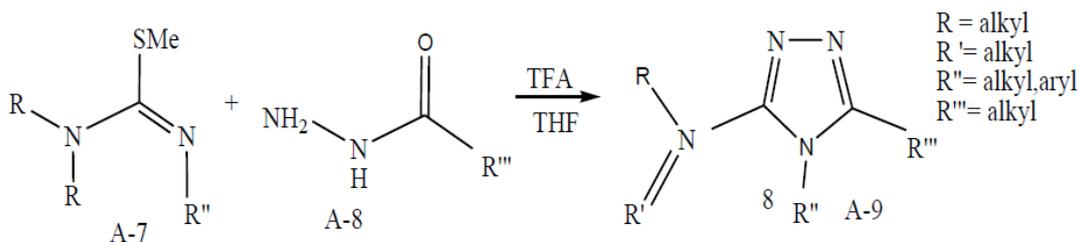


Figure 4 : Synthèse des 3-N, N-Dialkylamino-1, 2, 4-triazoles (**Reddy et al ., 2014**)

V.3. Synthèse des 1,5-disubstituées-1, 2,4-triazoles

Dans l'acide acétique, le dérivé oxamide amidine (A-10) a réagi avec différents sels d'hydrazine hydrochloride (A-11), au bout de 18 h pour former finalement le produit 1,5-disubstituées-1, 2,4-triazole (A-12) (**Laughlin et Bolton, 2010**).

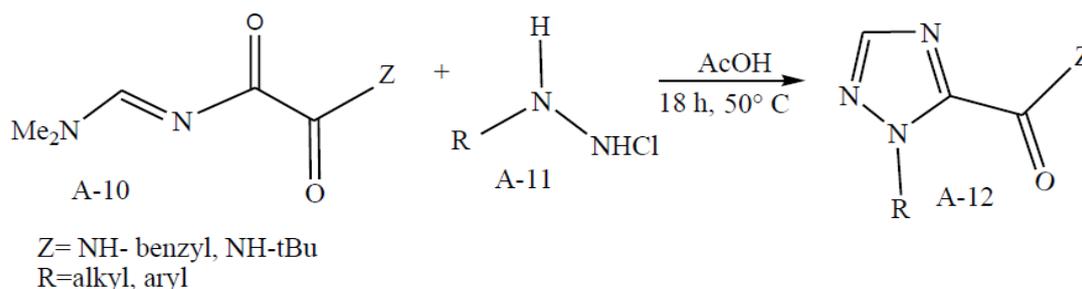


Figure 5 : Synthèse des 1,5-disubstituées-1,2,4-triazoles (Namratha *et* Santosh, 2014)

V.4. Synthèse des 1,2,4-triazoles par cyclisation des thiosemicarbazides

Le chlorure de benzoyle est réagi avec le thiosemicarbazide (A-13) pour donner le produit 2-(arylcabonyle)-hydrazine carbothioamide (A-14), et qui est chauffé sous reflux avec le KOH pour former le produit 3-aryle-1,2,4-triazole-5-thione (A-15)

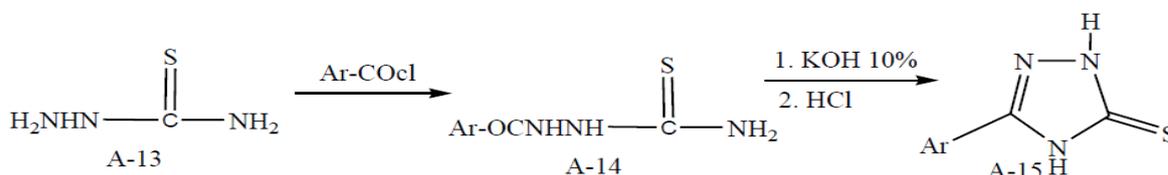


Figure 6 : Synthèse des 1,2,4-triazoles des thiosemicarbazides (Tozkoparan *et al.*, 2010).

V.5. Synthèse des 1,2,4-triazole dérivés par dérivés d'amidine et le benzonitrile

Le 1,2,4-triazole dérivés (A-18) est préparé par des substitué d'amidine (A-16) avec le benzonitrile (A-17), Il s'agit d'une réaction catalysée par le cuivre a lieu en présence de carbonate de césium, le diméthylsulfoxyde et sous une atmosphère d'air propose. (Ueda *et* Nagasawa, 2009).

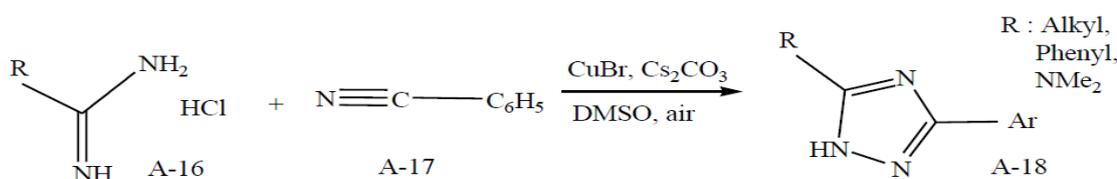


Figure 7 : Synthèse des 1,2,4-triazole dérivés d'amidine et le benzonitrile. (Ueda *et* Nagasawa, 2009).

VI. Propriétés physicochimique des triazoles

Les triazoles sont des produits sous forme de poudre cristalline peu volatile et peu persistante. ils sont généralement commercialisés sous forme des solutions liquide (**Jargot et al., 2010**). Les constituants de cette famille se présentent sous forme solide faiblement miscible dans l'eau (de l'ordre de quelques milligrammes par litre) (**Gouzy, 2006**), ils sont très solubles dans les solvants polaires et peu soluble dans les solvants apolaire du fait de leur moment dipolaire élevé (1.77D pour les 1,2,3-triazoles et 3.17D pour les 1,2,4-triazoles) mais la solubilité dans les solvants apolaires peut toutefois être augmentée par substitution sur l'atome d'azote (**Vandana et al., 2011**)

Les triazoles possèdent un moment dipolaire plus élevé que les liaisons amide, ce qui leur confère des propriétés électrophiles et nucléophiles proches de celles des liaisons peptidiques. En effet, les atomes d'azote du triazole sont accepteurs de liaison hydrogène, tandis que le proton du triazole, très polarisé, peut jouer le rôle de donneur de liaison hydrogène, au même titre que le proton d'une fonction amide (**Horne et al., 2003**).

De plus, les triazoles ont la particularité d'avoir une grande stabilité chimique, ils sont inertes vis-à-vis des différents agents d'hydrolyse, d'oxydation, de réduction, ou d'autres modes de clivage. (**Manetsch et al., 2002**). Cependant certains dérivés sont explosifs comme dans le cas du 3-nitro-1,2,4-triazolo-5-one (**Ostrovskii et al., 1999 ; Mohamed Oukessou, 2014**).

Ajoutant que les triazoles possède d'excellentes caractéristiques d'absorbance de lumière ultraviolet dans la gamme de longueur d'onde et peut être détectée de manière fiable dans des applications typiques de l'eau de refroidissement (analyse à des concentrations de 1 partie par million et plus).

Tableau 01 : les propriétés physico chimiques des triazoles (**Abboud et al., 2001**).

Molécule	%N	Tf (°c)	Teb(°c)	Pka	$\Delta H f$ (KJ/Kg)	Moment dipolaire (10^{-3}) cm
1, 2,3-triazole	61	23	203	9,4	2690	3.23
1, 2,4-triazole	61	121	260	10,1	2345	9.61

VII. Propriétés biologiques des triazoles

Les triazoles possèdent un certain nombre de caractéristiques valorisables dans le contexte de la découverte de principes bioactifs susceptibles d'interagir avec des poches enzymatiques. Par exemple les triazoles sont stables à l'hydrolyse acide ou basique, ainsi qu'aux conditions de réduction ou d'oxydation. (Mohamed Oukessou, 2014).

VIII. Propriétés structurelles des triazoles

L'aromatique est la principale raison de la stabilité du noyau de triazole. Aussi, le noyau de triazole est stabilisé par la résonance qu'il peut être représenté par des formes tautomères. (Obot et Johnson, 2012) .Les 1, 2, 4 triazoles ont deux formes tautomères: 1H-1, 2, 4-triazole et 4H-1, 2, 4-triazole. (Ozimin *et al.*, 2003)

IX. Classification des triazoles

IX.1. La première génération

IX.1.1. Le fluconazole : c'est un agent fongistatique actif contre *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, et *Candida glabrata* .Il est également utilisé pour traiter la méningite, la cryptococcose méningée, systémique et muqueuse candidose chez les patients normaux et dont le système immunitaire est affaibli (Groll *et al.* , 2001).

IX.1.2. L'itraconazole : présente une activité fongicide souche-dépendante contre les champignons filamenteux, à l'exception de certaines souches de *Cryptococcus neoformans* . Il est pris pour traiter les infections fongiques des ongles et qui commencent dans les poumons et se répandent dans tout le corps (Manavathu *et al.* , 1998).

IX.2. La deuxième génération

IX.2.1. Le voriconazole : c'est le traitement de première intention de la candidose oesophagienne, candidémie, l'aspergillose invasive, Candida infections de la peau, les infections de l'abdomen, des reins, la paroi de la vessie, les blessures et les infections causée par *Scedosporium apiospermum* et *Fusarium spp* (Espinel *et al.*, 2001).

IX.2.2. Le posaconazole : c'est un analogue hydroxylé de l'itraconazole. Il possède un large spectre d'activité antifongique contre diverses souches de champignons tels que *Candida spp* résistant aux azoles, *Cryptococcus, neoformans* *Aspergillus spp*, *Rhizopus spp*, *Bacillus dermatitidis* et d'autres champignons filamenteux et dimorphiques opportunistes (Loit *et al.*, 1997).

IX.2.3. Le ravuconazole : c'est un triazole très actif contre un large spectre de champignons, y compris *conidida néoformans* et d'autres espèces de levures, ils ont une activité inhibitrice contre d'autres espèces de champignons filamenteux hyalines et zygomycètes et moules noires ainsi que les isolats qui sont résistants au fluconazole. (Pfaller *et al.*, 2002)

X. Mécanisme d'action biochimique des antifongiques triazolés

Les antifongiques à triazole sont utilisés dans le domaine de l'agriculture et également dans le domaine pharmaceutique. Ils ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique (Aneja *et al.*, 2018).

L'ergostérol est important pour la fluidité et l'intégrité membranaire mais aussi pour les fonctions d'enzyme liées à la membrane, jouant un rôle dans la croissance et la division cellulaire (Granier, 2003 ; Gubbins, 2011). Les triazoles exercent leur activité fongicide en bloquant la synthèse des ergostérols de la membrane cytoplasmique de la cellule fongique (Scodavolpe *et al.*, 2014). Ils ont la capacité à se lier et à inhiber l'activité de lanosterol-14 α -déméthylase fongique (Irfan *et al.*, 2017). Encore plus précisément, ils bloquent le site actif de cet enzyme qui est un cytochrome « CYP51 » (Maumené.2008 ; Amsden *et Gubbins*, 2017). Cet enzyme clé est codé par le gène ERG11 (Figure 8).

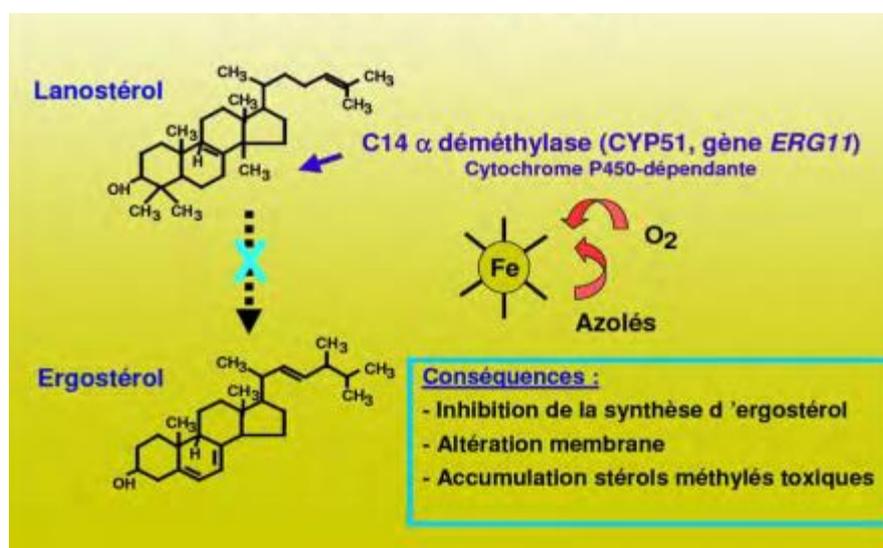


Figure 8 : mécanisme d'action des triazolés (Denis, 2010).

L'inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle triazolé à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme (**Carillo-Munoz et al., 2006 ; Vandana et al., 2011**). En inhibant la synthèse d'ergostérol, les triazoles provoquent la mort du champignon. Cette faculté de blocage leur permet de neutraliser les agents pathogènes (**Maumené, 2008 ; Priscila et al., 2018**).

XI. Domaines d'application des triazoles

L'importance des squelettes hétérocycliques à cinq chaînons à noyau triazole ont attirés beaucoup d'attention à cause de leurs vastes profils biologiques. Ils sont signalés à montrer un large spectre d'applications (**Hamdi et al., 2019**) réussies notamment en médecine humaine vétérinaire, produits agrochimiques et industrielles.

XI.1. Applications agricoles

Les triazoles représentent la catégorie la plus importante de fongicides à ce jour, grâce à leurs excellentes puissances protectrices et curatives (**Thakur et al., 2016**), cette classe des fongicides ont réduit considérablement la sévérité de la maladie par leur longue durée de protection et leur large spectre d'activité (**Oukessou, 2014**), ils sont parmi les fongicides les plus utilisés dans le monde comme des outils importants contre les maladies des gazons résidentiels et commerciaux (**Ambre et al., 2006**), les légumes, les agrumes, les grandes cultures et les plantes ornementales. Ils peuvent être facilement obtenus dans les centres de détail jardin et pépinière par application sous forme de pulvérisations et les traitements de semences foliaires (**Butzen et al., 2005**). Certains fongicides triazoles ont des propriétés anti-sporulant, ce qui signifie qu'ils inhibent la production de spores et donc aident à ralentir le développement de la maladie (**Mueller, 2006**).

Aujourd'hui, en agriculture le contrôle des champignons tels que *Septoria tritici* ou *Gibberella zeae* repose en grande partie sur les triazoles (**Klix et al., 2007**), ils sont les seuls fongicides actuellement utilisés depuis 2004 dans la lutte chimique contre le développement de *Pseudocercospora musae*, Ils bénéficient d'un spectre d'efficacité très large contre les principales maladies des céréales (blé, orge, seigle, triticale), en particulier la protection foliaire du blé et la lutte contre les maladies foliaires (*l'époxiconazole et le metconazole*) de l'épi, oïdium et rouilles, le piétin verse et de nombreux champignons foliaires (**Kjærstad et al., 2010**).

XI.2. Application pharmaceutique

Les triazoles sont présentés dans de nombreux médicaments ils sont incorporés dans la structure de certains antibiotiques comme par exemple le tazobactame ou la céftrizine (Kumar *et al.*, 2013), les caractéristiques portés par ces molécules c'est de rendre les molécules pharmaceutiquement efficaces (Thiago *et al.*, 2019).

XI.2.1. Activités anticancéreuses

La découverte et le développement de nouveaux médicaments anticancéreux efficaces et sélectifs revêtent une grande importance dans les recherches modernes sur le cancer (Shneine *et Alaraji*, 2014). Certains de ces dérivés triazoliques sont connus pour présenter une activité anticancéreuse (Khatak *et Vema*, 2014). Ils possèdent un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses. (Ma *et al.*, 2014 : Kaur *et al.*, 2016).

Des études ont signalé que des composés ayant des groupements triazole, tels que le vorozole et le létrozole semblaient être des inhibiteurs de l'aromatase très efficaces, qui peut à son tour empêché cancer du sein (Abdul rauf *et al.*, 2012).

XI.2.2. Activités antifongiques

Les triazoles sont utilisés dans les applications pharmaceutiques pour le traitement des infections fongiques (IF) locales et systémiques (Martin *et al.*, 2007). Les antifongiques triazolés dont on cite : fluconazole, voriconazole, itraconazole et posaconazole (figure 9) sont indiqués en première ligne dans les traitements préventifs et/ou curatifs des infections fongiques invasives (Scodavolpe *et al.*, 2014).

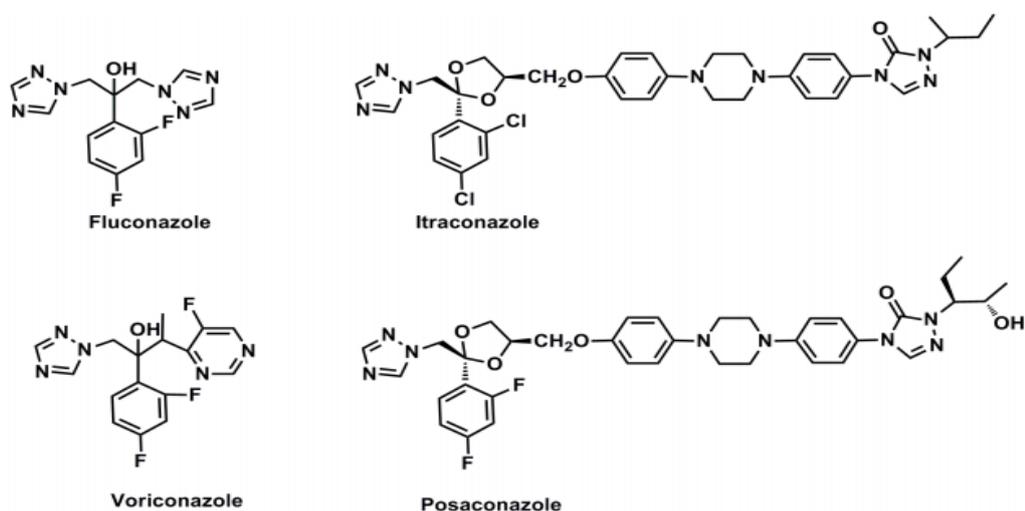


Figure 9: Agents antifongiques triazole utilisés en thérapie clinique. (Andes, 2013)

XI.2.3. Activités antibactériennes

Plusieurs composants qui portent le noyau 1,2,4-triazole présentent des activités antibactériennes, tels que les nouveaux dérivés de 1,2,4-triazolothiadiazole portant une fraction 4-méthylthiobenzyle (**Ledeti et al., 2015 ; Rao et al., 2014**) ont été synthétisés et caractérisés des nouveaux dérivés 1,2,4-triazole, de plus, ils ont été évalués l'activité biologique de 4 - phénoxy-méthyl -5-benzylsulfonyl -1,2,4-triazol-4- méthyl qui a montré une bonne activité antibactérienne (**Shneine et Alaraji , 2014**).

XI .2.4. Activités anti-inflammatoires

Les dérivés 1,2,4 triazole peuvent présenter une activité anti-inflammatoire élevée et une faible toxicité aiguë (**Labanauskas et al., 2004 ; Desai et al .,2013**). Les résultats d'études biologiques ont montré que le dérivé de 1,2,4-triazole d'AINS a un effet anti-inflammatoire et analgésique avec des activités minimales d'ulcères et de peroxydase lipidique (**Mousa et Al-jadaan, 2014**).

XI.2.5. Activités anti-convulsivantes

Les anticonvulsivants sont des médicaments qui évitent ou diminuent la gravité et le taux de convulsion dans différent types d'épilepsie (**Shneine et Alaraji, 2014**). Les dérivés 1,2,4-triazole sont considérés comme des bons anticonvulsivants (**Obot et Johnson, 2012**). L'activité anticonvulsivante a été montrée dans des dérivés d'éther d'oxime de 1- (2-naphtyl) -2- (1,2,4-triazol) éthanone (**Karakurt et al., 2006**).

VI .2.6. Activités antioxydantes

Les dérivés de 4-amino-5-phényl-1,2,4-triazole-3-thiol ont montré des activités antioxydantes prometteuses (**Hameed et Hassaan, 2014**). Les résultats de **Sancak et al.,(2012)** in vitro montrent que les 4- (2,3-diaryl-4H-1,2,4-triazole-4-yl) éthyl) benzène-1,2-diols récemment synthétisés, possèdent des Propriétés antioxydantes très puissantes.

Les triazoles ont également été incorporés dans une grande variété de médicaments thérapeutiquement intéressantes, y compris H_1/H_2 de l'histamine bloqueurs de récepteurs, les stimulants du SNC, les agents anti-anxiété et les sédatifs (**Vandana et Rakesh 2011**)



Figure 10 : Activités pharmacologiques des dérivés de 1,2,4-triazoles

(Shneine *et Alaraji*, 2014).

XI.3. Application industrielle

Les dérivés triazoliques ont suscité un grand intérêt dans l'industrie chimique en effet, il faut souligner les multiples applications de ces composés notamment en tant qu'herbicide, fongicide et agent antimicrobiens (Bentiss *et al.*, 2001).

Dans le domaine des matériaux, les triazoles sont utilisés comme pigments, inhibiteur organique de corrosion, photo stabilisateurs et matériaux photographique (Calderone *et al.*, 2002), quelques dérivés de 1,2,3-triazoles décrit par Wang et coll possèdent même des propriétés fluorescentes destinées à des applications dans la bio conjugaison et la bio imagerie (Sivakumar *et al.*, 2004).

Un nombre important d'articles, de revue, d'outre ouvrages ont évoqué l'utilisation des triazoles comme inhibiteurs de corrosion des métaux en milieu acide (Tamilselvi *et Rajeswari*, 2003), même à très basses concentrations (Ouici *et al.*, 2013), ces composés dont les deux majeurs représentants sont : le benzotriazole et son dérivé méthylé et le tolyltriazole, sont des inhibiteurs de corrosion massivement utilisés dans de nombreux produits comme les liquides antigels, les liquides de refroidissement, les fluides hydrauliques et de coupe de métaux ou les détergents pour vaisselle. Leur toxicité est très peu connu mais leur caractère de résistance à la biodégradation est avéré et les rend

préoccupants. Parallèlement d'autres triazoles ont également été décrits pour la protection du bois de l'attaque fongique (**Bass *et al.*, 1984**).

Les triazoles ont été également proposés comme produits de remplacement de l'eau dans les conducteurs de protons utilisés dans les piles à combustible une fois dopée en membranes, ces triazoles améliorent la conductivité des membranes dans des conditions anhydres. En raison de leur nature amphotère, ces composés agissent comme accepteurs et donneurs de protons (**Subbaraman *et al.*, 2007**).

XI.4. Application dans la synthèse chimique

Les triazoles sont principalement utilisés comme intermédiaires dans la synthèse de principes actifs pour l'agrochimie (fongicides, herbicides) et produit pharmaceutique. Certains dérivés sont également utilisés dans des solutions chimiques pour améliorer le degré de pureté des composants dans l'industrie électronique.

Des travaux montrent que le groupe triazole 1,4-disubstitué présente une similarité structurale avec les liaisons amides. En effet, ce triazole est considéré comme mime de la forme rotamère Z d'une fonction amide, servir de ligand pour les métaux ou lier différentes molécules de complexité variées cette capacité des triazoles pour former un pont entre des ions métalliques sont très importante pour les applications magnétochimique (**Tron *et al.*, 2008**).

Des unités triazole sont également utilisées dans certains cas pour remplacer des liaisons interpeptidiques tout en conservant l'activité biologique initiale. Ils sont notamment utilisés en tant qu'analogues d'acides aminés (**Demko *et al.*, 2002**).

XII. La toxico-cinétique du triazole

XII.1. Absorption

Le triazole est rapidement absorbé après administration orale. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes dans les 2,5 heures suivant l'administration de la solution orale dans des conditions à jeun. (**Janssen, 2013**). La comparaison de l'excrétion urinaire du triazole après administration unique d'une faible dose par voie orale et intraveineuse montre que sa biodisponibilité atteint 100% en 96 h chez les rats (**Jargot *et al.*, 2014**).

XII.2.Distribution

La majeure partie de triazole dans le plasma est liée aux protéines (99,8%), avec l'albumine comme principal composant de liaison (99,6% pour le métabolite hydroxy). Il présente aussi une affinité marquée pour les lipides. Seul 0,2% de triazole est présent librement dans le plasma. Il présente un important volume de distribution apparent dans l'organisme ,ce qui laisse suggérer une distribution étendue dans les tissus, les concentrations dans les poumons, les reins, le foie, les os, l'estomac, la rate et les muscles se sont avérées deux à trois fois plus élevées que les concentrations correspondantes dans le plasma, et l'assimilation dans les tissus kératinisés, la peau en particulier, est jusqu'à quatre fois plus élevée que dans le plasma. Les concentrations dans le liquide céphalo-rachidien sont beaucoup plus faibles que dans le plasma, mais l'efficacité du médicament a néanmoins été démontrée contre des infections présentes dans le liquide céphalo-rachidien. **(Janssen, 2013)**

XII.3.Métabolisme

Le triazole est largement métabolisé en faibles quantités sous forme inchangée sont retrouvés dans les urines et les fèces après administration par voie orale chez les rats **(Jargot *et al.*, 2014)**. Des études in vitro ont montré que le voriconazole est métabolisé par les isoenzymes du cytochrome hépatique P450, CYP2C19, CYP2C9 et CYP3A4. La variabilité interindividuelle du profil pharmacocinétique du voriconazole est importante. Des études in vivo ont montré que le CYP2C19 joue un rôle significatif dans le métabolisme du voriconazole son métabolite principal est le N-oxyde, qui représente 72 % des métabolites radio-marqués circulant dans le plasma. Ce métabolite à une activité antifongique minime, il ne contribue pas à l'efficacité globale du voriconazole. **(Lannelongue, 2010)**.

XII.4.Élimination

Le triazole est éliminé par métabolisation hépatique ; moins de 2 % de la dose étant excrétée sous forme inchangée dans les urines. Après administration d'une dose radio-marquée de voriconazole, environ 80 % de la radioactivité est retrouvée dans l'urine en cas d'administrations intraveineuses répétées, et environ 83 % en cas d'administrations orales répétées. La plus grande partie (>94 %) de la radioactivité totale est excrétée dans les

premières 96 heures suivant l'administration, qu'elle soit orale ou intraveineuse (Lannelongue, 2010).

XIII. Les effets toxiques du triazoles

L'exposition aux fongicides triazole à partir de multiples matrices environnementales a induit des effets néfastes sur la santé des êtres humains et d'autres organismes et a suscité de plus en plus d'inquiétude du public (Lv *et al.*, 2016). Communément utilisés comme agents antifongiques dans l'agriculture et la médecine, les triazoles ont été tératogène dans un ensemble diversifié de modèles animaux (Robinson *et al.*, 2012).

XIII.1. Effets sur la santé humaine

La toxicité de triazole et son potentiel à produire des effets nocif sur la santé, à court ou à long terme, l'évaluation des effets toxiques des triazoles est complexe car de nombreux paramètres sont à prendre en considération ; la durée d'exposition et ses variations et la nature libre ou liée des résidus (Capkin *et al.*, 2006). Les études de toxicité à court terme et chronique sur des animaux de laboratoire révèlent que le foie, les reins et plusieurs glandes endocrines constituent les principales cibles. (Noshy *et al.*, 2018)

XIII.1.1. Effets sur le système nerveux

Les études expérimentales relatives à la toxicité à court terme de 1,2,4- triazole mettent en évidence une neurotoxicité avec une atteinte du système nerveux central (baisse du poids du cerveau, lésions cérébrales, convulsions et tremblements chez le rat et la souris) (Lathe, 2001) et du système nerveux périphérique (dégénérescence des nerfs périphériques chez le rat) (Anses, 2011), exemple le triadimefon qui est un dérivé de triazole augmente l'activité locomotrice et stéréotypée (Reeves *et al.*, 2003).

L'activité motrice diminue chez les deux sexes le jour de l'exposition et des signes cliniques transitoires se manifestent pendant un à plusieurs jours chez les femelles (A.R.L.A.S, 2012), cette exposition a été associée à une diminution du rendement dans la tâche d'apprentissage. Les auteurs ont classés ce fongicide triazole comme une substance neurotoxique potentielle ciblant spécifiquement l'hippocampe (Moser *et al.*, 2001).

XIII.1.2. Effets géniques

En définissant les changements communs dans l'expression des gènes et leurs voies biologiques associées, conduisant à une perturbation de l'homéostasie de la testostérone et

à la toxicité reproductive associée : Les triazoles ont augmenté le catabolisme des acides gras, ont réduit la biosynthèse de l'acide biliaire, la biosynthèse du cholestérol et le métabolisme des stéroïdes altérés (**Goetz et Dix, 2009**).

XIII.1.3. Effets sur la reproduction et développement

Des effets sur les organes reproducteurs sont observés avec une baisse de poids des testicules associée à des modifications histopathologiques chez la souris (**Lv et al., 2017**), et une augmentation des corps jaunes chez les rates. Une étude sur deux générations chez le rat a mis en évidence des effets sur la fertilité (changements morphologiques du sperme, baisse des sites d'implantation et infertilité) ainsi que des effets de toxicité générale (baisse du gain de poids) et de neurotoxicité (baisse du poids du cerveau, lésions cérébrales). Le 1,2,4-triazole induit une toxicité pour le développement du rat et du lapin (**Anses, 2011 ; Noshy et al., 2018**). Certaines études chez les rats ont associé l'exposition au flutriafol à la diminution du poids corporel (**Santana et al., 2009**).

XIII.1.4. Effets hépatiques :

L'exposition aux triazoles provoque des effets sur le foie qui se manifeste d'abord par une augmentation du poids, une hypertrophie hépatocellulaire centrolobulaire et de la cytotoxicité (nécrose des hépatocytes) (**Noshy et al., 2018**). Des modifications du métabolisme lipidique chez le rat à court terme, ont été détectées dans une étude chronique (**Nesnow et al., 2009**). Le myclobutanil pourraient perturber les fonctions biologiques régulées par les récepteurs nucléaires hépatiques incluant l'altération de l'expression des gènes des cytochromes P450 et autres enzymes de métabolisation de xénobiotiques, ce mécanisme pourrait être responsable de l'hépatotoxicité (**Jargot et al., 2016**). Certaines études chez les rats ont montré une hépatotoxicité avec altérations du volume du foie et de l'hypertrophie après l'exposition au flutriafol (**Santana et al., 2009**). L'exposition au triadimefon peut également provoquer de multiples effets toxiques hépatique chez les mammifères (**Xi et al., 2012**).

XIII.1.5. Effet rénale

Après une exposition à court terme au triazole, la toxicité rénale est plus marquée chez le chien, peu évidente chez le rat et absente chez la souris. Chez le chien et le rat, les effets incluent une augmentation du poids des reins et une légère augmentation des

concentrations ioniques du sang. Chez le chien, on note également une hypertrophie des reins et des tubules corticaux, la présence de corps apostoliques ainsi que des altérations transitoires de la chimie urinaire. On constate peu d'effets durables chez le rat (pyélite accrue, basophilie des tubules corticaux et légers changements de la chimie urinaire). Dans le cas de doses faibles, une augmentation de la masse des reins constitue le seul effet évident dans l'étude chronique. (A.R.L.A.S, 2012).

XIII.1.6. Effets sur le système endocrinien

Au cours des dernières années, de nombreux fongicides triazole ont été signalés comme des perturbateurs endocriniens potentiels et peuvent interférer avec la biosynthèse des hormones stéroïdiennes chez les mammifères (Lv *et al.* , 2016). Le tebuconazole et fluconazole ont induit une diminution de la sécrétion de testostérone (Roelofset, 2014). Le flutriafol est aussi considéré comme un perturbateur endocrinien (Santana *et al.*, 2009). Des doses plus élevées affectent également le poids de l'hypophyse, des testicules, de l'utérus et des ovaires chez le rat (Crouse *et al* 2015).

XIII.2. Impact du triazol sur l'environnementale et les mammifères :

D'un point de vue écologique les triazoles ne sont pas des produits anodins en effet ils sont responsable de nombreux effets toxiques secondaires causant des risques potentiels pour l'environnement (Relyea, 2009). Les animaux absorbent les produits triazoliques via la nourriture ou l'eau d'alimentation via l'aire respiré ou au travers la peau, ayant franchi divers barrières ,le toxique atteint les sites de métabolisme ou il est stocké, cette exposition peut engendrer chez les mammifères tout une gamme d'effets dont des baisses spectaculaires de fertilité souvent remarqué (François, 2010).

CHAPITRE II
LE STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif

I. Introduction

La notion de stress oxydant a été évoquée en 1956 par Denham Harman lorsqu'il émit l'hypothèse que le vieillissement serait dû en partie à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les **Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)** (Fatmi *et al.*, 2013 ; Hamdi *et al.*, 2019).

Le concept de stress oxydant fut développé par Sies et ses collaborateurs avec des termes synonymes tels que «stress pro-oxydant» ou «stress réducteur», décrivant le stress oxydant comme un déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants (Yang *et al.*, 2018). Cette notion était modifiée en le définissant comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Browne *et al.*, 2008 ; Powers *et al.*, 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Hattab *et al.*, 2015).

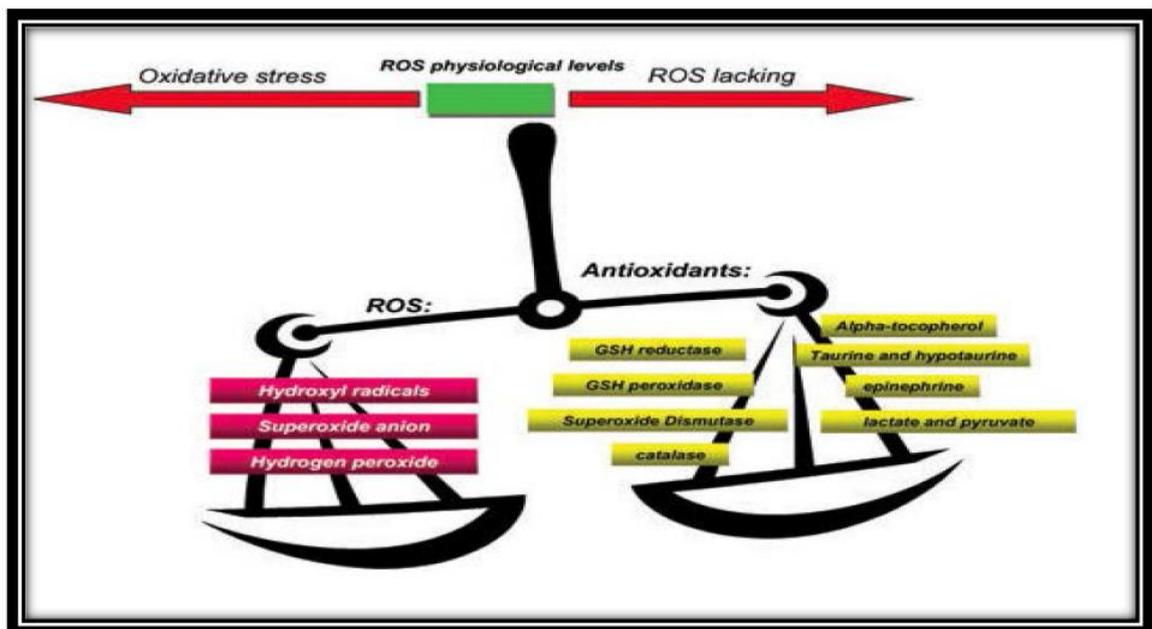


Figure 11 : Balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants (Fontaine, 2007).

II. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des composés réactifs qui ont un ou plusieurs électrons non appariés dans leur valence (Narra *et al.*, 2017). Il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre (Exemple : $\cdot\text{OH}$) (Mac Laren, 2007 ; Satpute *et al.*, 2017). Leur durée de vie est très courte allant de quelques millisecondes à quelques nanosecondes. Ils peuvent entraîner des lésions tissulaires en captant des électrons d'une molécule stable pour essayer d'apparier leurs propres électrons, laissant ainsi la molécule originale dans un état instable (Filaire et Toumi, 2012). Les DRO (Dérivés Réactifs de l'Oxygène) constituent la plus importante classe des espèces à radical libre qui soit formé dans les systèmes vivants (Finaud *et al.*, 2006). On peut distinguer les radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...) (Favier, 2003 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003). Actuellement, on emploie le terme espèces réactives de l'oxygène ERO pour désigner un ensemble plus large de molécules :

- ❖ Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, les radicaux hydroxyles $\text{HO}\cdot$, peroxyde $\text{ROO}\cdot$, alkoxyde $\text{RO}\cdot$) (Favier, 2003).
- ❖ Des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et le nitroperoxyde (ONOOH) mais qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux libres (Favier, 2003).

III. Les cibles des radicaux libres

Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, entraînant la très grande réactivité de ces espèces chimiques vis-à-vis des lipides, des protéines (Goudable *et al.*, 1997). L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

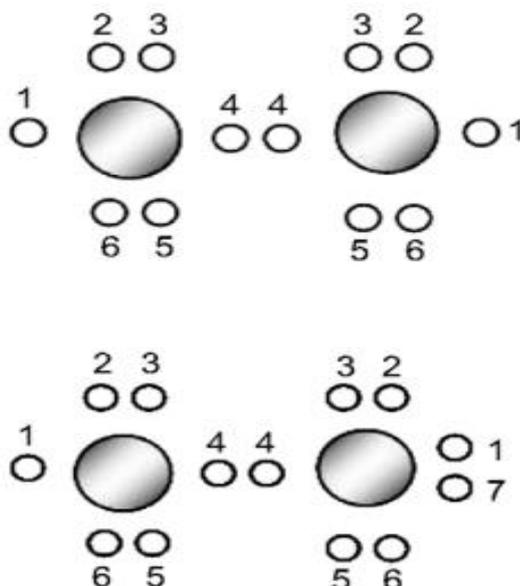


Figure 12 : $L'O_2$, à l'origine des radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

IV. Espèces oxygénés réactives « EOR, ROS »

Les ROS (Reactive oxygen species ou Espèces Réactive d'Oxygène) sont des molécules simples issues du métabolisme de l'oxygène, produites physiologiquement dans tous les organismes aérobies (Guerby *et al.*, 2015). La principale source endogène d'ERO est la chaîne de transfert d'électron des mitochondries ; la production d'oxydant par les neutrophiles et les macrophages est également une source importante qui dépend de l'activité enzymatique de la NADPH-oxydase pendant l'emballage oxydatif des cellules inflammatoires (Lamprecht *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2009).

Tableau 02 : Les principales espèces réactives (Poisson, 2013)

Espèces Radicalaires	Espèces non Radicalaires
Anion superoxyde (O_2^-)	oxygène singulet (1O_2)
Radical hydroxyle ($\cdot OH$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Monoxyde d'azote ($NO\cdot$)	Nitroperoxyde ($ONOOH$)
Grande instabilité : Stabilisation par réaction avec les constituants cellulaires	Eléments de décomposition pour la détoxification par les systèmes

La présence de pro-oxydants peut transformer les oxydants en des formes plus réactives, comme par exemple, le fer qui favorise la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyle ($HO\bullet$) (Kirschvink *et al.*, 2008). Dans les mitochondries qui produisent en particulier des radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) et des H_2O_2 , la présence simultanée d'AGPI, des protéines, d'oxygène, d'électrons, et de fer, font des membranes mitochondriales un site particulièrement sensible aux attaques radicalaires (Kehrer, 2000). L'oxygène est l'accepteur final d'électron en provenance des substrats énergétiques, sa réduction ne peut se faire qu'un électron à la fois (réduction univalente) et de ce fait il résulte une production inévitable d'intermédiaires très réactifs. Il est estimé que 2 à 5% de l'oxygène consommé est transformé en $O_2^{\bullet-}$ (Finaud *et al.*, 2006 ; Mac Laren, 2007).

Les Sources exogènes d'espèces réactives de l'oxygène sont surtout d'origine physique et chimique (ex. radiations X ou gamma, UV (315- 400 nm), radiolyse de l'eau, réactions photochimiques) (Belkheiri, 2010).

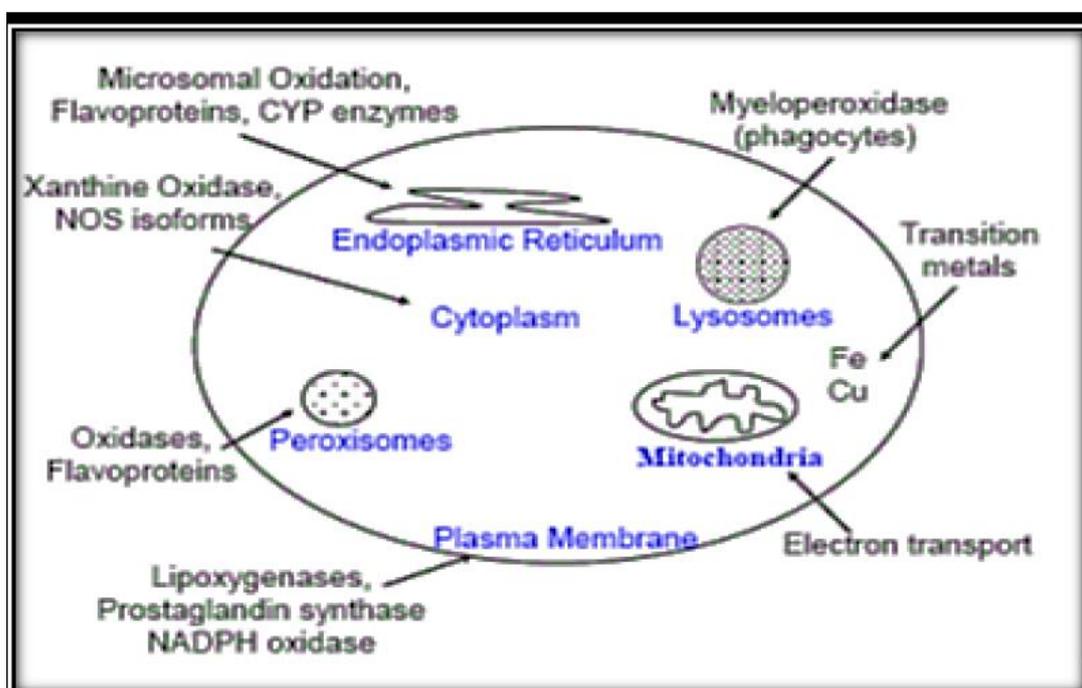


Figure 13 : Source endogènes des espèces réactives (Mercan, 2010).

V. Origines et destinée des espèces oxygénée réactives

La mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'ERO (Barouki *et Morel*, 2001). Les ERO peuvent provenir aussi des peroxysomes et le cytoplasme (Barouki, 2006).

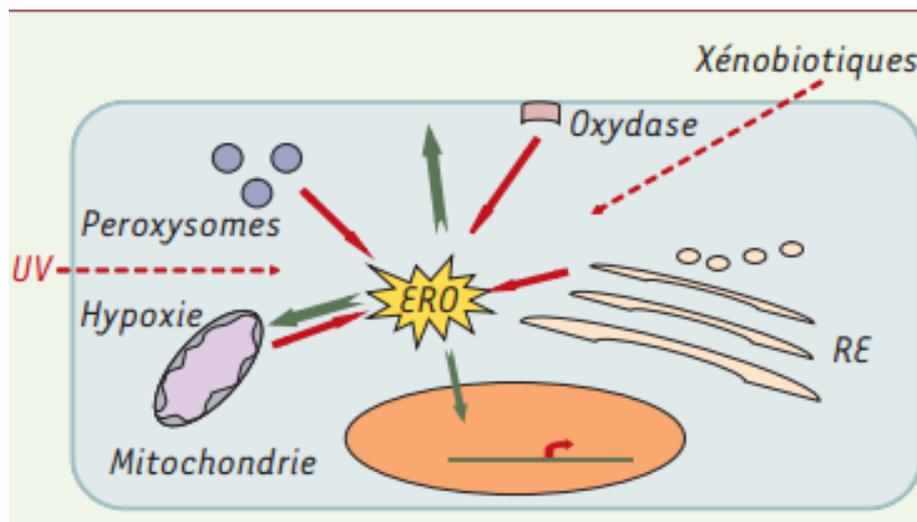


Figure 14 : Origines et actions des espèces oxygénées réactives (Barouki, 2006).

A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolestants le dioxygène est indispensable à la production d'énergie (Migdal *et Serres*, 2011). Cette production d'énergie « sous forme d'ATP » appelée phosphorylation oxydative se fait notamment par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries (Mazat *et Ransac*, 2010).

L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée avec la production de 38 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique (contre 2 seulement dans un processus anaérobie) (Pincemail *et al.*, 2009). La molécule d'oxygène est réduite par quatre électrons sans libérer d'espèces radicalaires (Favier, 2003) selon la réaction suivante :



Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles (Koppenol, 2001). Au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système respiratoire, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Favier, 2003).

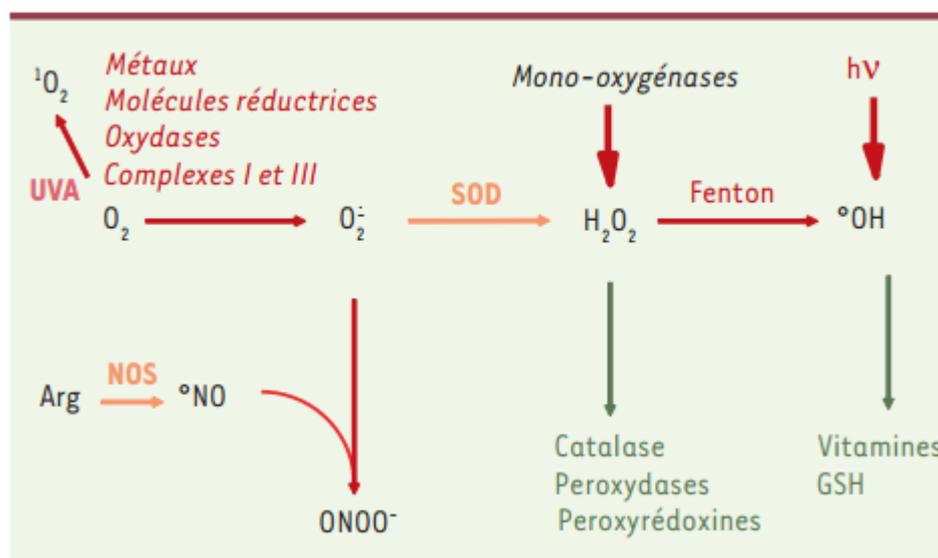


Figure 15: Voie métabolique de l'oxygène et des espèces oxygénées réactives

(Barouki., 2006).

❖ **Le radical superoxyde « O₂^{•-} »**

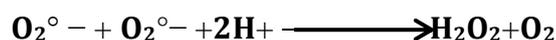
Il est principalement formé lors de la chaîne de transport des électrons au niveau des complexes I et III de la membrane interne des mitochondries, sous l'influence du coenzyme Q10 réduit, de l'enzyme NADH-déshydrogénase et en présence d'oxygène (Sayre *et al.*, 2008). Le radical superoxyde est également formé sous l'influence de métalloenzymes endommagées ou altérées par mutation génétique et peut être produit par des NADPH oxydases au niveau des membranes des cellules du système immunitaire où il contribue à l'action bactéricide. Les enzymes xanthine oxydases rencontrées dans le cytosol pratiquement de tous les tissus sont capables de produire des radicaux superoxydes à partir de la base purique nucléotide hypoxanthine et d'oxygène (Lamprecht *et al.*, 2004).



La réactivité du O₂^{•-} est limitée et son action sera plus le résultat des produits beaucoup plus agressifs qui en sont dérivés en particulier le radical hydroxyle (HO•) (Massart, 2011). Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003).

❖ **Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ :**

Au niveau de la mitochondrie, sous l'action catalytique du superoxyde dismutase (SOD), le radical superoxyde O₂^{•-} est réduit en peroxyde d'hydrogène.



L'H₂O₂ bien que n'étant pas un radical libre joue un rôle important dans le stress oxydant. Il est non ionisé et de faible charge ce qui facilite sa diffusion à travers des membranes mitochondriales et cellulaires, ceci en fait un vecteur important de diffusion du radical hydroxyle (HO•), dont il est précurseur par réaction de Fenton/Haber-Weiss (**Van Helden *et al.*, 2009**). Son rôle facilitateur en fait un des agents les plus actifs des dommages causés par oxydation aux macromolécules (**Hempel *et al.*, 2009 ; Van Helden *et al.*, 2009**).

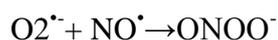
❖ Le radical hydroxyle « OH• »

Le radical hydroxyle est le plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant (**Migdal *et Serres*, 2011**). Il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de Fenton. Ceci est en présence de métaux, en particulier de fer Fe²⁺ (**Barouki, 2006**).



La génération de radicaux HO• est un événement crucial puisque ces radicaux sont les plus réactifs actuellement connus et qu'ils ne semblent pas pouvoir être détoxifiés par voie enzymatique (**Laguerre, 2008**).

Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est produite par les systèmes enzymatiques NO synthases «NOS », à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**Favier, 2003**). Le NO interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite, composé extrêmement réactif et toxique, le NO et peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés (**Barouki., 2006**).



VI. Dégâts oxydatifs cellulaires

VI.1. La peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides ou peroxydation lipidique, correspond à la détérioration oxydative de doubles liaisons d'acides gras insaturés (AGI), qu'ils soient libres ou estérifiés dans des esters de glycérol (tissu adipeux), de phospholipides (membranes), ou de cholestérol (**Velasco *et al.*, 2004**). Les AGPI des membranes sont particulièrement vulnérables du fait de leurs multiples doubles liaisons (**Spiteller, 2006**). Ils peuvent être

peroxydés de forme enzymatique ou non enzymatique (autoxydation par RL ou métaux bivalents, photo-oxydation par l'oxygène singulet), et générer des produits primaires de la peroxydation lipidique sous la forme de diènes conjugués (DC) et d'hydroperoxydes lipidiques (ROOH ou LOOH). Par clivage, ils pourront être convertis en produits secondaires de la peroxydation lipidique comme des aldéhydes, des hydrocarbures volatiles (**Velasco et al., 2004**). Il existe une très grande variété de produits et sous-produits de la peroxydation lipidique, souvent utilisés comme des biomarqueurs (**Clarkson et Thompson, 2000 ; Spitteller, 2006 ; Finaud et al., 2006**).

VI.2. L'oxydation des sucres

Les sucres sont attaqués par les ERO (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ ou des radicaux peroxydes d'AG), avec abstraction d'hydrogène au niveau d'une des liaisons CH-OH. Le radical alkyles ($\bullet C-OH$) ainsi formé se combine immédiatement avec de l'oxygène pour former un carbonyle (C=O) et expulser un radical hydroperoxyde ($\bullet OOH$). L'opération se prolonge jusqu'à former un composé dicarboxylé (**Spitteller, 2006**). Par auto-oxydation des sucres comme le glucose forment des composés dicarboxylés (contenant deux C=O), dont les plus connus sont les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines par réaction de Maillard et altérer les propriétés chimiques de ces protéines (**Wells-Knecht et al., 1995**).

VI.3. L'oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Il a été estimé que les protéines pouvaient piéger la majorité des ERO générés (50– 75%). Leur oxydation affecte la fonction des protéines qui peuvent se fragmenter ou former des agglomérats les rendant susceptibles à la protéolyse et résulte en la formation des protéines carbonylées (PC) dont l'accumulation peut être dosée comme témoin de l'oxydation (**Fisher-Wellman et Bloomer, 2009**).

VI.4. L'oxydation de l'ADN

Tant dans les mitochondries que dans le noyau des cellules, des dommages oxydatifs sur les bases de l'ARN, l'ADN et sur d'autres structures génomiques peuvent se produire par réactions de Fenton, sous l'effet d'aldéhydes de la peroxydation lipidique comme les oxo-nonénales (ONE) et par des peroxy-nitrites (**Sayre et al., 2008**). Ces altérations peuvent conduire à des scissions d'ADN et avoir une action mutagène (**Sayre et al., 2005 ; Bloomer et al., 2008**). La peroxydation lipidique est également capable d'affecter la prolifération des cellules en formant des liaisons intra et intermoléculaires entre les acides aminés sulfurés des ARN, ADN et des protéines (**El-Mesery et al., 2009**). Les guanines

sont préférentiellement attaquées et le produit de leur dégradation peut être détecté par le dosage de la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) dans le sang et dans l'urine (Lamprecht *et al.*, 2004, Finaud *et al.*, 2006). Des 8-hydroxyguanosine (8OHG) ont également servi de marqueur de l'oxydation de l'ARN (Sayre *et al.*, 2008). Les guanines oxydées de l'ADN est normalement éliminée par les enzymes OGG1 (oxoguanine DNA glycosylase) (Radak *et al.*, 2008).

VII. Les défenses antioxydantes

VII.1. Définition des antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007). Un antioxydant est une substance qui, présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell *et al.*, 1989). Les antioxydants agissent comme des agents protecteurs physiologiques pour prévenir des lésions oxydatives engendrées par un excès de EROS (Guerby *et al.*, 2015).

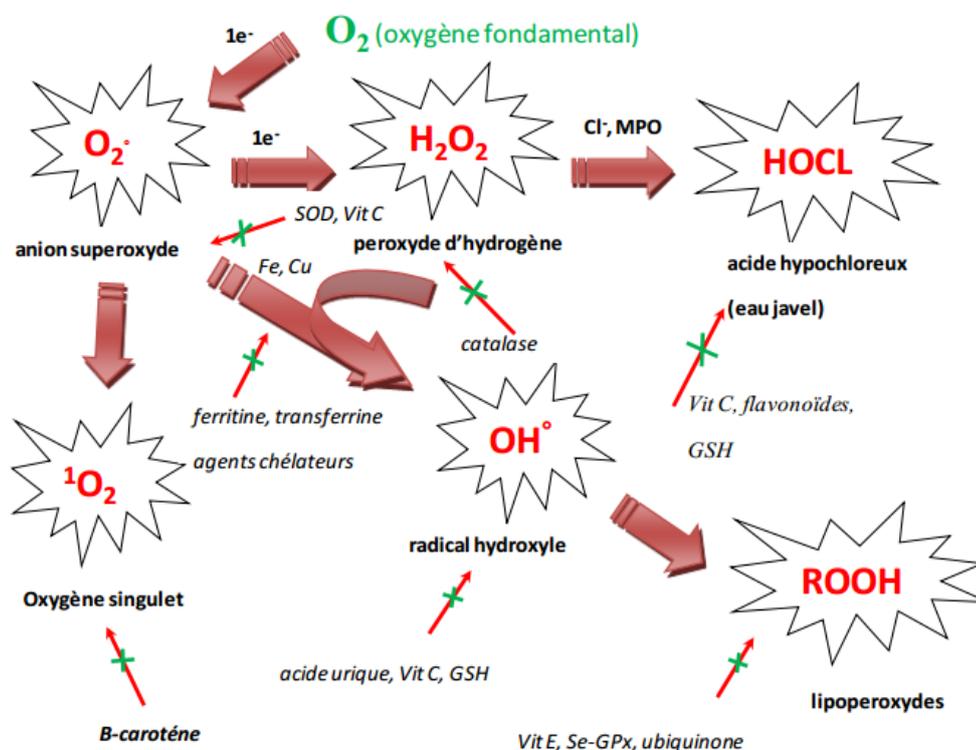


Figure 16 : Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng *et al.*, 2007).

Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre et al., 2005).

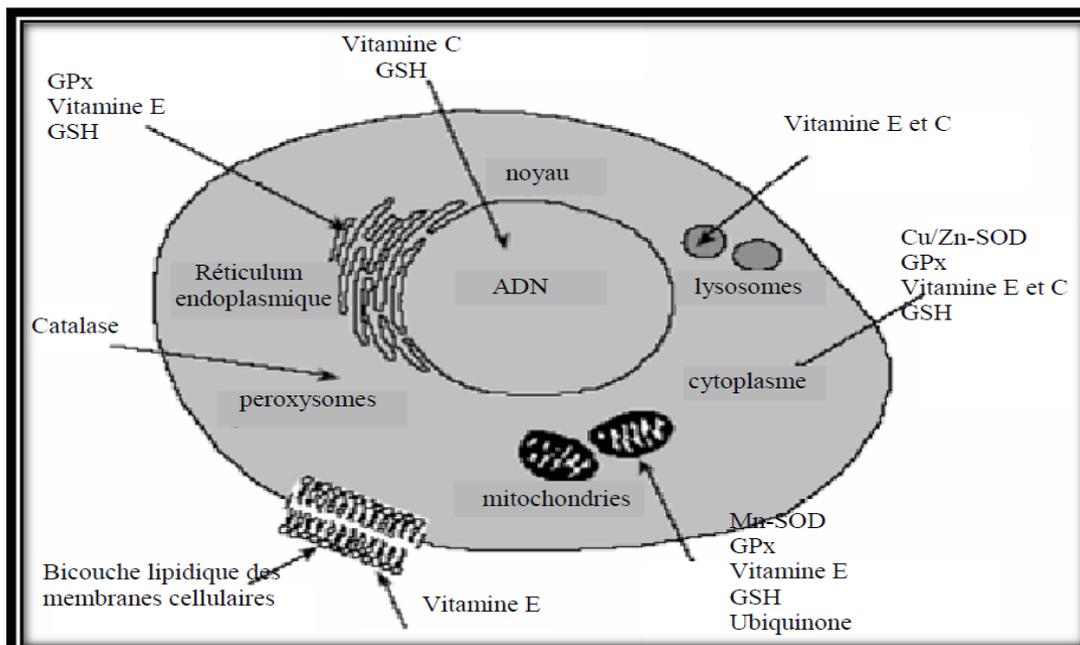


Figure 17: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule

(Garait, 2006).

VII.2. Le système antioxydant enzymatique

L'organisme possède des enzymes qui peuvent métaboliser les EOR. Les plus connues sont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la catalase (Morena, 2002). Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes « Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Se-GPx » (Pincemail et al., 2002).

VII.2.1. Les super oxydes dismutase (SOD)

La famille des SODs représente un important système d'enzymes contenant des métaux dans leur centre catalytique, favorise la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et en O_2 . Les SOD sont des métalloenzymes qui contiennent soit du manganèse (Mn-SOD), soit du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD), et qui sont restreintes à des compartiments cellulaires différents (Ré et al., 2005). La SOD dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse (Mn-SOD) est présente dans les mitochondries (Gardès-Albert et al., 2004).

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en H₂O₂ et en OH⁺ et OH⁻ Selon la réaction suivante : $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$

VII.2.2. La catalase

La catalase (CAT) est une protéine ubiquitaire fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. Dans toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, elle est localisée presque exclusivement dans les peroxyosomes (riches en oxydases) ce qui limite son action par rapport à des peroxydases cytoplasmiques. Cette enzyme métabolise l'H₂O₂ résultant de l'action des SOD ou celui génère par l'action des oxydases pour donner de l'eau. En éliminant l'H₂O₂, la CAT détoxifie indirectement la cellule des O₂^{•-} qui sont transformés en H₂O₂ par les SODs. Cette enzyme possède également une activité de peroxydase qui lui permet de réagir avec des peroxydes et des alcools organiques ainsi que toute molécule capable de donner de l'hydrogène à l'eau (**Wassmann *et al.*, 2004**).

La CAT est très efficace en présence d'un stress oxydant élevé et protège les cellules contre la production de H₂O₂. La catalase est une enzyme tétraédrique, chaque sous unité comporte un groupement ferri protorphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe⁺³ et une molécule de NADPH. (**Dellatre *et al.*, 2005**).

VII.2.3. Les glutathions peroxydases (GPX)

Les GSHPX réduisent le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (**Goudable, 1997**).

VII.2.4. Glutathion S-Transférases (GSTs)

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires. Les GST complètent l'action des glutathion peroxydases (GSH-Px) dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génotoxiques causés par les composés électrophiles générés comme

produits de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Hayes et Pulford, 1995**).

VII.3. Le système antioxydant non enzymatique

VII.3.1. Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) qui représente le groupement thiol majoritaire au niveau intracellulaire . Il possède un fort pouvoir réducteur et peut également chélater les ions Cu^{2+} et ainsi limiter leur participation à la génération d'ERO par les réactions de type Fenton (**Migdal, 2011**).

Ce peptide est retrouvé en grande majorité dans les organes fréquemment exposés aux toxines (reins, foie, poumons et intestins) (**Gate et al., 1999**) , tandis qu'une quantité limitée est retrouvée dans les fluides biologiques (**DeLeve et Kaplowitz, 1991**). Sous sa forme réduite, le GSH agit comme antioxydant

- En tant que piègeur de radicaux, il possède la capacité de lier directement les radicaux libres et de détoxifier indirectement les oxydants à travers des réactions enzymatiques (**Fang et al., 2002**)
- En tant que cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes (GSH-Px, GST)
- En participant à la détoxification des lipides hydroperoxydes par l'action de la peroxyredoxine 6, En régénérant l' α -tocopherol et l'acide ascorbique sous leur forme active (**Masella et al., 2005**).

VII.4. Antioxydants exogènes

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (**Mesouar et al., 1989**). Ce type d'antioxydant est appelé piègeur (**Favier, 2003**).

MATERIELS ET METHODES

I. L'objectif

Notre travail a pour objectif d'évaluer le statut neurocomportemental, histologique et oxydatif suite à une exposition aigue et subchronique au 5-phényl 1,2,4 triazole 3-thione (5PTT) chez des jeunes rats wistar.

II. Matériel biologique utilisé

II.1 Animaux d'expérimentations

Les expériences sont réalisées sur des jeunes rats, albinos, de la souche Wistar, pesant de $60 \text{ g} \pm 2$ grammes. Disposées dans une animalerie ventilée, à une température de $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Un éclairage artificiel établit un cycle jour/nuit (jour entre 7 et 19h). Les animaux sont hébergés dans des cages en plastique spécialisées avec libre accès à l'eau et la nourriture standard (AL ALF) (**tableau 02**). Les expérimentations ont eu lieu dans le laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes de la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar, Saida. (**Figure 18**).



Figure 18: les rats d'expérimentation

Tableau 02 : Composition du régime d'entretien (régime standard)

Composition	Quantité (%)
Protéines végétales	14,5
lipides	7,5
Glucides	55,8
Cellulose	5,4
Humidité	11
Matière minérale	9,5
Energie métabolisable (kJ/g)	14,60

II.2 la synthèse de 5-phényl 1, 2, 4 triazole 3-thione

Les hétérocycles 5-phényl 1, 2,4-triazoles 3-thione ont été synthétisés au laboratoire chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Dr. Moulay Tahar Saida, par l'intermédiaire hydrazide de l'acide benzoïque. L'acide benzoïque est subit une estérification par le méthanol absolu en présence d'une quantité catalytique de l'acide H_2SO_4 concentré (Almasirad *et al.*, 2004). Le benzoate de méthyle obtenu est ensuite traité avec de l'hydrazine hydraté dans l'éthanol absolu comme solvant ce qui a abouti à la formation de benzohydrazide correspondant (Karthikeyan, 2009) (figure 19).

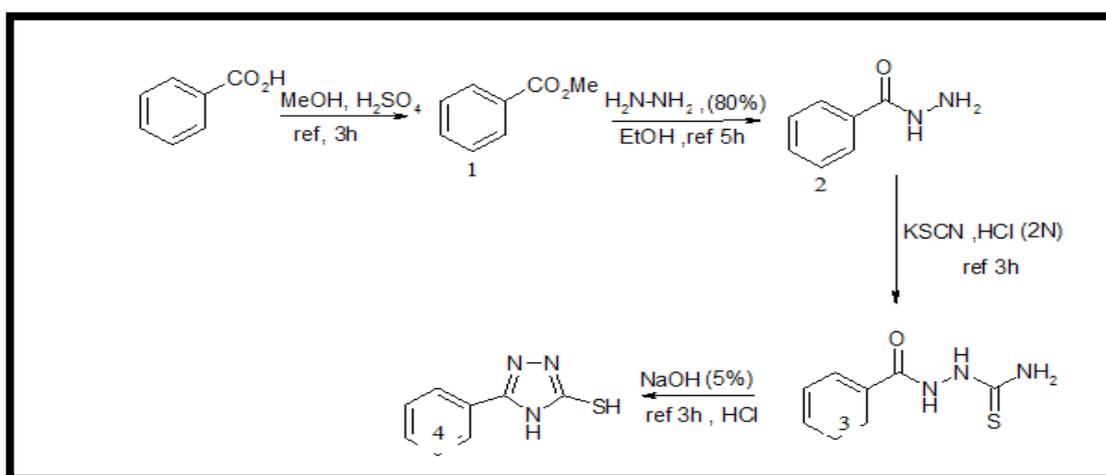


Figure 19: Les différentes étapes de la synthèse de 5-phényl 1,2,4 triazole. 3-thione

L'acylthiosemicarbazide est préparé par addition nucléophile de benzohydrazide (Karthikeyan, 2009) sur le thiocyanate de potassium en milieu acide chlorhydrique pour donner l'acylthiosemicarbazides avec un bon rendement. La Cyclisation intramoléculaire de cette intermédiaires acylthiosemicarbazides (Rostom *et al.*, 2003). dans une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (4%) sous reflux conduit à la formation de 5-phényl 1, 2,4-triazoles 3-thione (Agrawal *et al.*, 2011).(Figure 20)

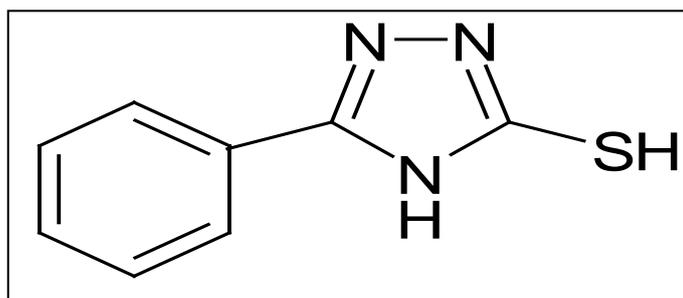


Figure 20: structure du du 5-phényl 1,2,4-triazole 3-thione (5-PTT)

III. Préparation de la solution d'injection

La solution d'injection pour notre expérimentation a été préparé par la solubilisation de produit solide le 5-phényl 1,2,4 triazole 3-thione dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) Sous forme liquide utilisable pour les injections. (**Figure 21**)



Figure 21: la solution d'injection

IV. Protocole expérimental

IV.1 Le traitement des rats

Dans notre expérimentation nous avons procédé au traitement des jeunes rats suivant deux parties :

Partie 1 : exposition subchronique

Dans la première expérimentation, nous avons utilisé 16 rats après sevrage d'un poids moyen de 60 g (**Palaska et Al ., 2002**), ont été répartis en 2 groupes de 8 rats chacun, il s'agit de :

Groupe 1 : rats témoins ont reçu une eau physiologique par injection intra- péritonéale chaque jour pendant 30 jours.

Groupe 2 : rats traités par le 5-phényl 1,2,4-triazole 3-thione (5-PTT) dissout dans le DMSO à une dose de 10 mg/kg de poids corporel administré par voie intra- péritonéale a raison d'une injection /jour pendant 30 jours

NB : dans notre expérimentation nous avons utilisé l'eau physiologique comme témoin au lieu du DMSO car ce dernier est un solvant organique le plus utilisé dans de nombreux domaines biomédicaux et pharmacologiques et qui n'a pas montré d'effet délétère sur la santé ; suivant la FDA La Food and Drug Administration (FDA, « Agence américaine

des produits alimentaires et médicamenteux qui a classé le DMSO dans la catégorie des solvants les plus sûrs. (FDA ,2012 ; Galvao *et al.* , 2014 ; Verheije *et al.* , 2019).

IV.2. Evaluation du poids corporel

L'évaluation du poids corporel est suivie périodiquement chaque jour tout a long de l'expérimentation (30 jours). (Figure 22)



Figure 22: mesure de poids des rats

IV.3. Tests neurocomportementaux

Les tests neurocomportementaux ont été réalisés pour les deux types d'expositions (subchronique et aigue).

IV.3.1 Test l'open Field

L'open Field utilisé était une large boîte rectangulaire ouverte (90 cm de long, 70 cm de large, et 60 cm de haut), à fond noir, et fortement éclairée du dessus (500 lux). Des lignes blanches au sol délimitaient des carreaux (10 x 10 cm) (Dauge *et al.* ,1989).L'open Field constitue un environnement stressant pour le rat. Il s'agit en effet d'un animal nocturne, qui préfère les espaces confinés, clos et peu éclairés, est effrayé par les grands espaces, où il va peu au centre et longe les murs.

Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'open Field, la tête orientée vers le coin. Son comportement était observé pendant 6 minutes.

Six paramètres étaient mesurés par l'expérimentateur :

- le temps de latence (exprimé en secondes), qui correspond au temps mis par le rat pour sortir des quatre carreaux formant le coin,

- le nombre total de carreaux traversés par le rat pendant la durée du test (6 min), qui reflète l'activité locomotrice,
- le nombre de visites dans les 15 carreaux du centre.
- le nombre total de redressements (animal positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi).
- le nombre total de toilettages.
- le nombre total de défécations.

Ainsi, ce test évalue les capacités exploratoires du rat dans un contexte stressant.

Le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressements reflètent son activité exploratoire et son état émotionnel. Les autres paramètres sont plutôt des indices de son état émotionnel. (**Figure 23**).



Figure 23: Le test open Field

IV.3.2.Labyrinthe de Barnes

Le labyrinthe de Barnes est constitué d'une plateforme circulaire de 1m de diamètre, à une hauteur de 70cm. Douze trous de 4 cm de diamètre sont répartis de façon équidistante à la périphérie de la plateforme. Un tuyau souple est utilisé pour connecter l'un des trous à la cage du rat qui est déposée en contre bas de la plateforme. Le labyrinthe est éclairé par une lumière de 400 lux au centre de la plateforme. Les rats sont entraînés à retrouver le trou cible connecté à leur cage alors que les onze autres trous sont bouchés. Pour chaque rat, la cible reste toujours à un même emplacement dans le référentiel de la

pièce. L'animal peut se guider grâce à des indices visuels, olfactifs et sonores fixes, tels que des posters au mur, un évier, le son d'une radio dans la pièce, les autres rats et l'expérimentateur lui-même.

Les rats sont déposés au centre de la plateforme et explorent librement la plateforme jusqu'à trouver la cible dans laquelle elles réfugient généralement pour rejoindre leur cage. Si au bout de trois minutes le rat n'a pas trouvé la cible ou n'a pas rejoint sa cage, il est dirigé délicatement vers la cible par l'expérimentateur. Après chaque essai, la plateforme est rincée avec un gant mouillé d'eau et est tournée pour limiter les indices olfactifs à l'intérieur du labyrinthe. Chaque rat réalise trois essais par jours pendant cinq jours. Le sixième jour, les rats sont soumis à une première épreuve: le rat est déposé au centre de la plateforme de façon identique aux essais, mais les 12 trous sont bouchés. Le rat est laissé en exploration sur la plateforme pendant deux minutes.

L'épreuve est suivie de trois essais le même jour, après ce dernier apprentissage pour mesurer la mémoire à long terme. Pour chaque essai, le temps avant de trouver la cible et le nombre d'erreur sont mesurés. (Rosenfeld *et* Ferguson, 2014). (Figure 24).



Figure 24: Test labyrinthe de Barnes

IV.3.3. Test obscurité/lumière

Le comportement d'exploration des rats lors du test obscurité/lumière a été étudié pendant la période de jour de l'animalerie, en fin d'après-midi. L'appareil est constitué de deux compartiments de taille identique ($18,5 \times 18,5 \times 15 \text{ cm}^2$) l'un opaque et l'autre transparent, séparé par un tunnel opaque ($5 \times 5,5 \times 5 \text{ cm}^2$). La luminosité dans le compartiment transparent est de 400 lux. Les rats sont déposés dans le compartiment obscur. Le temps passé dans chaque compartiment (lumineux et obscur) est mesuré pendant 6 minutes. (Costall *et al.*, 1988) (Figure 25)



Figure 25: Test obscurité/lumière

IV.3.4 Test du labyrinthe en croix surélevé LCS

Le labyrinthe est constitué de quatre bras en bois peints en noir ($L = 50$ cm et $l = 10$ cm) qui communiquent par l'intermédiaire d'une zone centrale (10×10 cm). Deux bras opposés comportent des parois latérales de 50 cm de hauteur (bras fermés) alors que les deux autres en sont dépourvus (bras ouverts). L'ensemble du dispositif est placé à 53 cm du sol et éclairé par la lampe (**Pellow *et al.*, 1985**).

Ce type de test permet de mesurer le degré d'anxiété d'un animal selon son aversion spontanée pour le vide. L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Les bras fermés (BF) représentent la sécurité, alors que les bras ouverts (BO) offrent une valeur exploratoire (**figure 26**).

Un animal anxieux aura naturellement tendance à préférer les espaces clos et sombres aux espaces ouverts et éclairés. Partant de ce principe, l'anxiété comportementale est mesurée par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe.

Dans le test, chaque rat était initialement positionné au centre du labyrinthe situé à l'intersection des quatre bras, la tête orientée vers l'un des bras fermés; il avait libre accès aux quatre bras pendant une durée de 5min. Le labyrinthe était disposé dans une pièce isolée du bruit. L'expérimentateur visualisait le comportement du rat de l'extérieur de la pièce, grâce à une caméra vidéo; il relevait les nombres de visites et temps passés

respectivement dans les BO et dans les BF; une visite était comptabilisée lorsque le rat avait les quatre pattes dans un bras.



Figure 26: Dispositif expérimental du labyrinthe en croix surélevé

IV.3.5 test du labyrinthe en Y

Ce test permet d'évaluer la mémoire de travail qui consiste à retenir à court terme une information et l'utiliser immédiatement pour exprimer un comportement approprié. Il est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement. Quand l'animal est placé dans le labyrinthe, il explore spontanément le bras le moins récemment visité, et de ce fait, montre un haut degré d'alternance des visites des trois bras. Pour ce faire, il utilise la mémoire de travail qui consiste à mémoriser les bras les plus récemment visités et à renouveler continuellement cette information. (Nagahara *et* Gaugh, 1992 ; Holcomb *et al.*, 1999). Cette tâche implique également certains aspects de l'attention ; qui peuvent être mesurés en comptabilisant les retours au même bras visité ou au bras adjacents (Messier, 2002).

Le labyrinthe en Y est composé de trois allées identiques disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral. Ces allées ont une longueur de 13 cm, une largeur de 4,5 cm et une hauteur de 5,5 cm. Ce labyrinthe dispose d'un couvercle transparent. Le plancher est constitué de barres métalliques de 2 mm de diamètre régulièrement espacées de 0,5 cm. Ce teste d'alternance est couramment utilisé pour évaluer la mémoire de travail chez les rongeurs.

Il est souvent appelé teste d'alternance spontanée en raison de l'absence d'un renforçateur, alimentaire par exemple.

Il a été décrit que l'alternance spontanée chez les rongeurs dépend de l'hippocampe. En effet, les animaux qui ont subi des lésions de l'hippocampe présentent de mauvaises performances dans ce test (Nour, 2011).

dans notre procédure, le rat est placé dans l'une des trois branches du labyrinthe, la tête dirigée vers le point d'intersection des 3 branches, puis elle est laissée 5 minutes en libre exploration. On considère qu'elle a pénétré dans une branche si ses 4 pattes sont dedans. On comptabilise l'ordre des visites, dont on extrait le nombre total de visites comme indice d'activité générale, ainsi que la distribution des visites dans les trois branches. Les données présentées résultent d'une analyse de cette distribution pour compter les alternances et s'expriment en pourcentage d'alternance. Celui-ci est calculé selon la formule $(\text{nombre d'alternance} / (\text{nombre de visites} - 2)) \times 100$ voir l'exemple de comptage d'alternance et de pourcentage (figure 27)

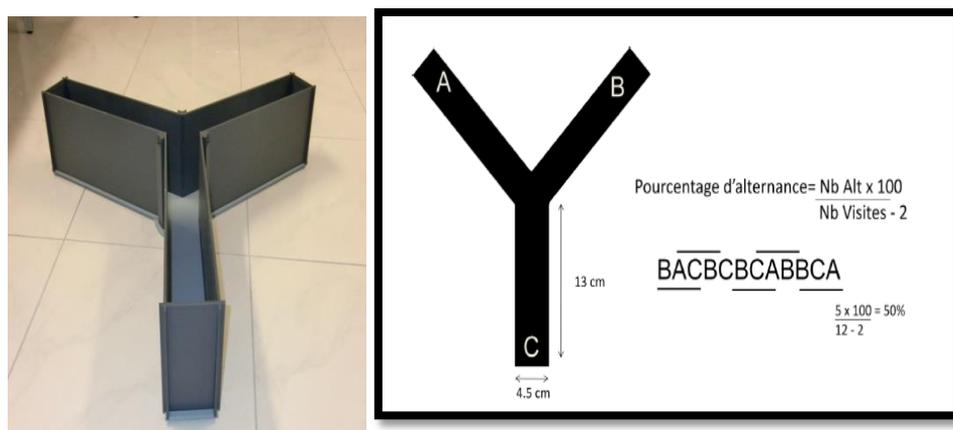


Figure 27 : Dispositif expérimental du test du labyrinthe en y avec la formule adaptée pour calculer le pourcentage d'alternance et un exemple de comptage d'alternance.

(Nour, 2011).

IV.3.6. Comportement de type dépressif : Test de la nage forcée

L'épreuve de la nage forcée a été initialement proposée par (Porsolt et al., 1977) comme épreuve permettant la sélection de molécules à activité antidépressive. Les rats sont placés durant 15 minutes dans la pièce où se déroule le test. Les animaux sont soumis à une épreuve de nage forcée d'une durée de 6 minutes. Les animaux sont placés à l'intérieur d'un cylindre de 20,7 cm de diamètre et de 39 cm de hauteur, dans une eau à 22°C. On mesure la durée pendant laquelle l'animal nage activement ou flotte seulement de manière

à conserver la tête hors de l'eau. Après s'être débattu dans l'eau, l'animal devient presque immobile, bougeant les pattes de temps à autre pour rester à flot ou retrouver son équilibre.

Cette immobilité est interprétée comme étant le reflet d'un « désespoir comportemental », qui survient lorsque l'animal réalise qu'il ne pourra pas s'échapper.

- Dans le cadre de cette interprétation, l'immobilité est vue comme comportement dépressif. (**figure28**)



Figure 28 : L'épreuve de la nage forcée (FST).

V. Sacrifices des rats et prélèvement sanguins

Les rats sont sacrifiés le matin après 12h de jeûne par décapitation, le sang est immédiatement recueilli dans des tubes polyéthylènes étiquetés contenant l'anticoagulant EDTA et des tubes héparines pour le dosage des paramètres biochimiques.

- ❖ Ces tubes vont subir une centrifugation 3000 tours/min pendant 15 min, puis on récupère le plasma résultant.
- ❖ Les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur, à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques (glucose, cortisol, transaminases, bilirubine, urée, cholestérol et triglycéride)

VI. Prélèvement des organes

Le crâne des animaux sacrifiés a été ouvert pour le prélèvement de cerveau, ainsi que les foies et reins sont prélevés puis rincés avec une solution Na Cl, séché, pesé sur une balance de précision puis fixés dans le formol pour la réalisation des coupes histologique.(Figure 29)



Figure 29 : Prélèvement des organes (cerveau, foie et le rein)

VII. Détermination des paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques à savoir le taux d'hémoglobine (**Hb**), le nombre des globules rouges(**GR**), le nombre des globules blancs(**GB**), le nombre des plaquettes et le volume globulaire moyen (**VGM**) sont déterminés à l'aide d'un Coulter de type« **MEDONIC CA530** ».

VIII. Techniques de dosage biochimique

VIII.1 Dosage de glucose

La détermination de la glycémie a été réalisée par la méthode enzymatique au glucose oxydase (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

Le glucose est transformé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



Le lecteur de l'absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

VIII.2 Dosage du cortisone

Technique : Electrochimiluminescence (ECLIA -Cobas - Roche)

Principe technique : Principe de compétition. Durée totale du cycle analytique: 18 minutes

1ère incubation: 20 µL d'échantillon sont incubés avec un anticorps anti-cortisol spécifique biotinylé et un dérivé de cortisol marqué au ruthénium. Les sites de liaison encore disponibles de l'anticorps biotinylé sont occupés en partie par le cortisol endogène et en partie par l'haptène. Il se forme des immuncomplexes anti-cortisol en relation avec la concentration en cortisone contenue dans l'échantillon.

2ième incubation: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine- biotine.

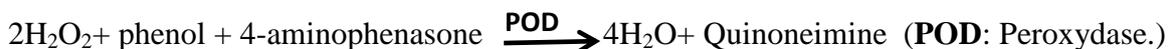
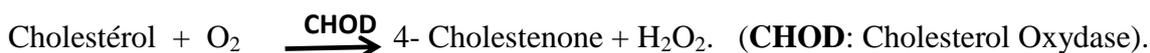
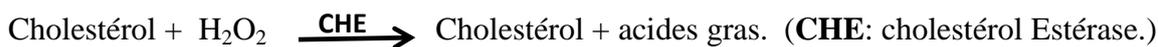
Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée ans le code-barres du réactif.

VIII.3 Dosage de cholestérol

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique (Spinreact).

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

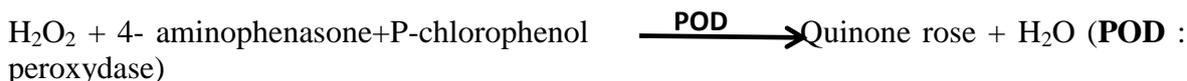
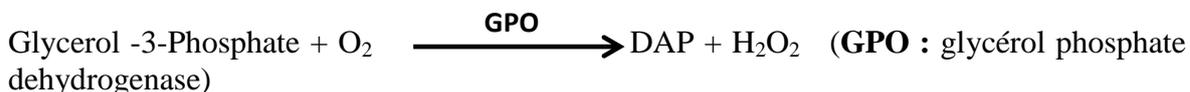
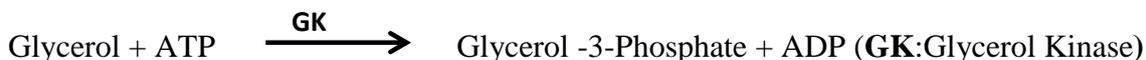
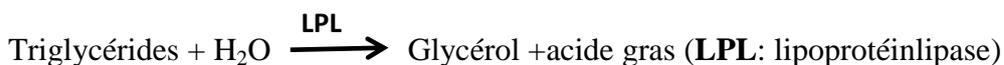


L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Naito, 1984).

VIII.4 .Dosage des triglycérides plasmatiques

Le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique (Spinreact).

Les triglycérides sont enzymatiquement hydrolysés en glycérol et en acides gras libres par la lipoprotéine-lipase (LPL). Le glycérol sous l'effet du glycérol kinase forme le glycérol -3- phosphate (GTP) qui est oxydé en H₂O₂. Ce dernier forme avec le 4-aminophenozone et le p-chlorophenol en présence de peroxydase un complexe rouge, selon les quatre réactions suivantes:

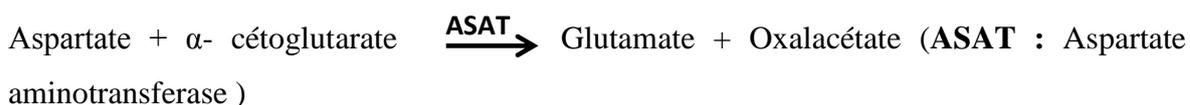


L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans les échantillons (Kaplan et al., 1984).

VIII.5. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO)

Le dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique (Spinreact).

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi L'oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétooglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Murray, 1984).



VIII.6. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP)

Le dosage de l'activité d'alanine aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique (Spinreact).

La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (Murray, 1984).

Le principe est présenté selon la réaction suivante :



VIII.7. Dosage d'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique à l'uréase selon la fiche technique (Spinreact). L'urée est hydrolysée enzymatiquement à l'ammoniaque (NH₄⁺) et le dioxyde de carbone (CO₂). Les ions ammoniacaux ainsi formés réagissent avec du salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en présence d'un catalyseur nitroprusside, pour former un indophénol vert, selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon (Kaplan, 1984).

VIII.8. Dosage de créatinine

Le dosage de créatinine a été réalisé par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique (Spinréact).

L'essai est basé sur la réaction de créatinine avec l'acide picrique : c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (Murray, 1984).

IX. La technique histologique

Les examens anatomopathologiques des différents tissus prélevés chez les rats (à savoir le cerveau, les reins et le foie) ont été effectués au niveau du laboratoire de pathologie de l'université de Tiaret Ibn Khaldoun.

IX.2. Etude microscopique

La technique de base comporte plusieurs étapes : Fixation, déshydratation, clarification, inclusion en paraffine, réalisation des coupes et colorations, observation au microscope optique.

IX.2.1. Fixation

Elle est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate après l'obtention de prélèvement. Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomo-pathologique difficile voire impossible (densification ou autolyse du tissu).

La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement ; entre 2 à 5 heures et 48 heures.

Le fixateur le plus habituellement utilisé est l'alcool, formol à 10 %. Des précautions doivent être prises au cours de cette étape de la fixation, comme par exemple ; le volume du fixateur (formol) doit représenter 10 fois le volume de la pièce.

IX.2.2. Déshydratation

Après fixation, les tissus sont déshydratés dans 2 bains de formol (1h30 pour chaque bain) ensuite tromper dans 4 bains successifs d'alcool chirurgicale (1h30 dans chaque bain) à la fin les tissus sont mis dans 2 bains d'acétone (1h30 dans chaque bain)

IX.2.3. La clarification

Cette opération est effectuée après la déshydratation, les pièces sont placées dans 2 bains de toluène (1h30 dans chaque bain)

IX.2.4. Imprégnation et inclusion à la paraffine

On utilise la paraffine comme milieu d'inclusion et d'enrobage. La paraffine, de point de vue chimique, est un mélange d'hydrocarbures saturés et d'un faible pourcentage de cires. L'inclusion est une véritable imprégnation du tissu prélevé à l'échelle cellulaire et non seulement un simple enrobage. Le prélèvement tissulaire, ayant achevé leur fixation dans le formol et leur déshydratation dans une série de bains d'alcools, sera déposé directement dans des cassettes en plastiques. Puis la paraffine est coulée sur le prélèvement tissulaire en prenant soin d'orienter convenablement le prélèvement. La paraffine imprègne le tissu, et serait laissée refroidir. Une fois la paraffine refroidie, les cassettes marquées et les blocs sont prêts à la coupe.

IX.2.5. Réalisation des coupes

L'appareil utilisé est le microtome à paraffine (Marque : Leica 1510). Il comporte :

- Un support de rasoir.
- Un porte objet où sera inséré le bloc.
- Un système d'avance mécanique permettant le déplacement de l'objet en direction du rasoir.
- Un bouton gradué de 0 à 3 μ réglant l'épaisseur de la coupe.

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce au microtome (épaisseur de la coupe est réglée à 5 μ). Les coupes sont étalées sur des lames en utilisant de la chaleur qui permettra leurs dilutions, puis sont collées par une eau albumineuse chauffée sur les mêmes lames.

IX.2.6. Coloration

Avant de procéder à la phase de coloration des coupes, on doit réaliser plusieurs étapes de déparaffinage.

- La 1^{ère} étape consiste à un déparaffinage des lames ou des coupes sur une plaque chauffante.
 - La 2^{ème} étape de déparaffinage consiste à faire passer ces coupes dans une solution de xylène.
 - La 3^{ème} étape est la dissolution de la paraffine par hydratation qui consiste à éliminer le milieu d'inclusion et la réhydratation des tissus dans 03 bains d'alcools (absolu à 100°, 95°, 75°) de 5 min chacun.
 - Rinçage à l'eau pour éliminer l'alcool. La coloration usuelle associe :
 - Un colorant basique nucléaire (Hématoxyline).
 - Un colorant acide cytoplasmique (Eosine, érythrosine, ou phloxine).
- La phase de coloration des coupes déparaffinées à l'hématoxyline éosine nécessite le passage de ces coupes dans plusieurs bains d'alcool et de solvants organiques.

IX.2.7 Montage des coupes

- La coupe colorée est protégée par une lamelle de verre collée.
- Il est nécessaire d'interposer entre la lame et la lamelle un milieu de montage.
- Le milieu de montage utilisé est un liquide d'inclusion rapide (Eukite).
- Une goutte de cette résine est déposée sur la lamelle puis appliquée.
- Après montage des coupes, les lames seront déposées dans une étuve pour un séchage d'une heure.
- Les lames seront enfin prêtes à l'observation microscopique et peuvent être conservées indéfiniment.
- Les coupes, colorées à l'hématoxyline éosine, sont examinées aux grossissements $\times 40$.

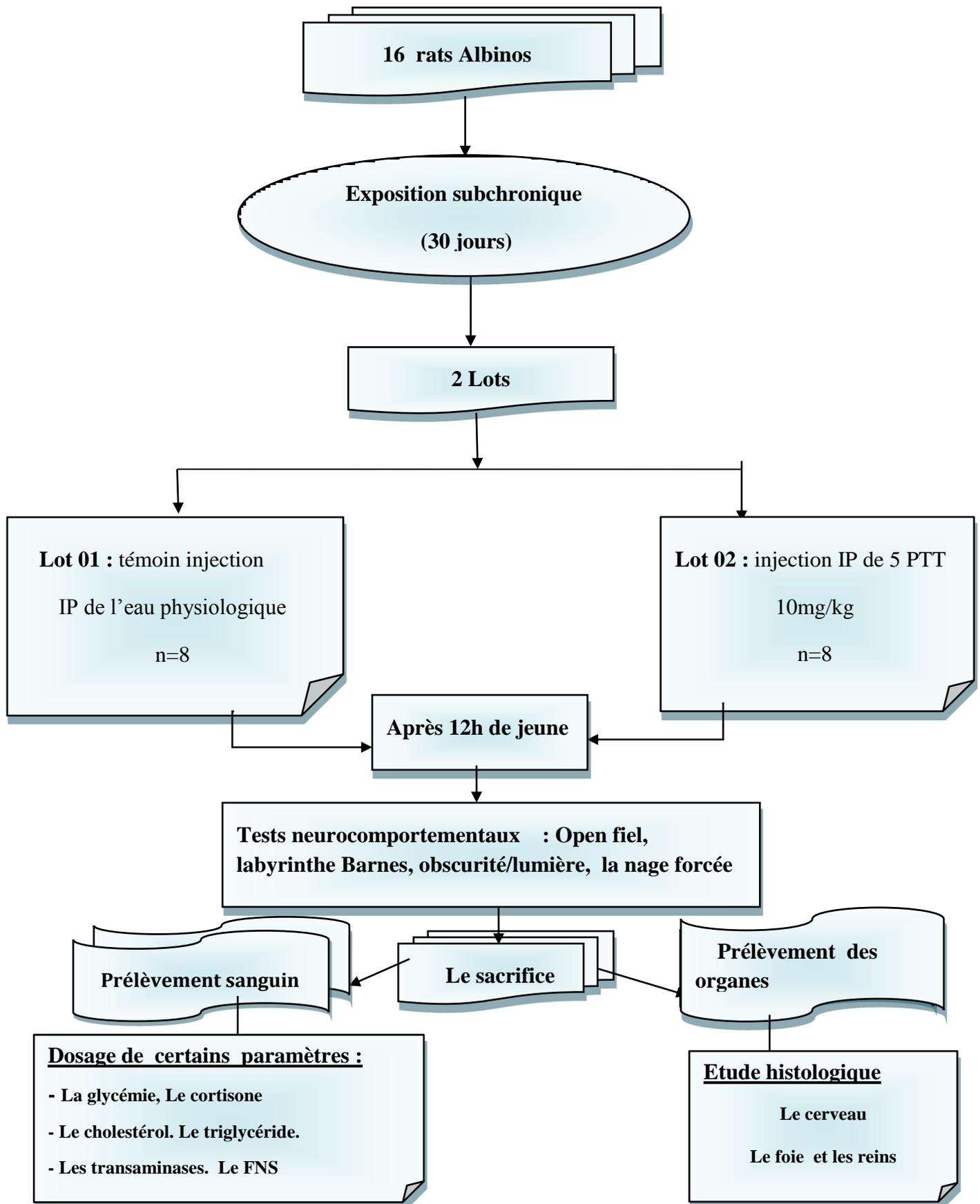


Figure 30 : Schéma récapitulatif de l'exposition subchronique

Partie 2 : exposition aigue

Dans la deuxième expérimentation après sevrage 20 rats ont été répartis équitablement en 2 lots,

- **Lot témoin « T »** : composé de 10 rats, soumis à trois injections intra-péritonéale (1 injection /jour) de l'eau physiologique à une dose de 200 ml/kg de poids corporel.
- **Lot expérimental « 5 PTT »**: jeunes rats traités trois jours par injections intra-péritonéale de 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione à une dose de 200 mg/kg de poids corporel (n= 10 rats). (Gannaire et Micillino , 2005).

1. Sacrifices et prélèvements du sang et des organes

Après les trois jours de traitement les deux groupes ont subi une batterie de tests neurocomportementaux puis ils ont été sacrifiés le matin par décapitation, le sang est immédiatement recueilli dans des tubes héparines pour le dosage des paramètres biochimiques, et dans des tubes secs étiquetés, puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 minutes pour récupérer le culot contenant les érythrocytes.

Les animaux sacrifiés ont été ouverts ventralement pour le prélèvement de certains organes : le cerveau, Le foie et les reins ont été stockés selon deux méthodes : la moitié au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant, et l'autre moitié fixée dans le formol afin de réaliser des coupes histologiques.

II. Dosage des paramètres du stress oxydant

II.1. Protocole de l'homogénéisation des érythrocytes et organes

D'abord, pour la lyse des érythrocytes, on doit utiliser une solution de lyse (également appelée de lavage) qui est composé de :

-1.36g de KH_2PO_4 +9g de Na Cl dilués dans 1L d'eau distillée (pH=7.4)

Après collection du sang dans des tubes secs, on fait la première centrifugation pour avoir le sérum .Ensuite, au culot contenant les érythrocytes, on ajoute 2ml de la solution de lyse et on fait une centrifugation à 3000trs/min pendant 15 min. On jette le surnageant et on ajoute 2ml de solution de lyse au culot, et on fait la deuxième centrifugation à 4000trs/min pendant 30 min et puis on récupère le surnageant, qui contient le lysat des érythrocytes à utiliser dans les dosages.

Pour les organes, on ajoute 2ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), et on fait l'homogénéisation à l'aide d'un broyeur. Après le broyage, on fait une centrifugation

9000tr/min pendant 15 min et on récupère le surnageant qui contient l'homogénat des organes.

II.2. Préparation de l'homogénat

Un gramme de foie des rats des différents groupes étudiés a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 trous/min, 4°C, 15 min), le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à (-20°C) en attendant d'effectuer le dosage des paramètres du stress oxydatif.

II.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu (l'apparition de la couleur bleu reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

N.B : le Tris : 2 amino-2hydroxymethyl 1,3propanediol synonyme : Trizma (TM), Trisamine.

-Formule brute : C₄H₁₁NO₃

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes : Prélever 0.1 ml de l'homogénat puis on ajoute 5 ml de réactif de Bradford, ensuite on agit bien et le laisse reposer pendant 5 minutes.

Après les 5 minutes on lit la densité optique à 595 nm contre le blanc.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions.

Tableau 3 : Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'albumine (µl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

II.4. Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode **d'Ellman (1959)** modifié par **Jollow et al. (1974)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

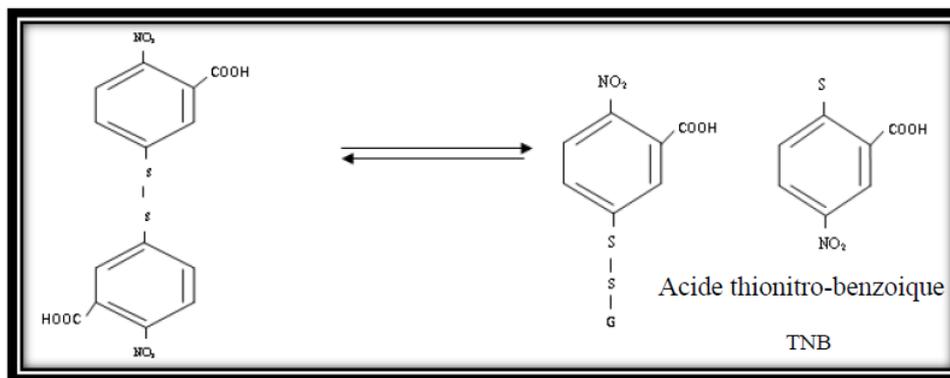


Figure 31 : réaction d'Ellman.

La procédure expérimentale de dosage du glutathion réduit est la suivante

D'abord on prélève 0.8 ml de l'homogénat préalablement préparé ensuite on ajoute 0.2 ml de solution d'acide salicylique (0.25%) puis agiter bien et le laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace, après on a procédé à une centrifugation à 1000 tours/min pendant 5 min.

Une fois le mélange est bien centrifugé on prélève 0.5 ml du surnageant et on ajoute 1 ml de tampon Tris, pH 9.6 et 0.025 ml d'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M.

Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

La concentration du glutathion réduit est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH/mg de protéine)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéine}}$$

- D0 : Densité optique.
- 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau de surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).
- 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement (-SH) à 412 nm.
- 0.8 : Volume de l'homogénat.
- 0.5 : Volume de surnageant.

II.5. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de **Flohe and Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence du glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de GSH-Px selon la réaction suivante :



Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

-Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant) puis on ajoute 0.4 ml de GSH (0.1 mM) + 0.2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) après incubation au bain marie à 25°C, pendant 5 min, après on ajoute 0.2 ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes, ensuite on ajoute 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.

-Mettre le mélange dans un bain de glace pendant 30 minutes et après centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes Puis prélever 0.48 ml de surnageant et ajouter 2.2 ml de solution tampon TBS+ 0.32 ml de DTNB (1.0 mM), mélanger bien et à la fin et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante

$$GSH-Px (\mu\text{mol GSH}/\text{mg protéine}) = \frac{(DO_{\text{échantillon}} \times DO_{\text{étalon}}) \times 0.04}{DO_{\text{étalon}}}$$

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon. DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

II.6. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase(CAT)

La CAT est dosée selon la méthode d'Aebi (1984). La mesure de l'activité catalytique à 240nm est basée sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation d'H₂O₂ selon la réaction suivant :



Les absorbances sont lus après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

-L'activité catalytique est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{moles d'H}_2\text{O}_2 / \text{min/mg de protéine}) = \frac{\Delta\text{DO}}{\varepsilon \times l \times X \times \text{Fd}}$$

Avec :

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.
- ε : Coefficient d'extension d'H₂O₂ (0.043mM-1cm-1).
- l : Largeur de la cuve.
- X : Quantité de protéines en mg/ml.
- Fd : Facteur de dilution pour le H₂O₂ dans la solution tampon (0.02).

III. Expression et analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne (M) des valeurs individuelles, affectées de l'erreur standard à la moyenne (S.E.M). La comparaison de deux moyennes est effectuée par un test t de Student. Avec le facteur traitement (5PTT, Témoin).

Une probabilité $p < 0,05$ est considérée significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Sigma statistique 3.5.

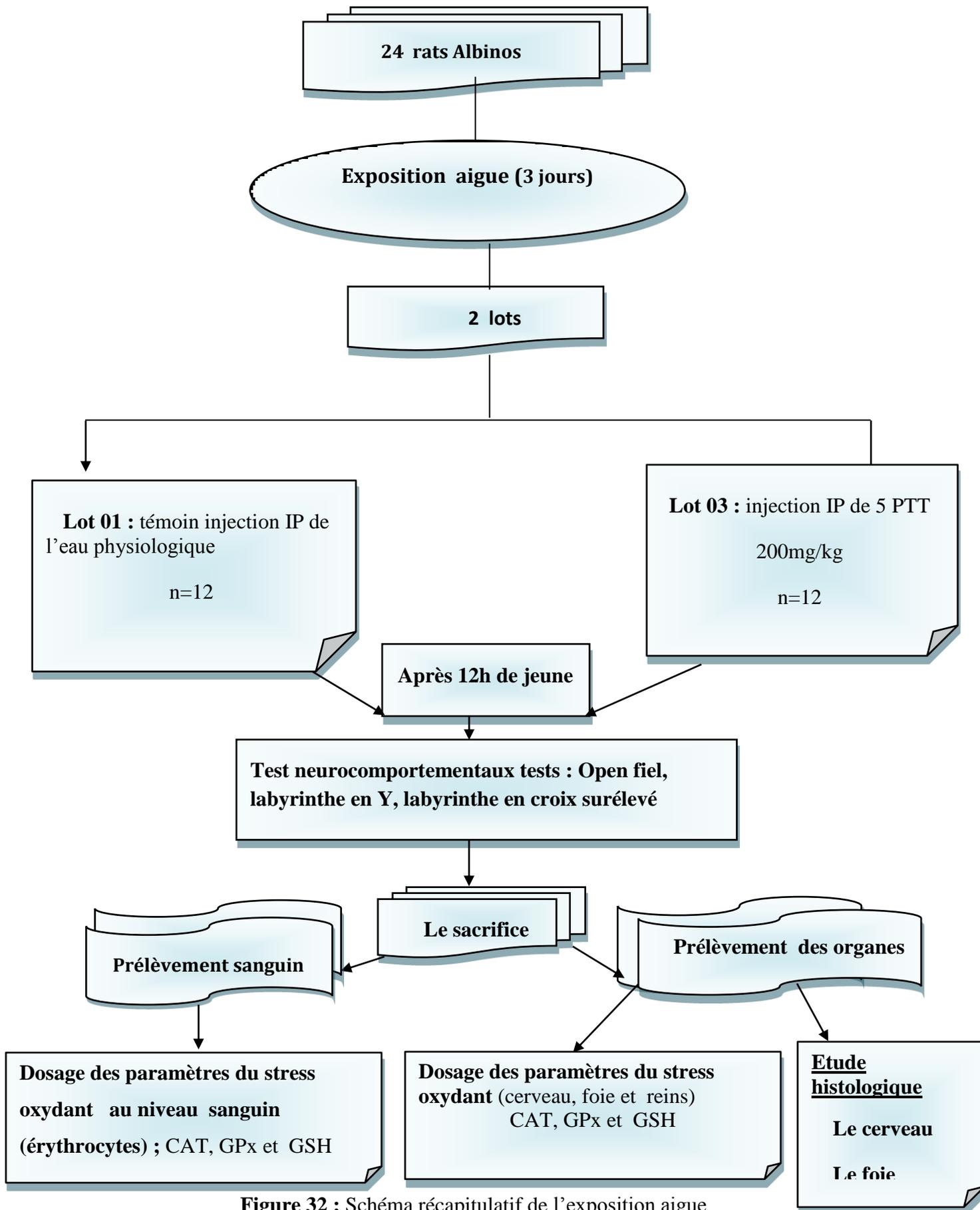


Figure 32 : Schéma récapitulatif de l'exposition aigue

RESULTATS

ET

INTERPRETATIONS

1^{ère} Partie : Exposition subchronique

1 .La croissance pondérale

Notre étude est portée sur la détermination du poids corporel chez des jeunes rats exposés au 5 PTT à une dose de 10mg/kg pendant 30 jours comparativement aux rats témoins.

Les résultats observés montrent que le poids des rats exposés au 5 PTT a diminué d'une manière significative par rapport au groupe témoin, accompagné d'une baisse du gain de poids corporel surtout à partir du 15^{ème} jours jusqu'à la fin de l'expérimentation (**figure 33**).

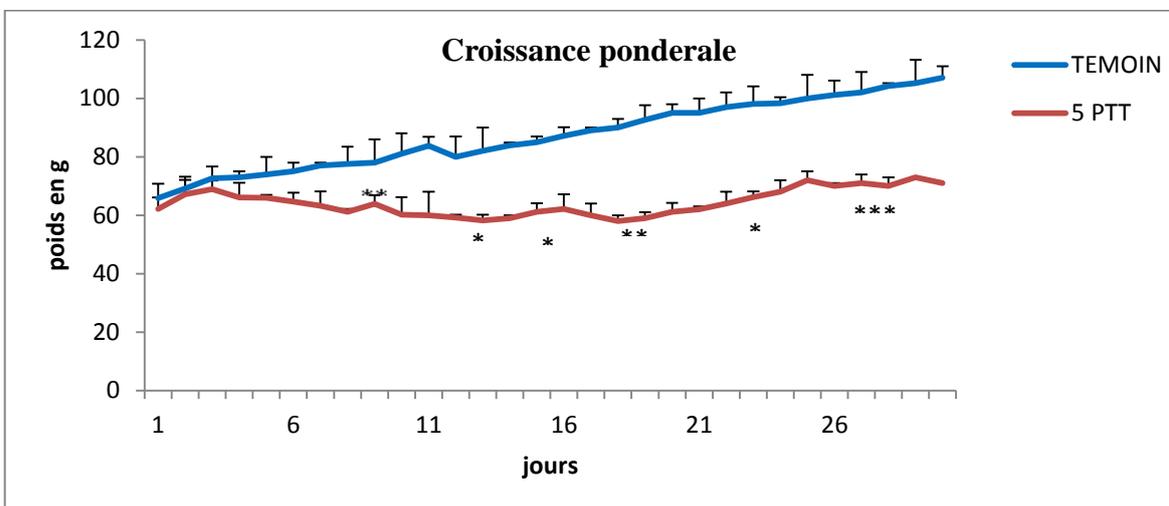


Figure 33: L'évolution pondérale des rats traités par le 5 PTT et les rats témoins pendant 30 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** : $p < 0,001$) (5PPT vs témoins).

De même les données relatives au poids cérébral indiquent une baisse significative ($p < 0,01$) du poids du cerveau chez les rats exposés au 5 PTT par rapport à celui des rats témoins. Ceci montre que l'exposition subchronique au 5 PTT est neurotoxique qui peut provoquer la diminution du poids des structures cérébrales (**Figure 34**).

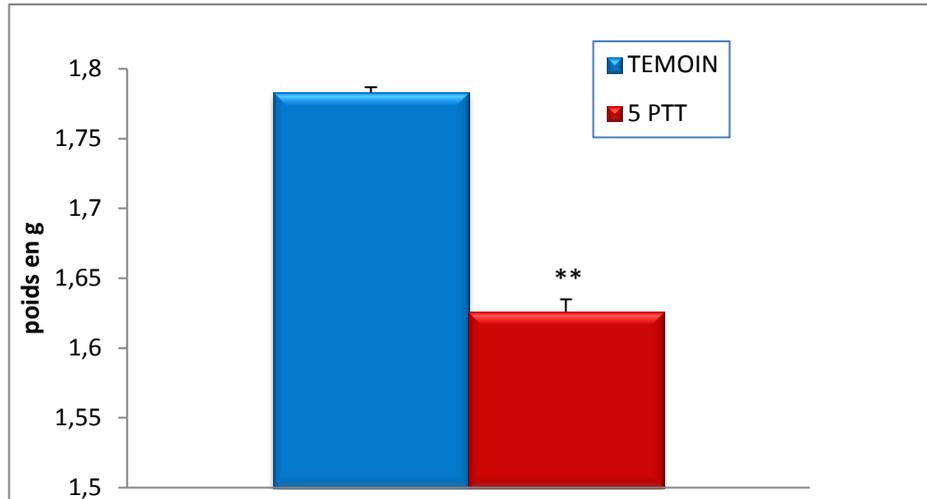


Figure 34: comparaison du poids du cerveau entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées à la moyenne \pm SEM (**: $p < 0.01$).

Par ailleurs, L'analyse des données révèlent une élévation significative ($p < 0,01$) du poids hépatique chez les rats exposés au 5 PTT par rapport à celui des rats témoins. (Figure 35).

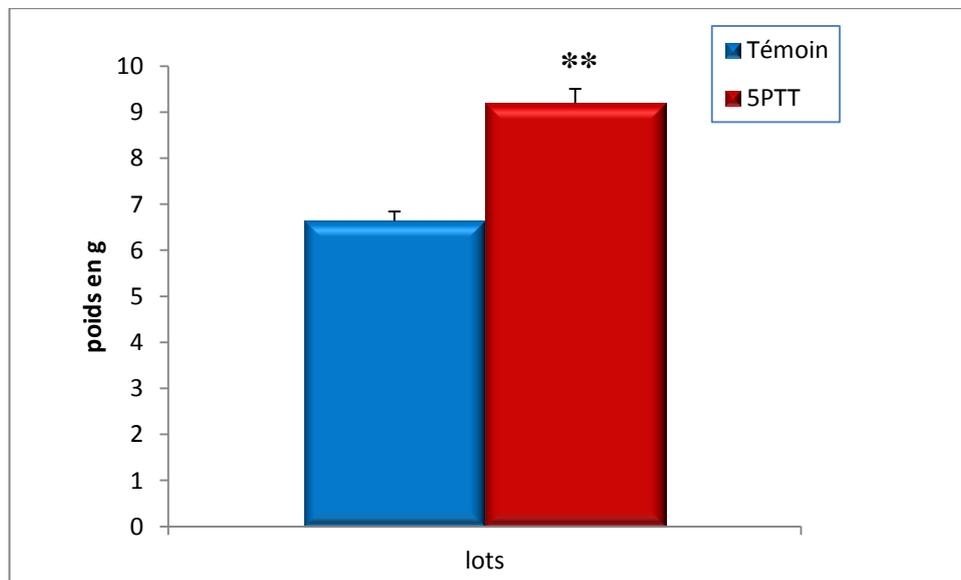


Figure 35: Comparaison du poids de foie entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées à la moyenne \pm SEM. (**: $p < 0.01$). (5 PPT vs témoins)

En revanche les résultats relatifs au poids des reins ne présentent aucune différence significative ($P > 0.05$) entre les deux groupes expérimentaux. (**Figure 36**)

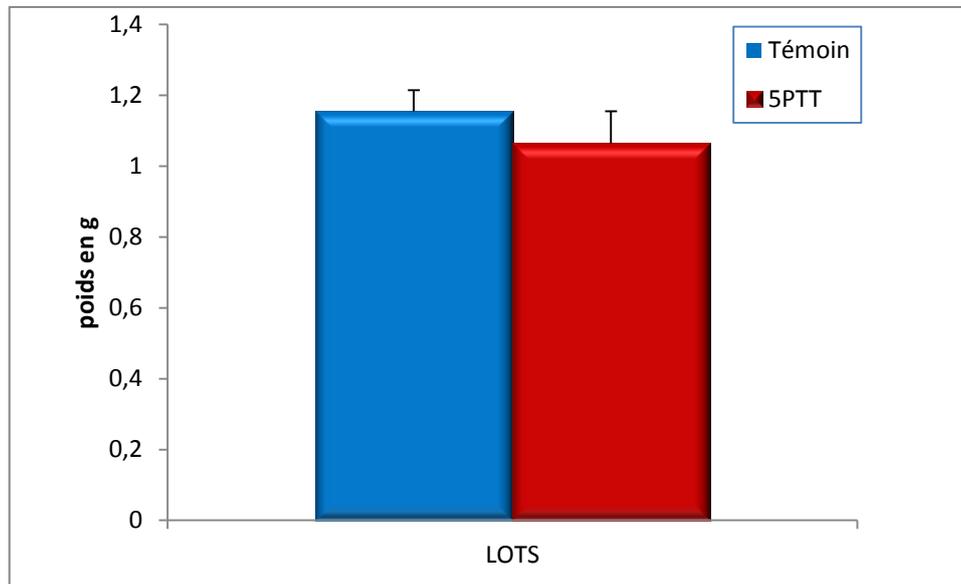


Figure 36 : Comparaison du poids des reins des sujets témoins et des sujets traités par le 5PTT. Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. ($p > 0.05$). (5 PPT vs témoins)

2. Les tests neurocomportementaux

2.1 .Test de l'open Field

Ce test permet d'évaluer la réaction de l'animal vis-à-vis un environnement nouveau, ainsi que son désir à explorer les espaces. Les résultats obtenus montrent que l'administration par voie intra-péritonéale de 5PTT à une dose de 10mg /kg, entraîne une diminution significative du nombre de carreaux traversés, le nombre de redressement et le nombre de visite au centre ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) respectivement, par rapport aux rats témoins, on observe également une augmentation significative du temps de latence ($p < 0,05$) des rats traités par rapport à celui du lot témoin.

De même les résultats enregistré concernant le nombre de toilettage et le nombre de défécation ne présentent aucune différence significative entre les deux groupes. (**Figure 37**).

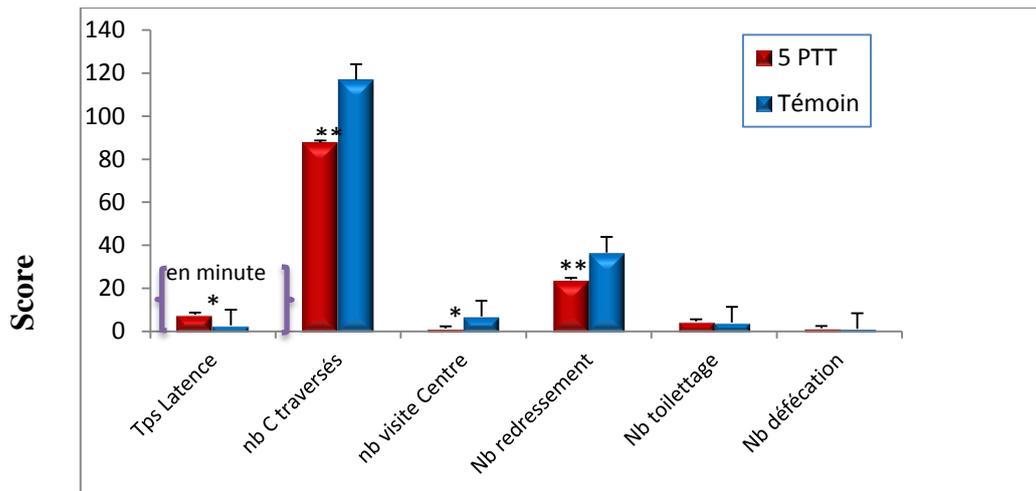


Figure 37 : Effet de l'exposition des rats au 5 PTT sur l'activité locomotrice et comportement stéréotypé (Test open Field) comparés aux témoins. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$).

2.2. Le test de labyrinthe de Barnes :

Les plateformes des rats exposés au 5 PTT ainsi que les rats témoins ont été testées dans labyrinthe de Barnes, qui évalue les performances d'apprentissages et la mémoire spatiale en mesurant le nombre d'erreurs et le temps écoulé avant de trouver la cible. L'analyse statistique a rapporté que le temps écoulé et le nombre d'erreurs avant de trouver la cible des rats traités par le 5 PTT sont significativement élevés par rapport à ceux du groupe témoin ($p < 0,05$; $p < 0,01$) respectivement. (**Figure 38 A et B**).

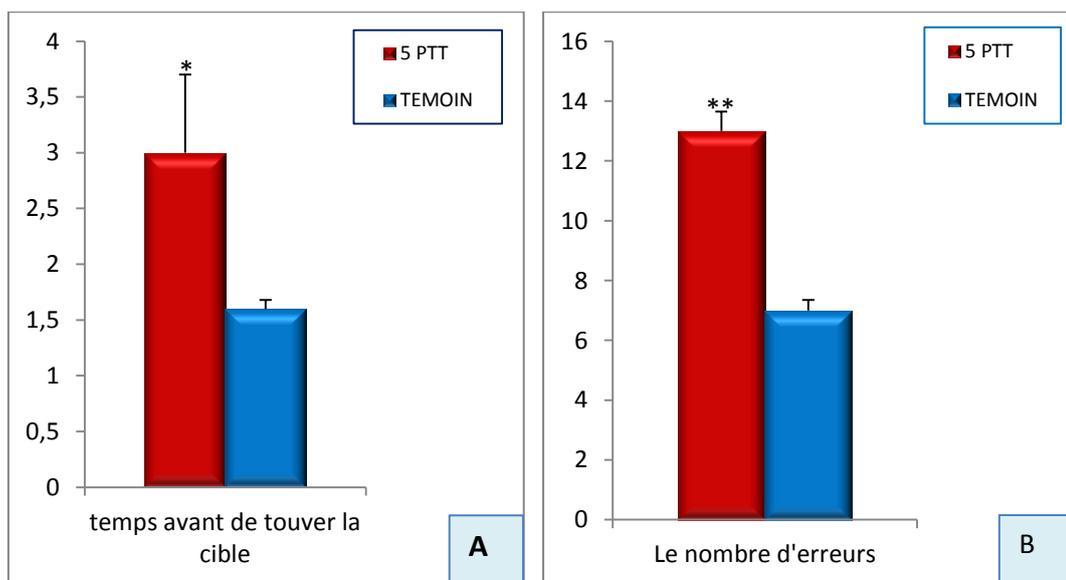


Figure 38 (A et B) : effet de l'exposition des rats au 5 PTT sur l'apprentissage et la mémoire spatiale (le labyrinthe de Barnes) par rapport aux rats témoins. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

2.3 .Test du compartiment obscurité /lumière :

Les résultats enregistrés concernant le test d'anxiété (test du compartiment obscurité /lumière), révèlent que les jeunes rat exposés au 5 PTT présentent un temps de séjour dans le compartiment sombre significativement élevé par rapport à celui des témoins, accompagné d'une diminution dans le temps de séjour dans le compartiment lumineux. Ce qui reflète que les animaux exposés au 5 PTT développent un état d'anxiété élevé par rapport au sujets témoins. (**Figure 39**).

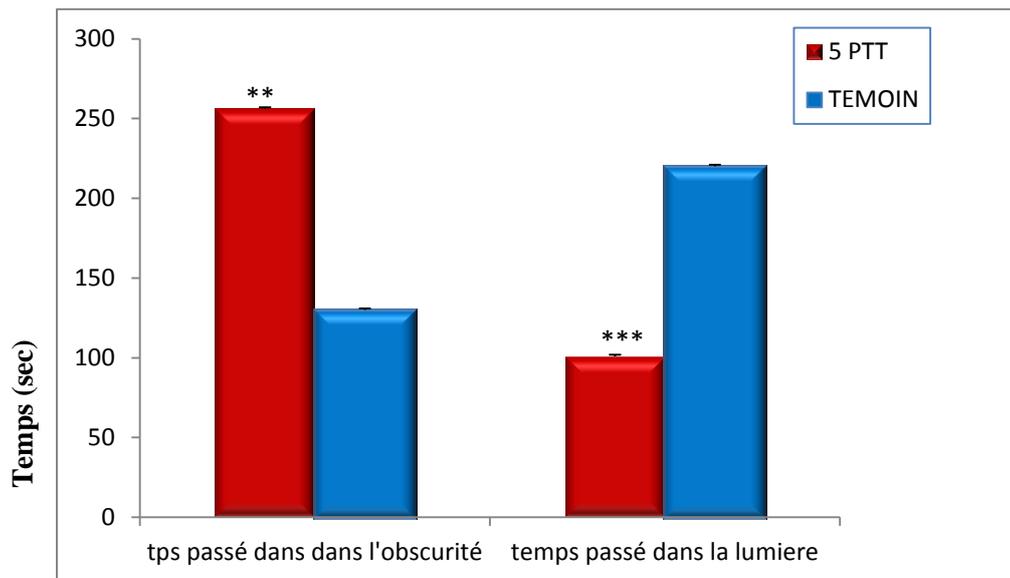


Figure 39: Exploration lors du test obscurité /lumière des rats Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** * : $p < 0.001$; ** : $p < 0.01$)

2.4. Comportement de type dépressif (Test de la nage forcée) :

Les résultats enregistrés dans le test de la dépression représenté par le test de la nage forcée présente un temps d'immobilité (TIM) significativement supérieur chez les rats exposés au 5 PTT comparativement à celui des témoins ($p < 0,001$). (**Figure 40**).

Cette immobilité est interprétée comme étant le reflet d'un état de désespoir comportemental, qui survient lorsque l'animal réalise qu'il ne pourra pas s'échapper, dans le cadre de cette interprétation, l'immobilité est vue comme un comportement dépressif.

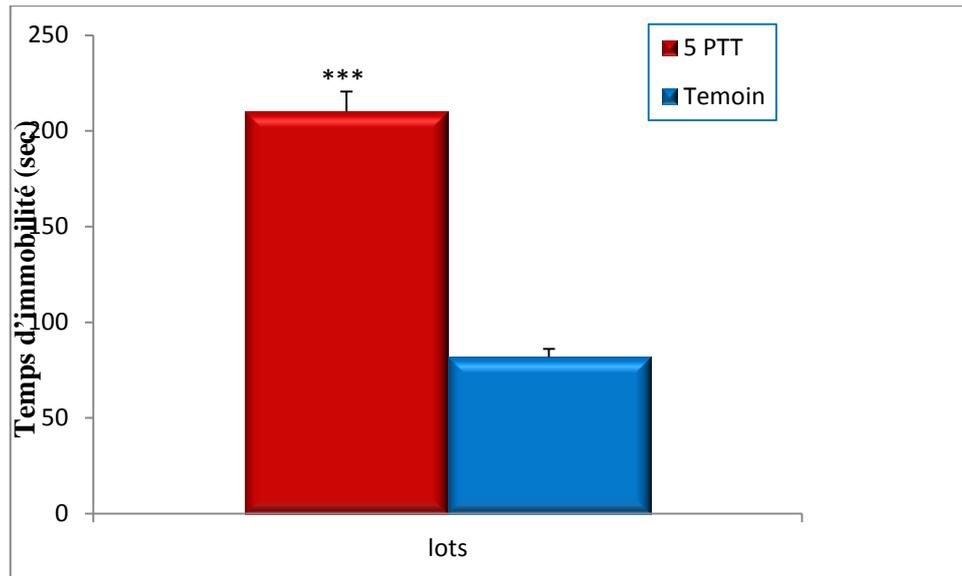


Figure 40 : Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les sujets témoins et les sujets exposés au 5PTT. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (***: $p < 0.001$).

3. Taux de glycémie et la cortisonémie

Afin de justifier les données expérimentales et confirmer l'état de stress engendré par l'exposition des jeunes rats au 5 PTT, nous avons procédé à la détermination de la glycémie et la cortisonémie chez les rats des deux lots, sachant que ces biomarqueurs sont de bons indicateurs de stress.

Le traitement des rats par le 5 PTT induit une augmentation significative du taux de glucose sanguin ($p < 0.01$) par rapport au lot témoin. (**Figure 41**).

Ainsi que les données relatives au taux de la cortisone sanguine révèlent qu'il y a une augmentation hautement significative ($P < 0,001$) chez les animaux traités au 5 PTT comparé aux animaux témoins. (**Figure 42**)

Cette augmentation dans le taux de la glycémie et la cortisonémie confirme l'état d'anxiété instaurée chez ces jeunes rats, cela pourrait être dû à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique par l'altération de glycogénolyse hépatique.

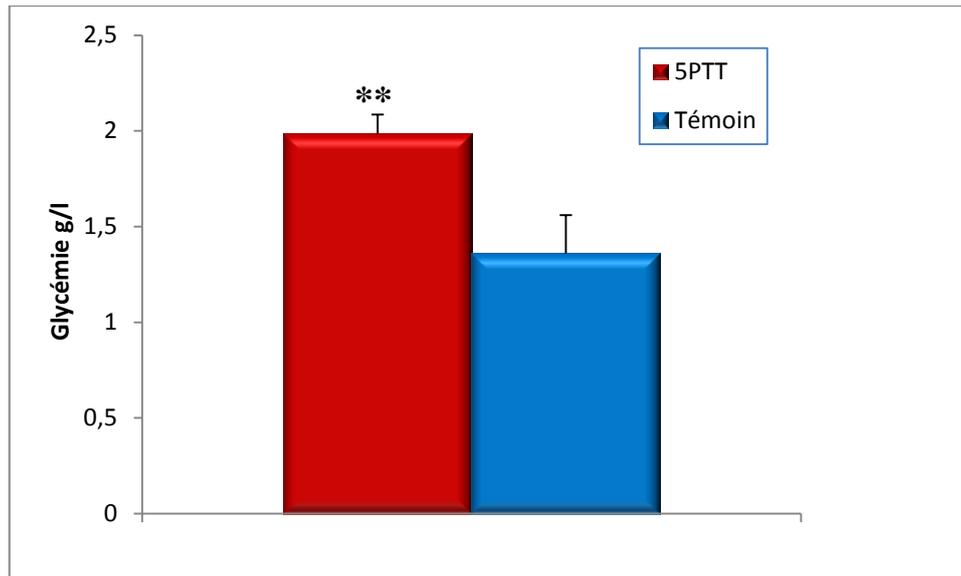


Figure 41: Comparaison entre la glycémie chez les différents rats traités par 5 PTT et les rats témoins (** : $p < 0,01$). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.

(PPT vs témoins)

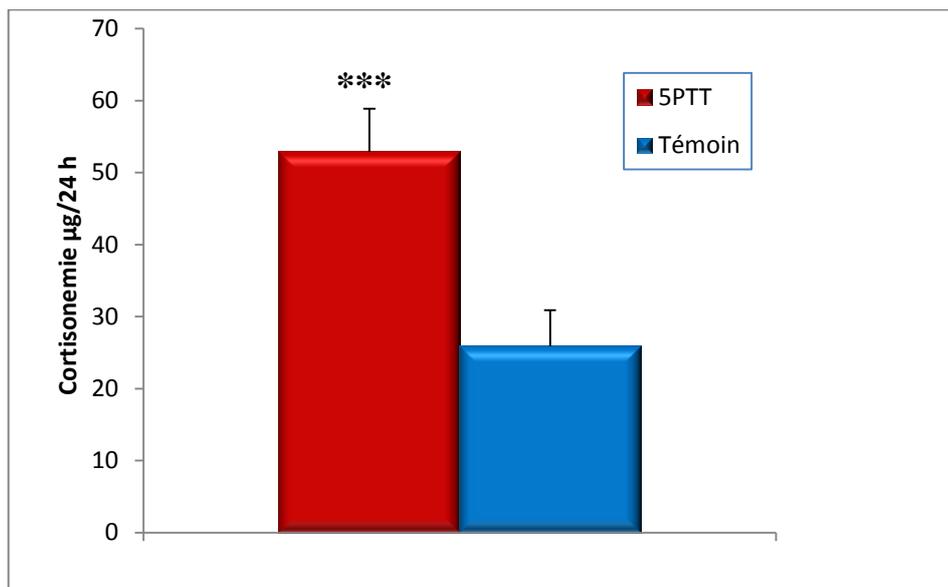


Figure 42: Comparaison du taux de cortisone entre les rats témoins et les rats exposés au 5 PTT. Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***) $p < 0.001$). (5 PTT vs Témoin)

Afin d'évaluer l'effet de l'exposition des jeunes rats au 5 PTT sur le plan hématologique et biochimique, nous nous sommes intéressés à déterminer l'hémogramme ainsi que les analyses des biomarqueurs hépatiques et rénaux, qui sont jugés les principaux organes impliqués dans la détoxification et les métabolismes de l'excrétion de toutes les substances toxiques.

4. Résultats hématologiques

Les résultats des différents paramètres hématologiques (Hématocrite, hémoglobine, Les érythrocytes, leucocytes, thrombocytes) sont présentés dans les figures (43, 44, 45, 46,47) respectivement.

L'exposition au 5 PTT induit chez les rats traités une réduction significative ($p < 0,05$) du taux de d'hématocrite comparativement aux rats non traités. (Figure 43)

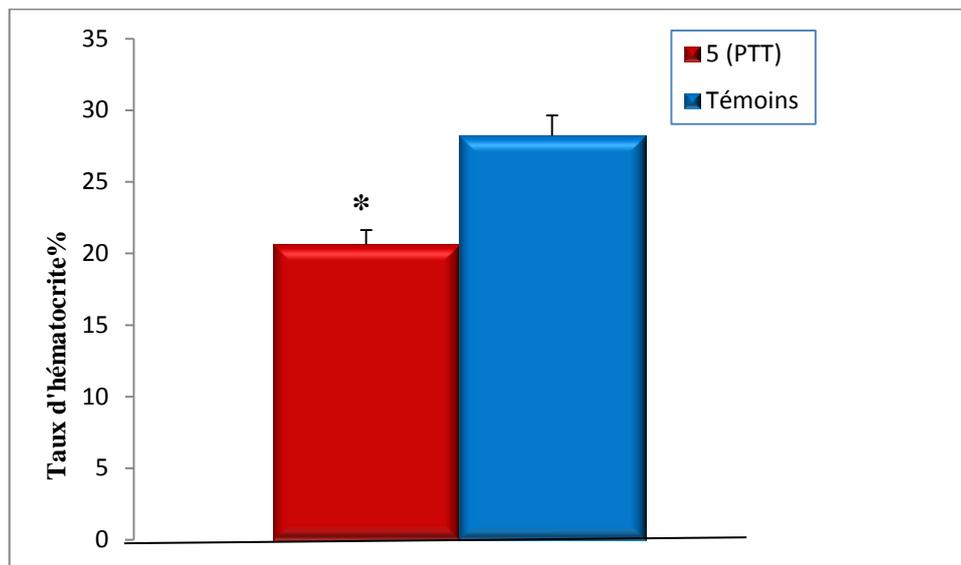


Figure 43 : L'effet du 5 PTT sur le taux d'hématocrite. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** $p < 0.05$). (5 PTTvs Témoin).

On note aussi une réduction statistiquement significative du taux d'hémoglobine ($p < 0,01$) chez les rats traités au 5 PTT par rapport à celui des rats témoins. (Figure 44).

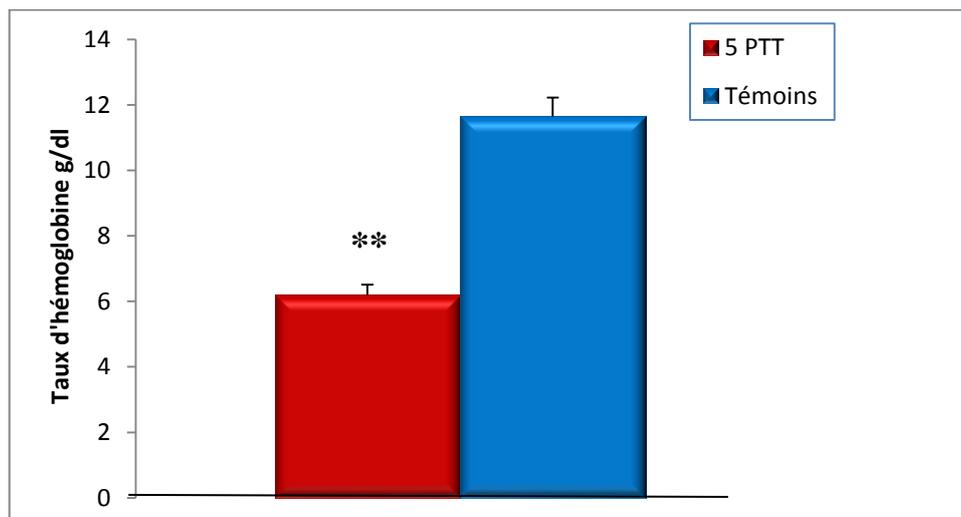


Figure 44 : L'effet du 5 PTT sur le taux d'hémoglobine. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (* $p < 0.01$) (5 PTT vs Témoin).

De même, les données relatives au comptage des érythrocytes révèlent qu'il y a une régression significative ($P < 0,05$) chez les animaux traités au 5 PTT comparé aux animaux témoins. (**Figure 45**).

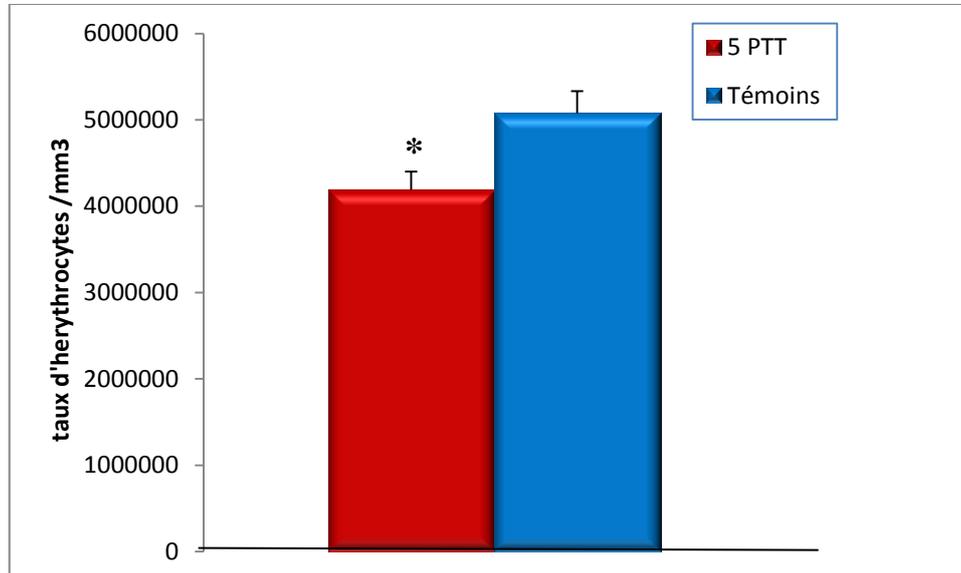


Figure 45: Comparaison du taux d'érythrocytes entre les animaux témoins et animaux traités au 5 PTT. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (* $p < 0,05$). (5 PTT vs Témoin)

En revanche, une exposition subchronique des rats au 5 PTT à une dose de 10mg/kg montre une augmentation significative ($p < 0,01$) des leucocytes chez les rats exposés au 5PTT par rapport à celui des rats témoins. (**Figure 46**).

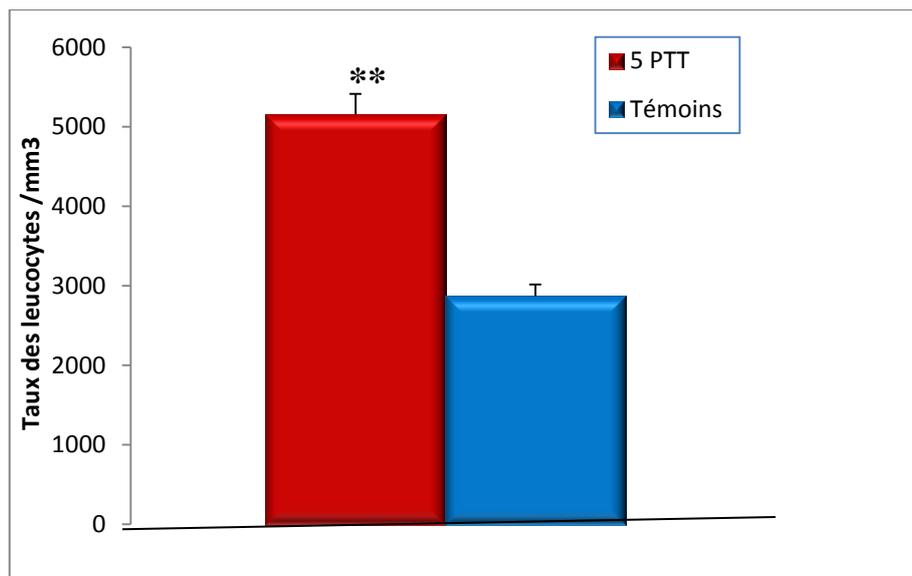


Figure 46: Comparaison du taux des Leucocytes entre les sujets témoins et sujets exposés au 5 PTT. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** $p < 0,01$).

De plus, les résultats du dénombrement des thrombocytes révèlent une élévation significative ($p < 0,01$) de cette population de cellules sanguines chez les rats traités au 5 PTT par rapport à celles des rats témoins. (**Figure 47**).

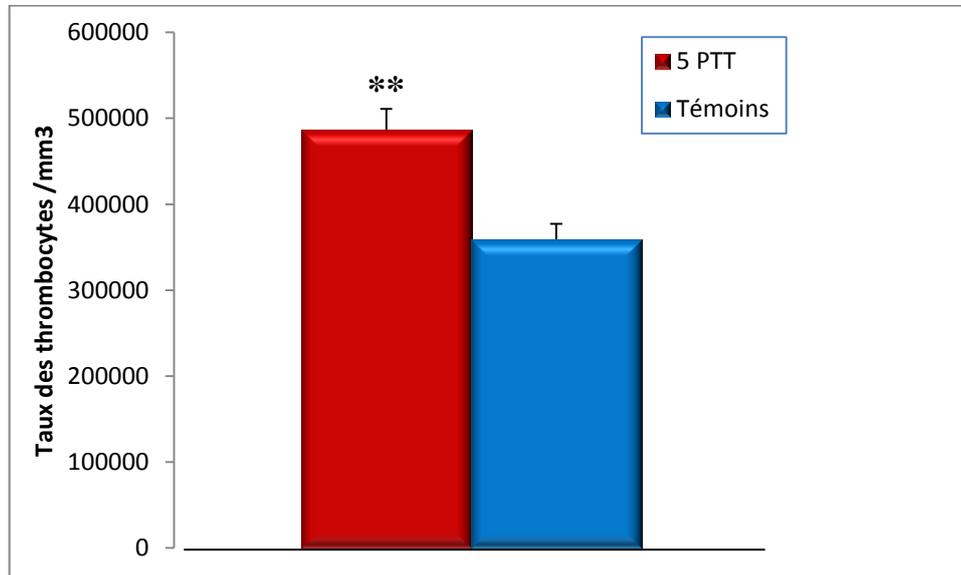


Figure 47 : L'effet du 5 PTT sur le taux des thrombocytes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** $p < 0.01$). (5 PTT vs Témoin).

5. Dosage des paramètres biochimiques

5.1. Action sur certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique

5.1.1. Profile lipidique (cholestérol, triglycérides)

L'administration de 5 PTT aux rats provoque une augmentation significative de la concentration sérique de cholestérol et des triglycérides par rapport aux rats témoins. ($p < 0.05$; $0,01$) respectivement (**Figures 48 et 49**).

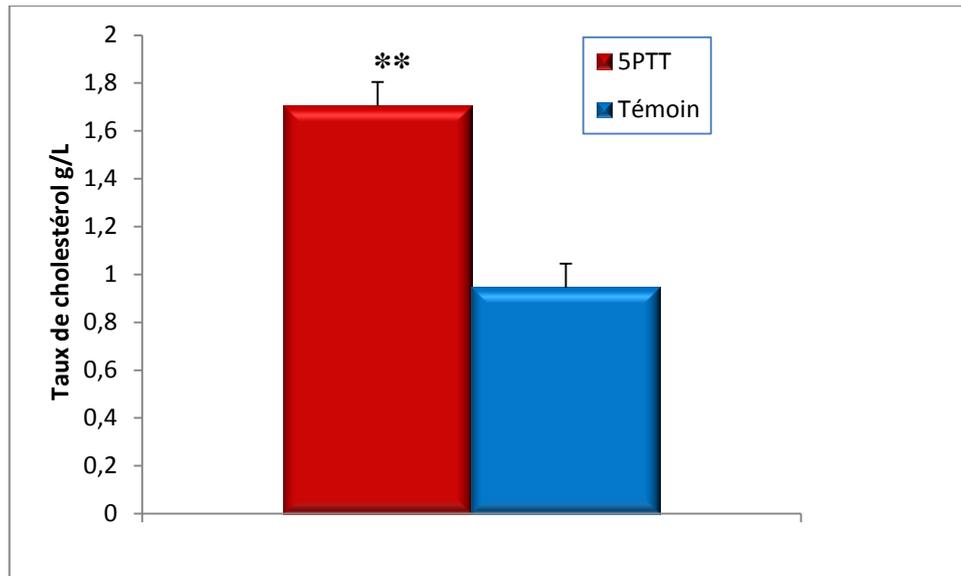


Figure 48: Comparaison du taux de cholestérol entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM (**: $p < 0.01$) (5 PPT vs témoins)

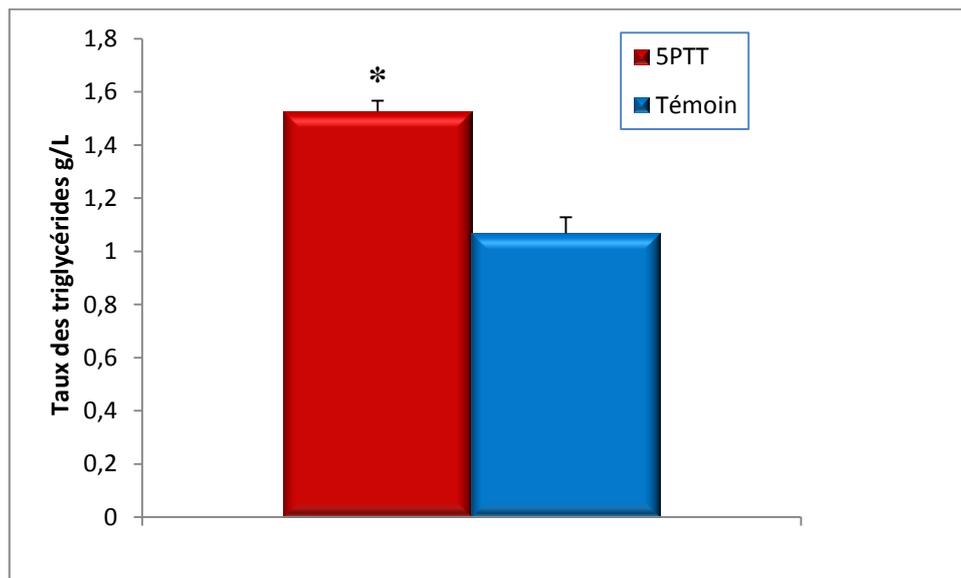


Figure 49 : Comparaison du taux de triglycérides entre les rats traités par 5PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées à la moyenne \pm SEM (*: $p < 0.05$) (5 PPT vs témoins)

5.1.2. Activité des transaminases l'aspartame aminotransférase (ASAT ou TGO) et l'alanine aminotransférase (ALAT ou TGP).

Le traitement des rats par le 5 PTT induit une augmentation très significative de l'activité enzymatique de l'alanine amino transférase (ALAT ou TGP).

Toutefois, le traitement statistique de nos résultats montre une augmentation significative ($p < 0,01$) de la teneur sérique en l'aspartame amino transférase (ASAT ou TGO) chez les rats ayant subi une exposition subchronique 5 PTT comparés aux animaux

témoins, ces résultats montrent clairement que le 5 PTT provoque un désordre fonctionnel au niveau hépatique. (**Figure 50 ,51**).

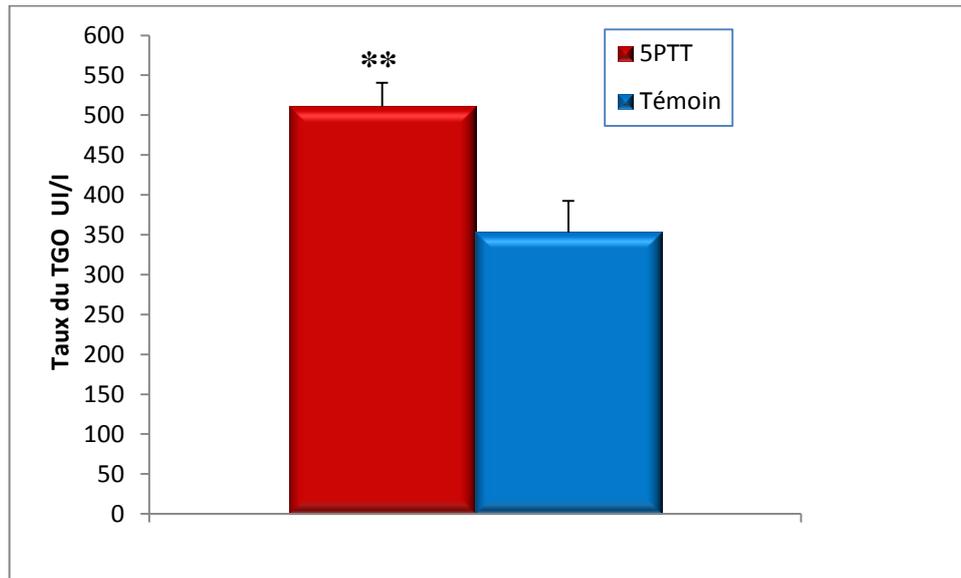


Figure 50 : Comparaison du taux du TGO entre les rats témoins et les rats traités par le 5 PTT, Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM (**: $p < 0.01$) .(5 PPT vs témoins)

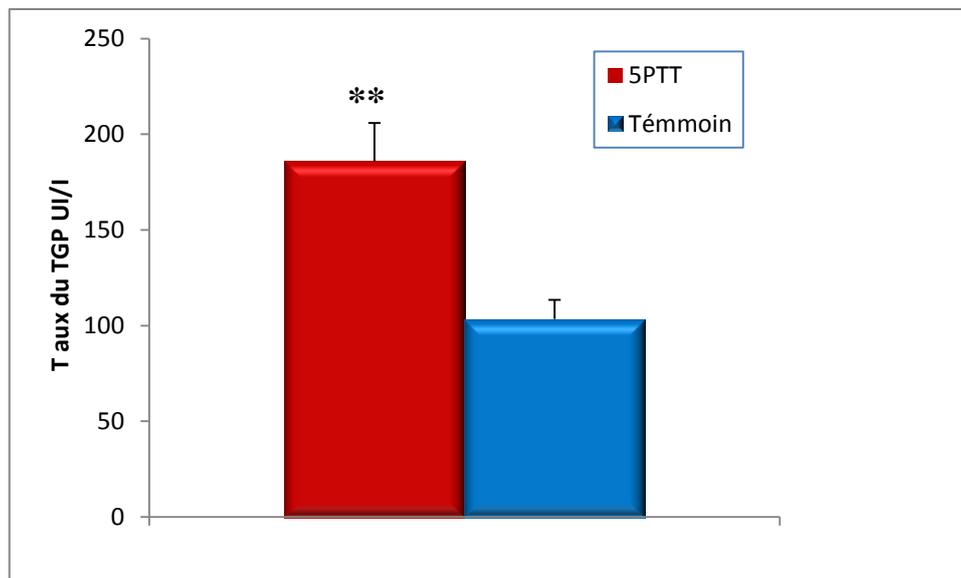


Figure 51: Comparaison du taux du TGP les rats traités par 5 PPT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM (**: $p < 0.01$). (5 PPT vs témoins).

5.2. Action sur la variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine

Les résultats des différents paramètres biochimiques (urée, créatinine) sont présentés dans les figures (52,53) respectivement.

Les valeurs relatives au taux de l'urée et la créatinine ne présente aucune différence significative ($P > 0.05$) entre les sujets exposés au 5 PTT et les sujets témoins.

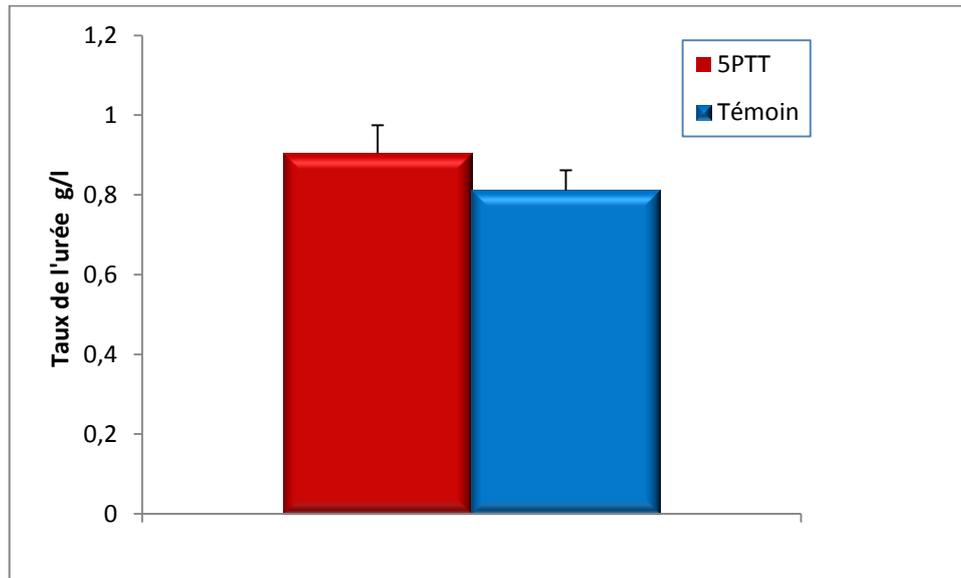


Figure 52 : L'effet du 5 PTT sur le taux sérique de l'urée. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ($p > 0.05$). (5-PTT vs Témoin)

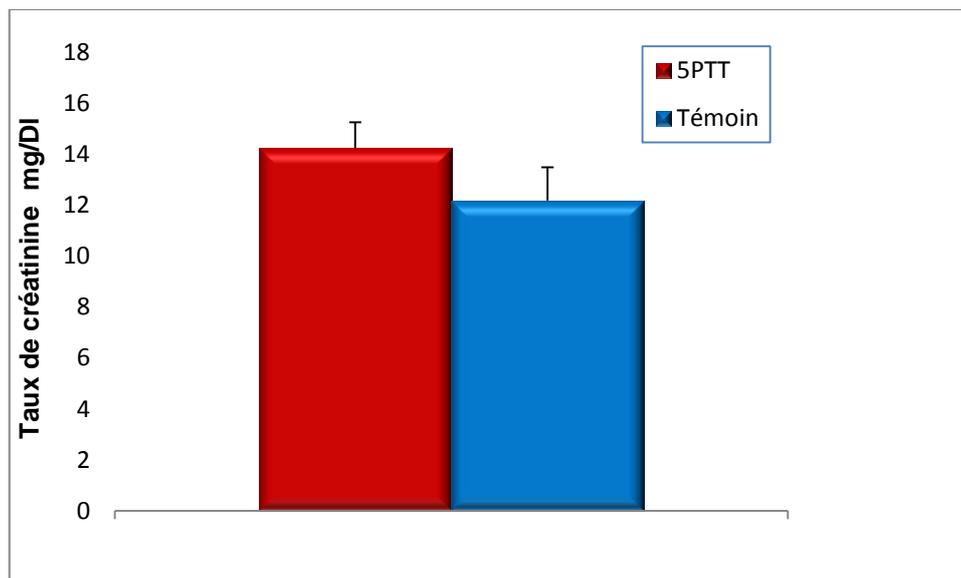


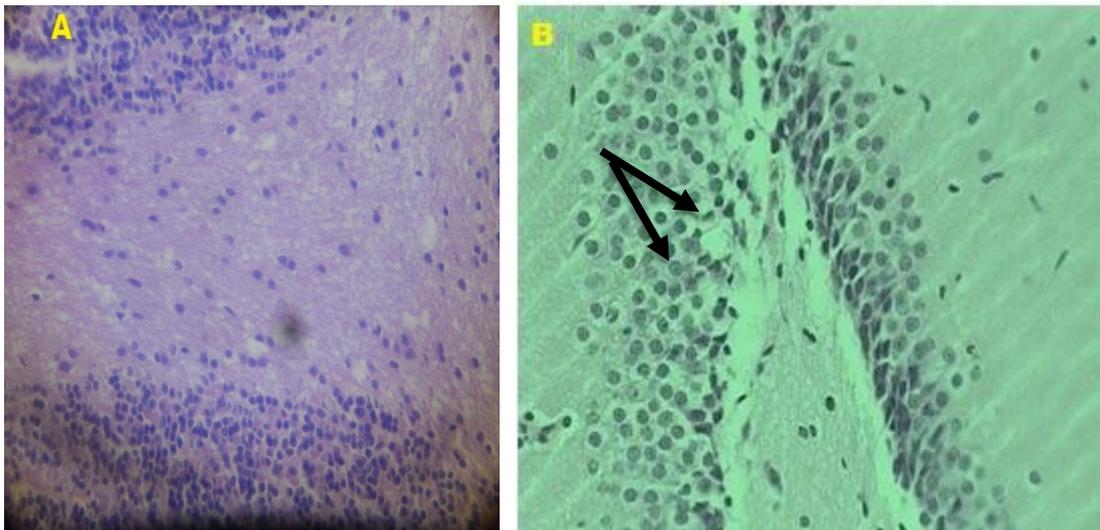
Figure 53: Comparaison du taux de la créatinine entre les rats témoins et les rats exposés au 5 PTT. Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. ($p > 0.05$). (5-PTT vs Témoin)

6. Etude histologique de tissus prélevé :

L'examen histologique est conçu dans le but de confirmer les résultats des tests du comportement, les tests hématologiques et biochimiques et de voir si l'administration de 5 PTT chez des jeunes rats peut provoquer des altérations de l'architecture tissulaire dans différents organes à savoir : le cerveau, le foie et les reins.

6.1. Histologie du cortex cérébral

L'observation microscopique réalisée sur des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral des rats exposés au 5 PTT pendant 1 mois à une dose de 10 mg/kg a entraîné un dommage tissulaire au niveau du cortex cérébral qui se manifeste par un agencement palissadique perivasculaire des oligodendrocytes, on note également la présence des cellules hyper chromatique chez les rats traité par le 5 PTT par rapport aux rats témoins. (**Figure 54**).



A : Cortex cérébral de rat témoin **B** : Cortex cérébral de rat traité par le 5 PTT

Figure 54 : vue au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébral coloré à l'hématoxyline et de l'éosine (G×40) Figure (54, A) représente une coupe histologique du cortex cérébral des rats témoins apparu avec une architecture normale .Figure (54, B) une section du cortex cérébral des rats traités au 5 PTT apparu avec une un agencement palissadique perivasculaire des oligodendrocytes, on note également la présence des cellules hyper chromatique (flèche noire)

6.2. Histologie du foie

Les coupes de tissus hépatiques prélevés chez les rats traités par le 5 PTT à 10 mg/kg pendant 30 jours révèlent après coloration à l'hématoxyline-Eosine, des changements histologiques caractérisés par une lyse hépatocyttaire caractérisés par une congestion des veines centrolobulaires (**Figure 55**) , associant des territoires de nécrose fragmentaire (**Figure 56**), ce qui atteste la toxicité du produit 5 PTT , par contre les échantillons des tissus hépatiques prélevés chez les rats témoins présentent un parenchyme normal

contenant une veine centrolobulaire bien visible et un aspect histopathologique subnormal sans signes inflammatoires .(Figure 58).

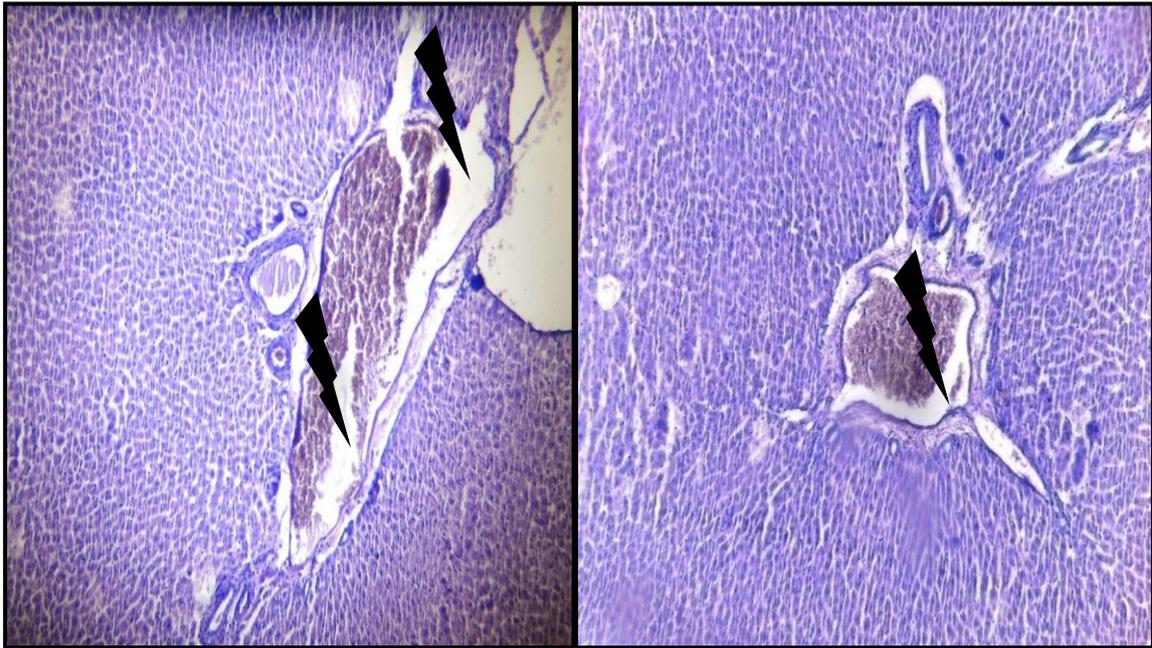


Figure 55 : Coupe histologique du tissu hépatique des rats traités par le 5 PTT avec la dose (10 mg/kg) montrant la congestion des vaisseaux Centro-lobulaire (flèches noire). Coloration éosine hématoxyline.(Gr X 40)

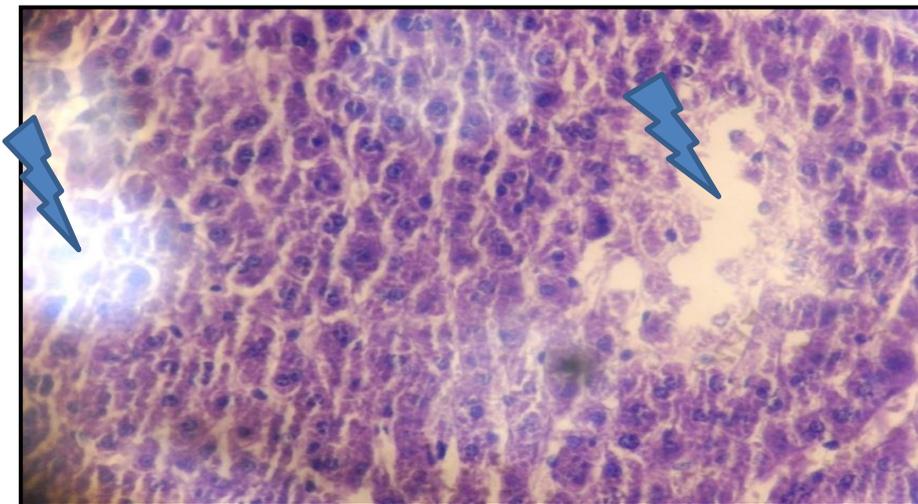


Figure 56 : Coupe histologique d'une section du tissu hépatique des rats traités par le 5 PTT avec la dose (10 mg/kg) montrant des territoires nécrosés (flèches bleu).

Coloration éosine hématoxyline (Gr X 40)

L'examen histologique révèle aussi dans plusieurs coupes et dans plusieurs secteurs du tissu hépatique, des infiltrats inflammatoires diffus modérés, à polynucléaires (**Figure 57**), observés sur les coupes des rats traités avec la dose 10 mg/kg comparativement aux témoins. Ces altérations de la structure affectent la fonction hépatique et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe.

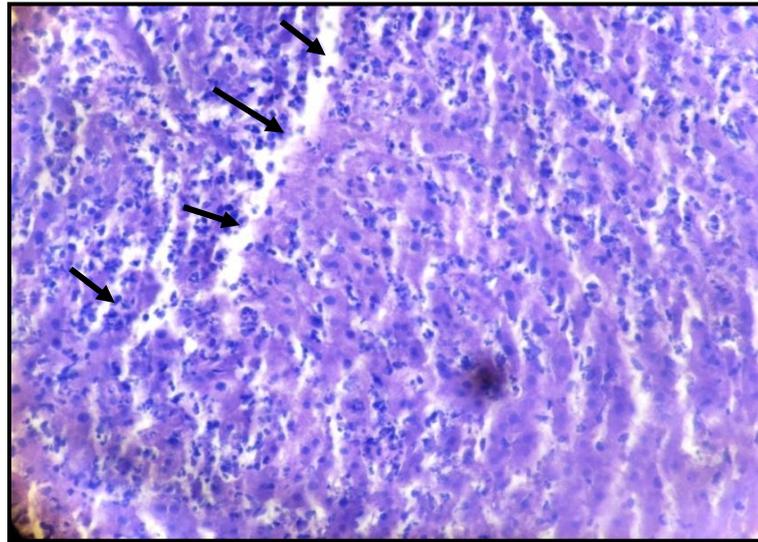


Figure 57 : Coupe histologique d'une section du tissu hépatique des rats traités avec la dose de 10 mg/kg montrant des infiltrats inflammatoires (flèche noir). Coloration éosine hématoxyline. (Gr X 40)

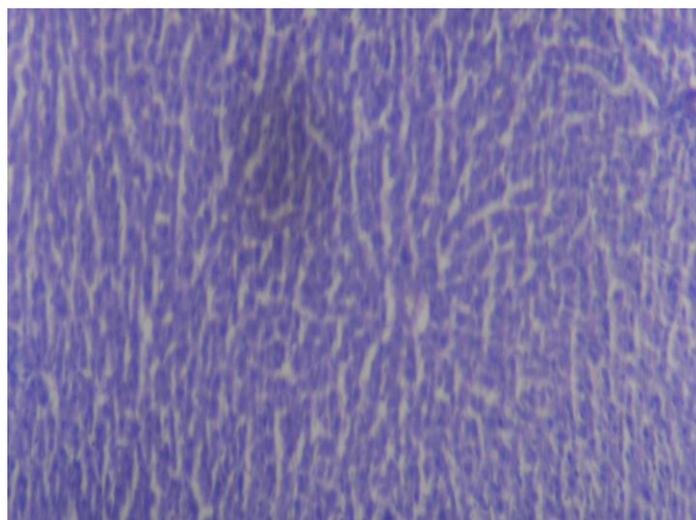


Figure 58 : coupe histologique dans la section de foie de rat témoin est apparues avec une architecture normale. Coloration éosine hématoxyline (Gr X 40).

6.3. Histologie des reins

Les résultats histologiques obtenus après une exposition des jeunes rats au 5 PTT ainsi que chez les rats témoins montrent un aspect histologique sub-normal sans signes inflammatoire, dystrophiques ou tumoraux chez les deux groupes expérimentaux (**Figure 59**).

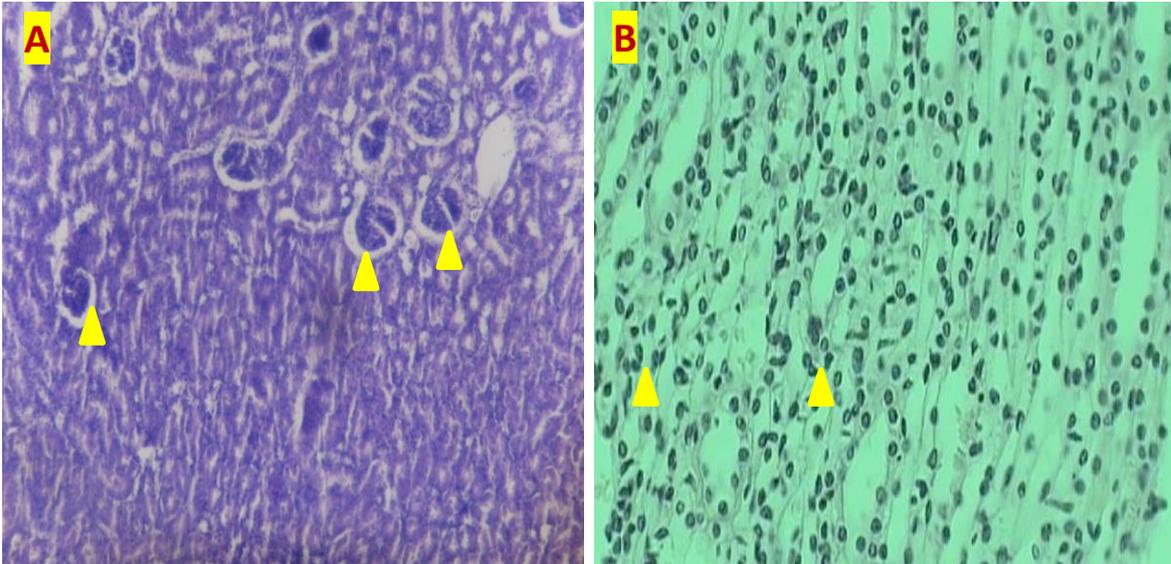


Figure (59) : La Microscopie optique de tissus rénal coloré a l'hématoxyline éosine (**Gr.x40**) dans des sections de rein de rats témoins (Figure 59A) et des rats traité au 5 PTT (Figure 59 B) sont apparus avec une architecture et capsule de Bowman normal ▲

2^{ème} partie : Exposition Aigue

1. Les tests neurocomportementaux

1.1. Evaluation d'un comportement d'exploration : test de l'open Field

Les résultats relatifs au test d'open Field révèlent que l'administration par voie intrapéritonéale du 5 PTT pendant 3 jours à une dose de 200 mg/kg provoque une hypoactivité locomotrice qui est traduite par une diminution du nombre de carreaux traversés, le nombre de redressement et le nombre de visite au centre ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,05$) respectivement, par rapport aux rats témoins.

En revanche, dans ce test aucune différence significative n'est observée en termes de de temps de latence, de nombre de toilettage et du nombre de défécation entre les deux lots. (**Figure 60**)

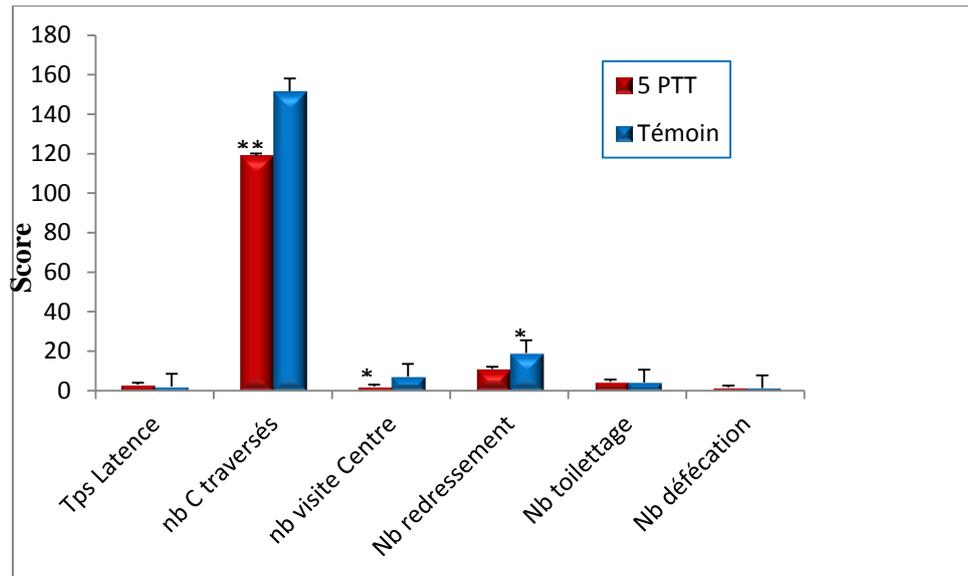


Figure 60 : Effet de l'exposition au 5 PTT sur l'activité locomotrice et comportement stéréotypé (Test open Field). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** : $p < 0.001$; * : $p < 0.05$).

1.2. Le test du labyrinthe en croix surélevé :

L'objectif de ce test est d'étudier les comportements des animaux liés à l'anxiété, qui consiste à mesurer le nombre d'entrées et la durée de séjour dans chacun des compartiments (bras ouvert et bras fermé).

Les résultats statistiques révèlent que durant le test du labyrinthe en croix surélevé, le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans les bras ouverts sont significativement diminués ($p < 0,01$) chez les rats traités par le 5 PTT par rapport aux rats témoins. Ce qui signifie que le 5 PTT provoque un état d'anxiétés accompagné d'une réduction des facultés exploratrices par son effet anxiogène (**figure 61**)

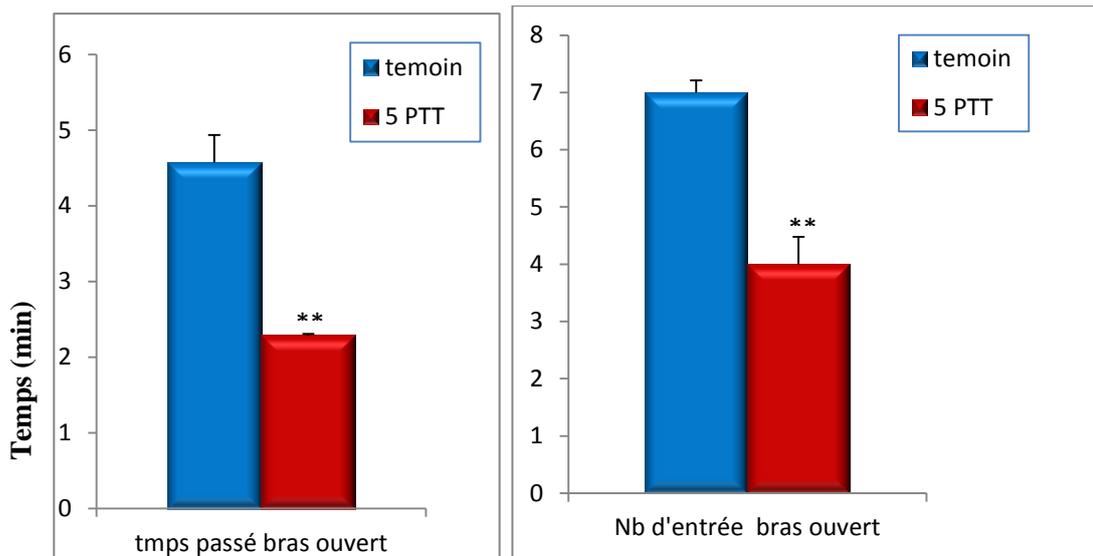


Figure 61 : Comparaison entre le nombre d'entrée dans le bras ouverts et le temps de séjour dans le bras ouvert chez les deux groupes expérimentaux sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** : $p < 0.01$)

1.3. Le test du labyrinthe en Y :

Il est souvent appelé test d'alternance spontanée, ce test permet d'évaluer la mémoire de travail qui consiste à retenir à court terme une information et l'utiliser immédiatement pour exprimer un comportement approprié, les animaux qui ont subi des lésions de l'hippocampe présentent de mauvaises performances dans ce test.

Les résultats obtenus pour le test de labyrinthe en Y montrent que le pourcentage d'alternance spontanée est significativement inférieur ($p < 0.05$) chez les rats exposés au 5 PTT par rapport aux rats témoins. (**Figure 62**)

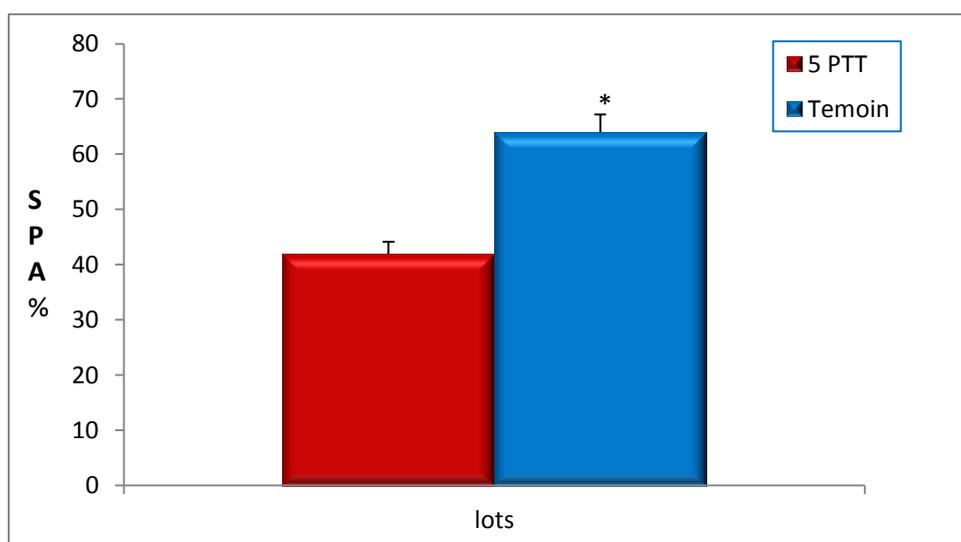


Figure 62 : Comparaison entre pourcentage d'alternance spontanées chez les différents groupes traités et non traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (* : $p < 0.05$)

Afin de renforcer les résultats obtenus des tests neurocomportementaux, nous avons procédé à un dosage du taux de la glycémie pour confirmer l'état de stress survenu lors d'un traitement des rats par le 5 PTT, sachant que le glucose est un bon indicateur de stress.

Les résultats montrent une élévation du taux de glucose sanguin chez les rats exposés au 5 PTT par rapport aux rats témoins. (**Figure 63**)

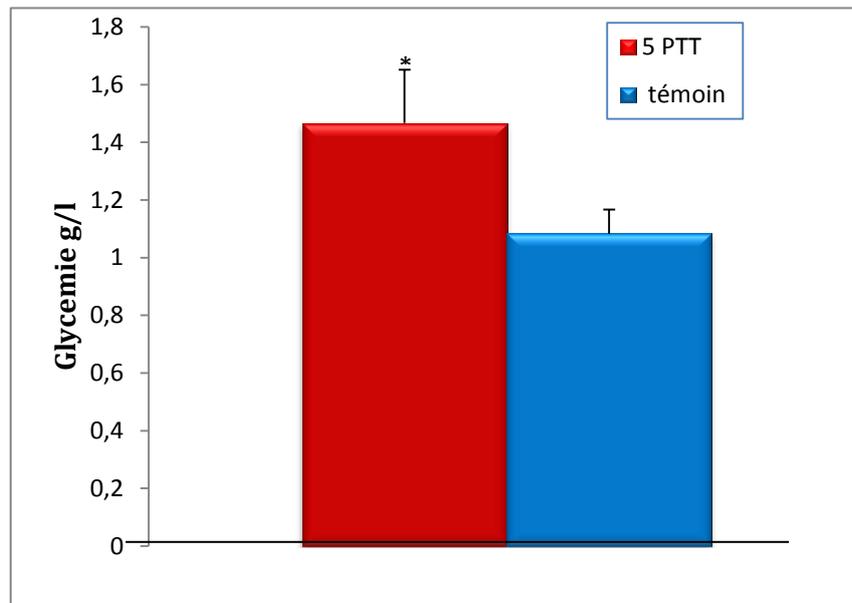


Figure 63: L'effet du 5 PTT sur le taux de la glycémie. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (* $p < 0.05$). (5 PTT vs Témoin).

2. Effet sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes tissulaires

2.1. Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase est une sélénoprotéine qui constitue sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène.

La variation de l'activité enzymatiques du glutathion peroxydase (GPx) au niveau érythrocytaire, cérébral, hépatique et rénal des rats traités par le 5 PTT et des rats témoins sont présentés dans les figures (64, 65, 66,67) respectivement.

Comme le montre les figures, un traitement aigüe des rats par le 5 PTT provoque une diminution significative du glutathion peroxydase (GPx) au niveau érythrocytaire, cérébral

et hépatique ($p < 0.001$; $p < 0.05$; $p < 0.05$) respectivement comparativement aux rats témoins.

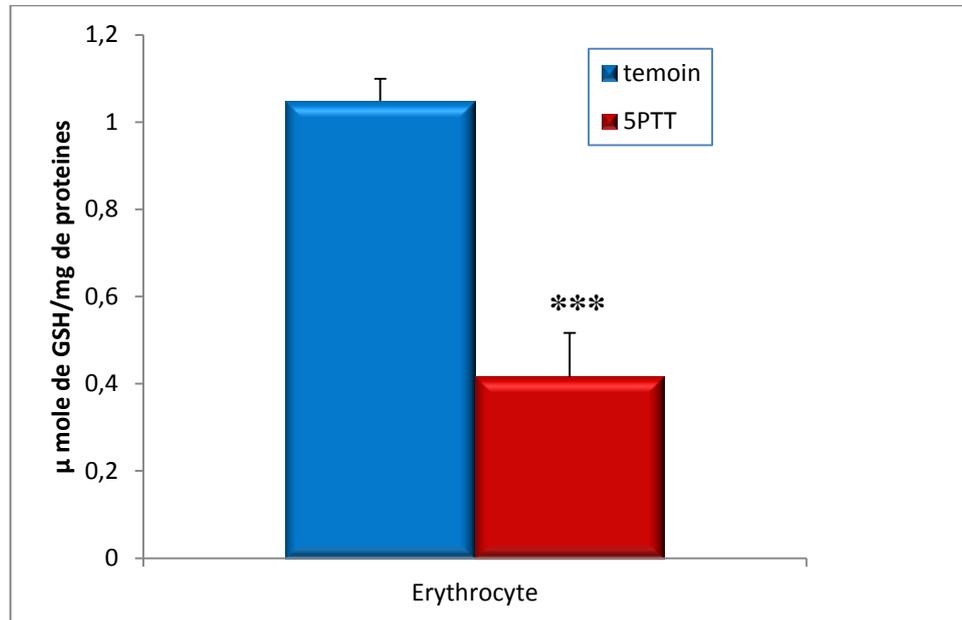


Figure 64 : Comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau érythrocytaire chez les rats traités par 5PTT et les rats témoins.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** * : $p < 0.001$). (5 PTT vs Témoin).

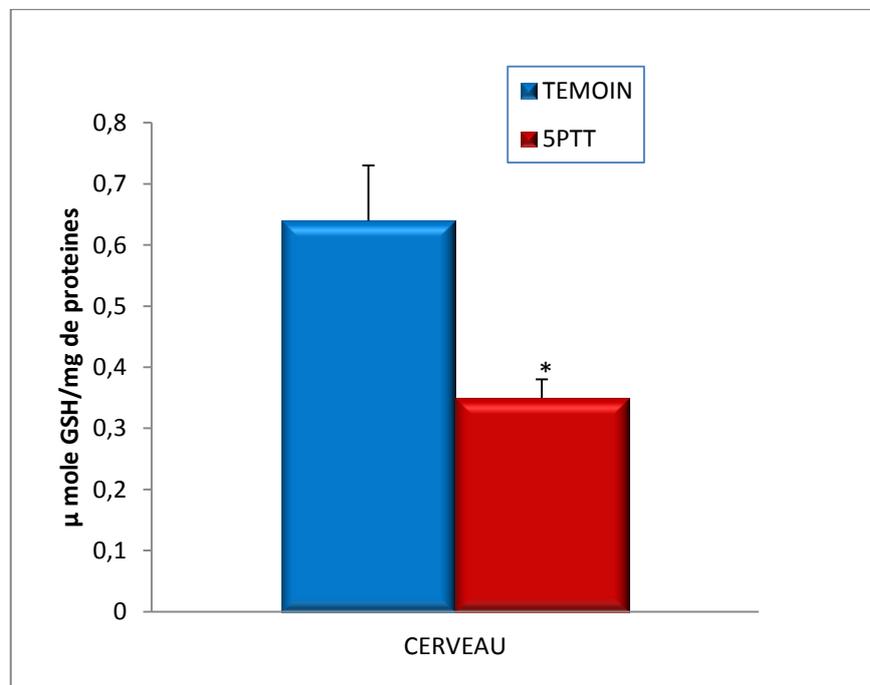


Figure 65: comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau cérébral chez rats traités par 5PTT et les rats témoins.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (* : $p < 0.05$). (5 PTT vs Témoin).

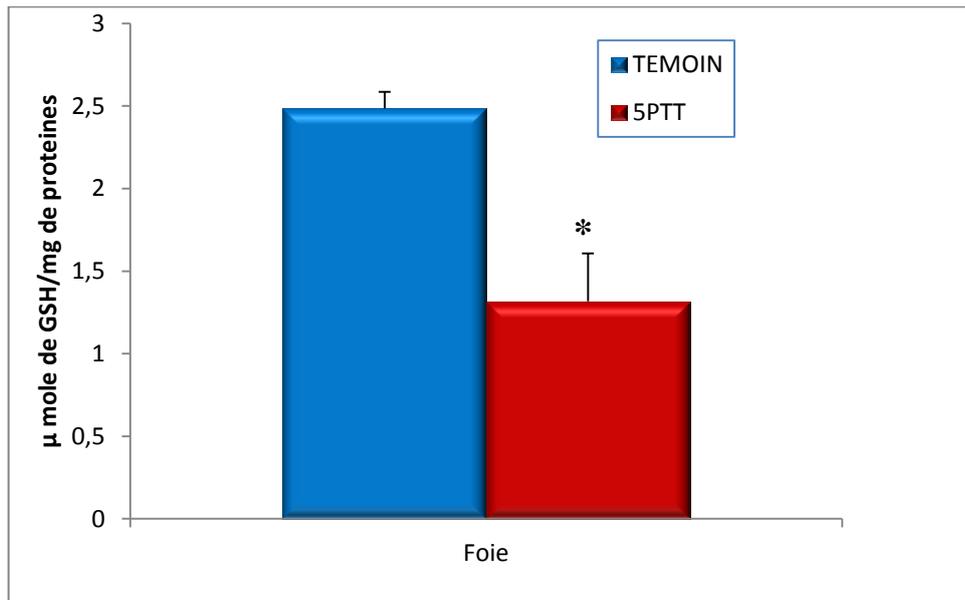


Figure 66 : comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau hépatique chez rats traités par 5PTT et les rats témoins.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (* : $p < 0.05$). (5 PTT vs Témoin).

En revanche aucune différence significative dans les reins des deux groupes expérimentaux n'a été signalée. (**Figure 67**).

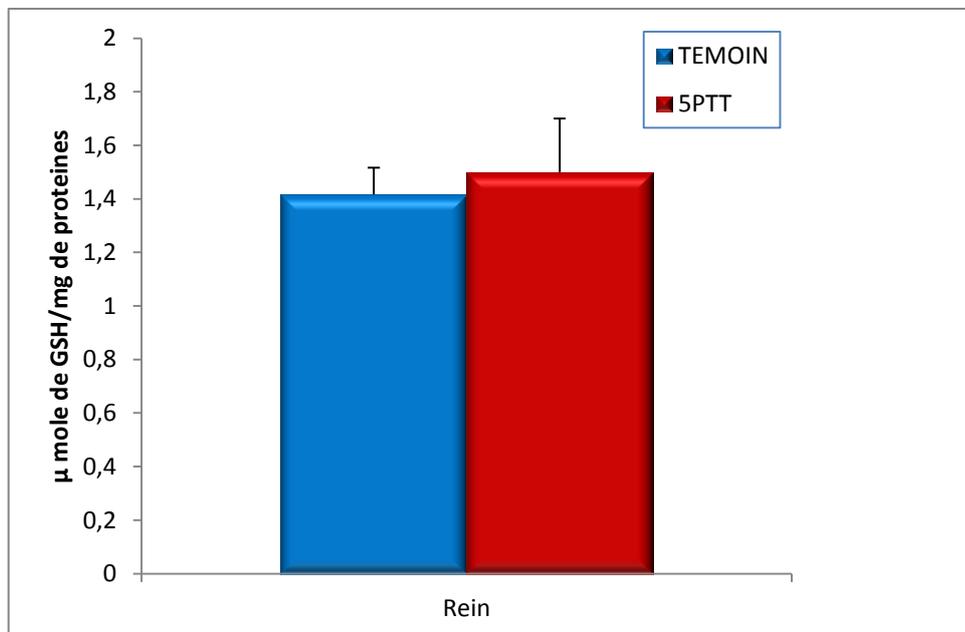


Figure 67: comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau rénal des rats traités par 5PTT et les rats témoins.

2.2. Activité de la catalase (CAT)

La catalase est une enzyme peroxysomale dont le rôle est de prévenir la peroxydation des biomolécules induites par l'eau oxygénée, cette enzyme catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.

Le suivi de l'activité enzymatique de la catalase au niveau érythrocytaire, cérébral, hépatique et rénal est présenté en figures : **68, 69, 70,71** l'analyse statistique montre que le traitement des rats par le 5 PTT induit une diminution très significative de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans les érythrocytes, le foie et le cerveau comparativement aux rats témoins.

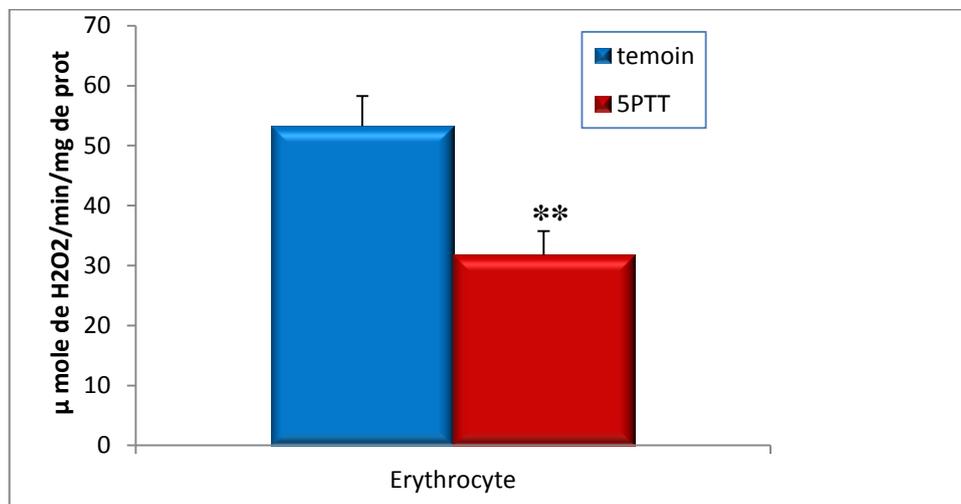


Figure 68 : comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau érythrocytaire chez les rats traités au 5PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** : $p < 0.01$). (5 PTT vs Témoin).

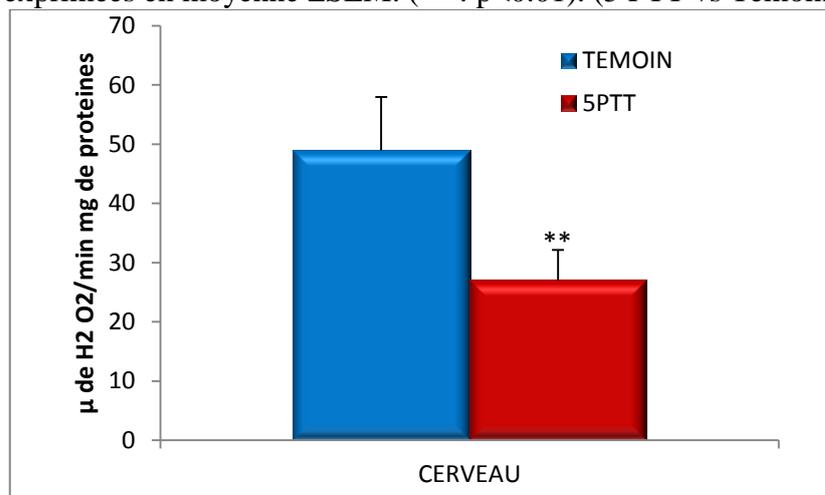


Figure 69 : comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau cérébral chez les rats traités au 5PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (** : $p < 0.01$). (5 PTT vs Témoin).

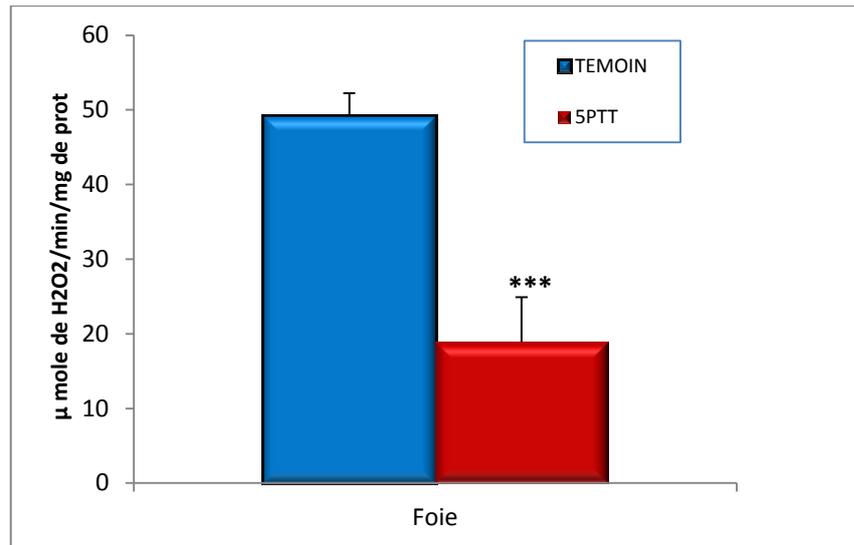


Figure 70: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau hépatique chez les rats traités par 5PTT et les rats témoins, Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (***) : $p < 0.001$). (5 PTT vs témoin).

En revanche une analyse d'ANOVA n'a enregistré aucune différence significative de l'activité enzymatique de la catalase au niveau rénal chez les deux groupes expérimentaux. (**Figure 71**).

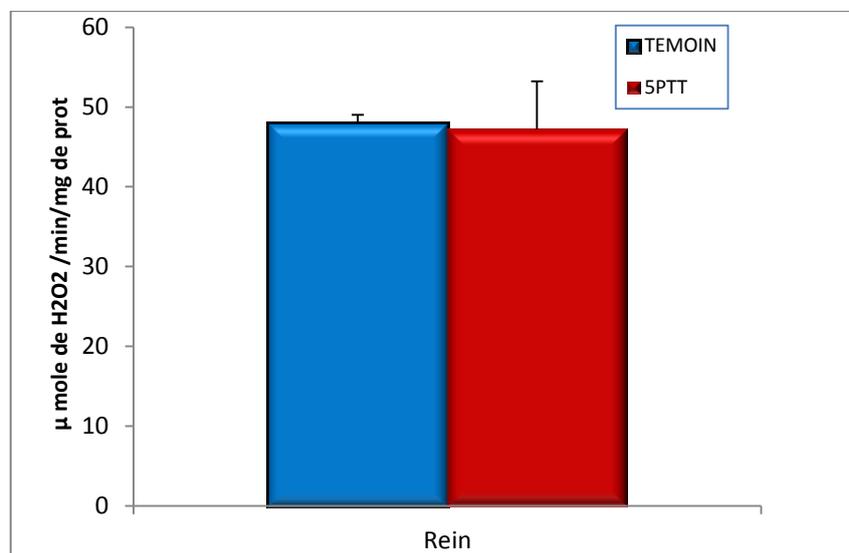


Figure 71: comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau rénal des rats traités par 5PTT et les rats témoins.

3. Activité des bio-marqueurs non enzymatiques du statut oxydant Glutathion réduit

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) connu par son puissant pouvoir antioxydant. Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire, synthétisé par le foie et représente le premier système de défense antioxydant non enzymatique des cellules.

Les graphiques décrivant l'effet de 5 PTT sur le taux de glutathion réduit sont présentés dans les figures : 72, 73, 74,75.

Les résultats obtenus montrent que l'exposition aiguë au 5 PTT révèle une diminution significative de de l'activité de Glutathion réduit au niveau érythrocytaire et cérébral chez les sujets traités au 5PTT par rapport aux sujets témoins. (Figure 72,73).

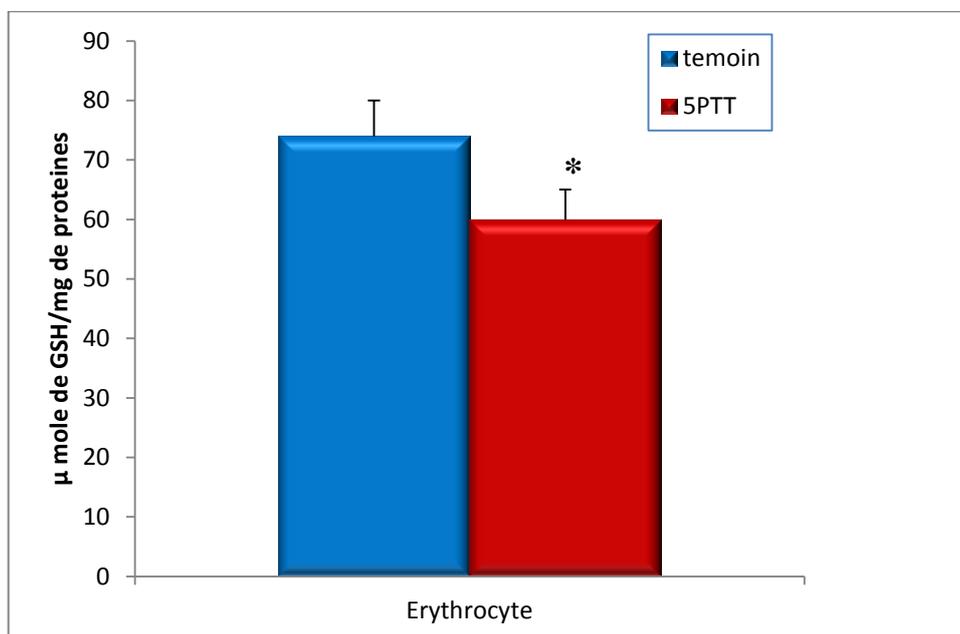


Figure 72: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau des érythrocytes des rats traités par 5PTT et les rats témoins, Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (*: $p < 0.05$). (5 PTT vs Témoin)

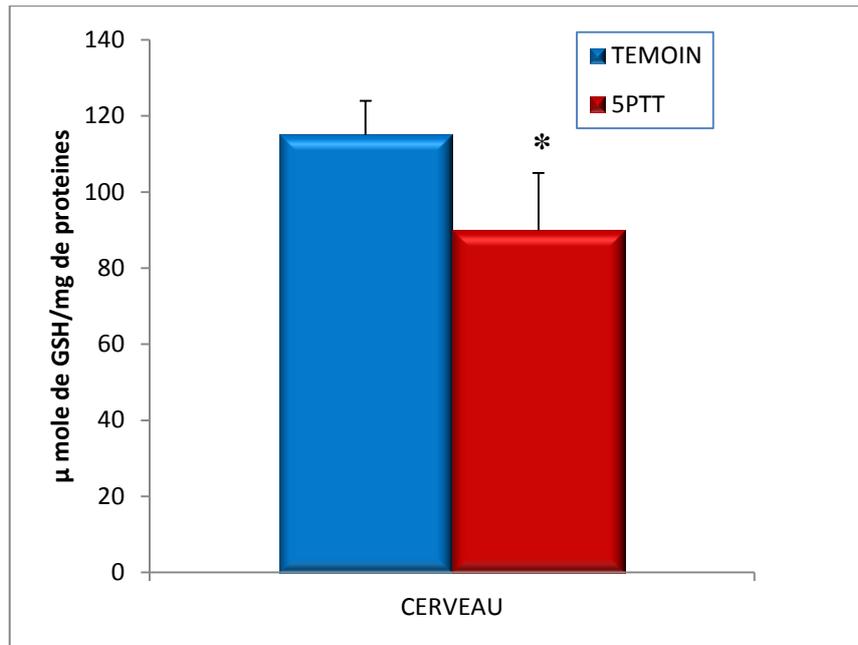


Figure 73 : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau cérébral chez les rats traités par 5PTT et les rats témoins, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (*: $p < 0.05$). (5 PTT vs Témoin).

Par ailleurs les résultats d'analyses de la teneur tissulaire en glutathion réduit (GSH) au niveau hépatique et rénal montrent qu'il n'existe pas de différences significatives chez les deux groupes expérimentaux. (**Figures 74 et 75**).

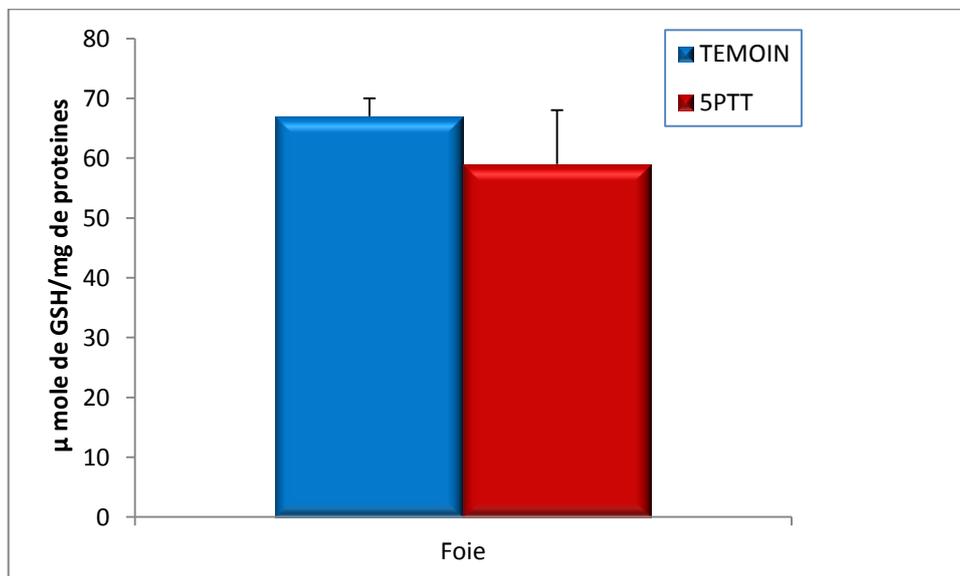


Figure 74 : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau hépatique des rats traités par 5PTT et les rats témoins.

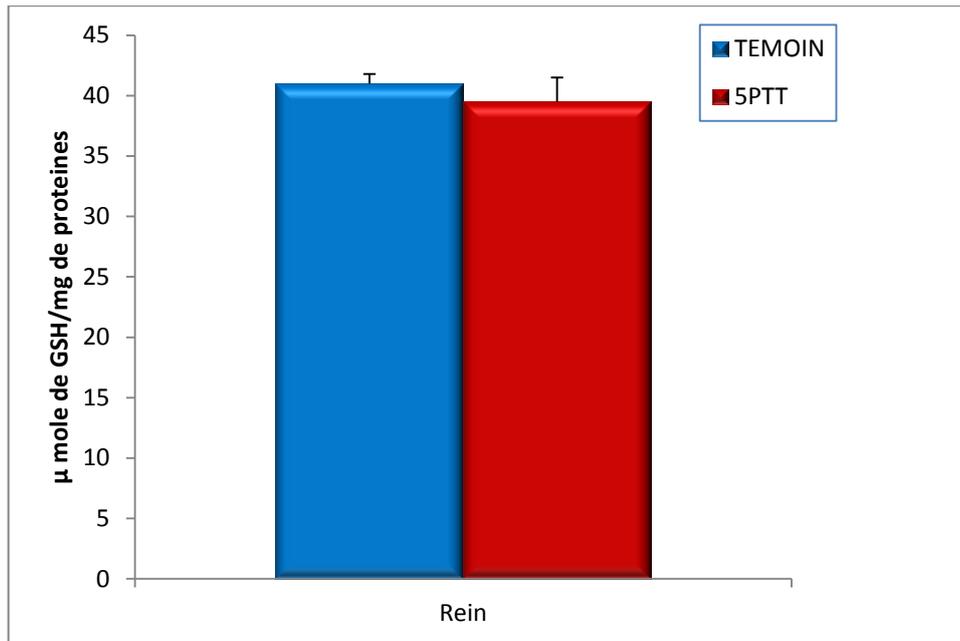


Figure 75: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de Glutathion réduit au niveau rénal des rats traités par 5PTT et les rats témoins,

4. Etude histologique de tissu prélevé :

4.1. Le cerveau

Une observation microscopique des tissus prélevés au niveau du cortex cérébral chez des rats traités au 5PTT à une dose de 200mg/kg et les rats témoins montre un aspect histologique sub normal sans signes inflammatoires, dystrophiques ou tumoraux chez les deux groupes expérimentaux (**Figures 76**)

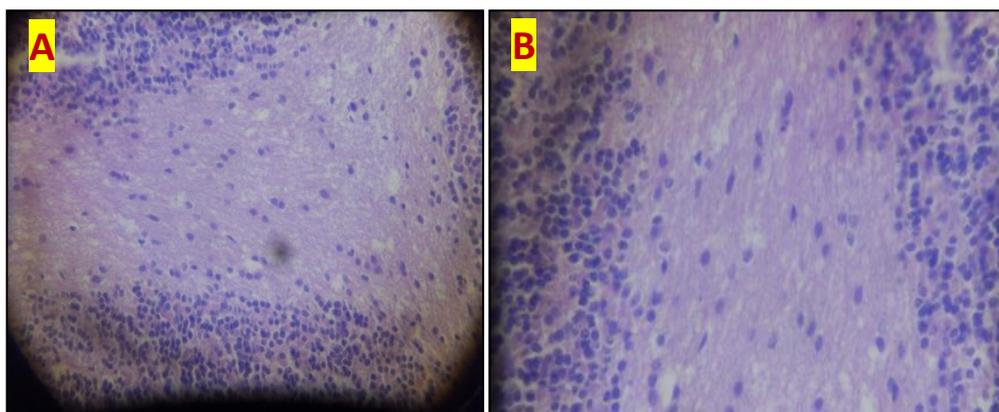


Figure 76 : vue au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébral de rat témoin coloré à l'hématoxyline et de l'éosine (G×40) Figure (76, A) et une section du cortex du tissu cérébral de rat traité au 5 PTT à une dose de 200mg/kg Figure (76 B) apparus avec une architecture normale.

4.2. Le foie :

Les coupes de tissus hépatiques prélevés chez les rats traités par le 5 PTT à une dose de 200 mg/kg montre une congestion vasculaire de la veine centro-lobulaire et congestion sinusoiïde et en plus une dystrophie hépatocytaire a noyau hyperplasique, chromatine fine parfois motté, ainsi indique la présence des pigments biliaire dans les espaces inter hépatocytaire.(**Figure 77**).Par contre chez les rats témoins l'histologie du foie présente un aspect histologique subnormal sans signes inflammatoires, dystrophiques ou tumoraux (**Figure78**).

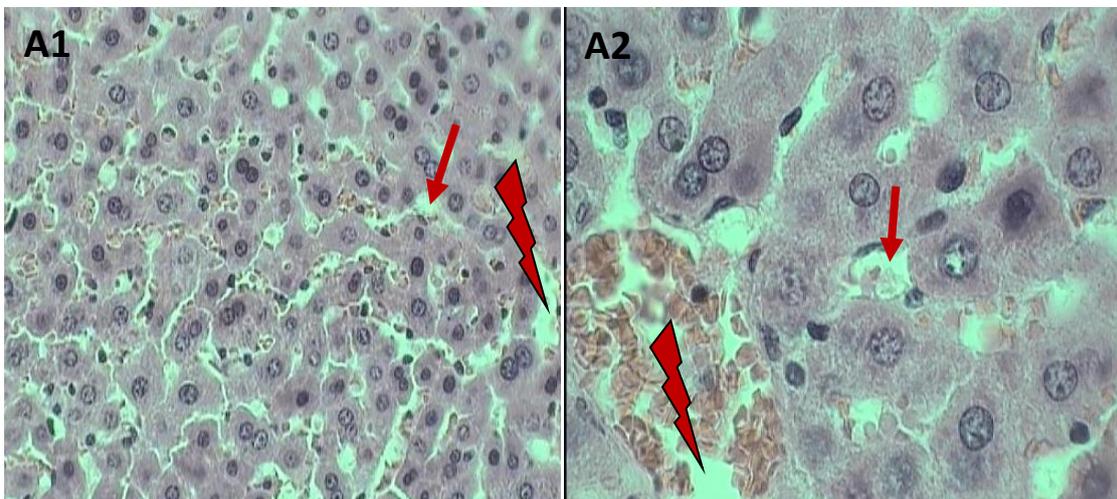


Figure 77: Observation microscopique d'un tissu hépatique coloré à éosine hématoxyline (Gr×40 (A1) et Gr×100 (A2)) des rats traités par PTT avec la dose (200 mg/kg) montrant une congestion vasculaire de la veine centro-lobulaire (flèches rouge).

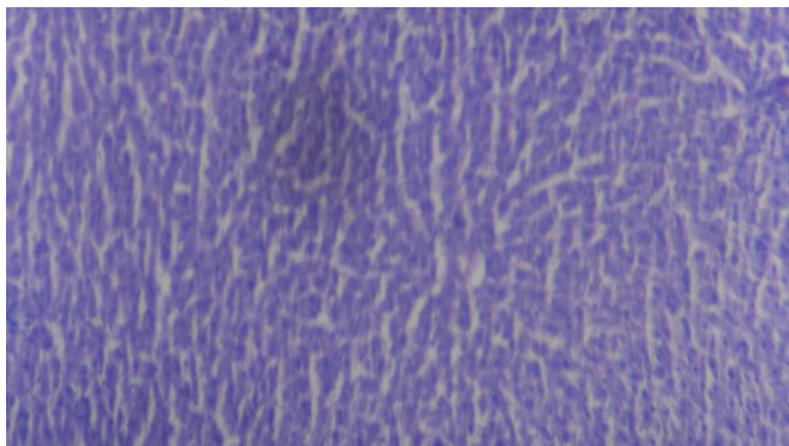


Figure 78: Histologie de section d'un tissu hépatique de rat témoin coloré à éosine hématoxyline (Gr×40) montrant une architecture normale. Coloration éosine hématoxyline.

DISCUSSION

Discussion

Certains triazoles présentent une classe de pesticides utilisés dans l'agriculture pour empêcher la croissance des champignons sur les légumes, céréales, soja, graines et une variété de fruits (**Hester et al., 2012 ; Heinse et al., 2018**).

1,2, 4-triazoles est bien connu pour son large éventail d'activités biologiques (**Kumudha et al., 2014**), il possède un puissant effet antifongique (**Xi et al., 2012 ; Miceli et al., 2015**), antibactérien (**Haibaoui et al., 2017**), antiviral (**El-Sayed et al., 2017**), anticonvulsivant (**Asif et al., 2015**), antitumoral (**Thakur et al., 2016**), insecticide (**Hamdi et al., 2019**) et en tant qu'un anticorrosif (**Ouici et al., 2013**).

Le mécanisme pharmacologique des composants triazoliques sont liés à l'inhibition des enzymes du Cytochrome P450(CYP) qui assure une étape critique dans la biosynthèse de l'ergostérol, un stéroïde nécessaire à la synthèse de la paroi des cellules fongiques (**Guengerich et al., 2017; Hamdi et al., 2019**).

Cependant les triazoles sont estimés comme des substances chimiques peuvent causer des difficultés pour la santé humaine par une large gamme de propriétés toxicologiques (**Chambers et al., 2014; Heise et al., 2015**). Ils modifient le fonctionnement des cellules en troublant de nombreuses voies métaboliques (**Nesnow et al., 2011 ; Kaur et al., 2016**). L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'ils sont 3 millions de cas d'empoisonnement par pesticides chaque année et jusqu'à 220 000 morts. De plus, il existe une relation très étroite entre l'exposition humaine aux pesticides dont les dérivés triazoliques font parties et un certain nombre de pathologies telles que la perturbation endocrinienne (**yang et al., 2018**), mutagénicité (**Bhinder et Chaudhry, 2013**), neurotoxicité (**Galal et al., 2014**), cancérogénicité (**Greim et al., 2015**), hépatotoxicité (**Saad et al., 2017**) et la néphrotoxicité (**Hamdi et al., 2019**).

1. La croissance pondérale et le poids des organes (cerveau, foie et reins) :

Notre expérimentation a permis de distinguer en premier lieu l'évolution du poids corporel qui révèle clairement que le poids des rats exposés au 5 PTT est significativement inférieur à celui des rats témoins, ce qui indique une diminution de la prise alimentaire. Cela suggère que le 5 PTT a un effet anorexigène dû à son action sur certains centres nerveux responsables de la régulation de la satiété et de la faim. Ceci est en accord avec les travaux de (**Anses., 2011 ; Raj et al., 2014**), qui rapportent que la diminution du poids corporel est

liée à la réduction de la prise alimentaire suite à une exposition subchronique au prothioconazole.

De même, le résultat obtenu est similaire à celui de **Martin et al. (2007)** qui montrent que certains dérivés triazoliques tel que le triadimifon, entraîne une baisse de poids corporel qui est due à une diminution de la prise alimentaire suite à une hépatotoxicité. La réduction de poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat. (**Djeffal et al ., 2015**).

En outre, **Bonnard et al. (2010)**, ont montré une réduction significative du poids corporel des rats wistar exposés au prothioconazole. Ce composé pourrait affecter en particulier les récepteurs dopaminergiques, sérotoninergiques et glutaminergiques en sachant que la dopamine est impliquée dans la physiologie de la faim (**Reeves et al., 2003**) et pourrait jouer le rôle principal dans le contrôle de la satiété (**Torres et Nowson, 2004**).

Il ressort de ces résultats que l'action anorexigène observée lors de l'exposition par les dérivés triazoliques, prennent appui pour une large part dans la modification de la transmission glutamatergique, catécholaminergique et sérotoninergique (**Crofton ,1996**). Dans la même série d'expérimentation, nous avons observé une réduction significative du poids cérébral qui peut être expliqué selon (**EPA, 2009 ; PRD, 2012**) par une diminution du poids des structures cérébrales. Des observations similaires ont été rapportées par différents auteurs (**Bonnard et al ., 2010**)

Étant donné que le foie est l'organe le plus endommagé après une exposition aux pesticides (**Gathwan et al., 2013 ; Heise et al., 2018**). Nous avons enregistré après une exposition subchronique des jeunes rats Wistar au 5 PTT une augmentation significative du poids hépatique par rapport à celui des rats témoins. Nos données sont en accord avec ceux de (**Heise et al 2015; Saad et al.,2017 ; Hamdi et al.,2019**) ; Ces études ont montré que le traitement des rongeurs avec des doses élevées des dérivés triazolique tels que epoxiconazole et propiconazole entraînent une augmentation du poids du foie et peuvent également provoquer des tumeurs hépatocellulaires .

Par ailleurs, le poids rénal ne présente aucune différence significative entre les rats exposés au 5 PTT et les rats témoins, et cela se contrarie avec les travaux de : **Gotez et al. (2007); Bonnard et al. (2010); Heise et al., (2018)** qui ont prouvé que l'exposition au dérivés azolés

comme le prothiconazole et l'époxiconazole induisent une élévation significative du poids rénal interprété par une hypertrophie des reins.

2. Impact de 5-phenyl-1, 2,4-triazole-3-thione (5PTT) sur les paramètres hématologiques et biochimiques

Toutefois, les analyses hématologiques ont montré une réduction significative du taux d'hémoglobine ainsi que le taux d'hématocrite. Ces résultats corroborent avec les travaux de **(PRD, 2012)** qui a suggéré que le mycobutanil, entraîne une chute du taux d'hémoglobine peut être due à une anémie. Ceci est argumenté par une étude de **Bonnard *et al.* (2010)** sur l'intoxication par inhalation de 4 mg d'aminotriazole par litre d'air, qui a prouvé que cette exposition entraîne l'apparition d'anomalies hématologiques telles que l'anémie.

De plus, les données relatives au comptage d'érythrocytes révèlent qu'il y a une régression significative d'érythrocytes chez les animaux traités au 5 PTT comparé aux animaux témoins. Nos résultats se concordent avec ceux obtenus par **(PRD, 2010)** qui a confirmé cette carence en érythrocytes,

En effet, La réduction du taux des érythrocytes peut être due à son élimination par le système réticulo-endothélial. Ce qui a été confirmé par les travaux de **Franceschi *et al* (2000)**, qui ont rapporté que suivant à un traitement anti fongique, induit une nette augmentation des réticulocytes. Ainsi qu'un phénomène pro-oxydant peut induire une sénescence prématurée d'érythrocytes et un retrait phagocytaire par des macrophages de moelle. Ce qui aboutit à un syndrome thalassémique, ainsi qu'une anémie falciforme.

Dans le même contexte, l'exposition au 5 PTT induit chez les rats une augmentation significative du taux des leucocytes et des thrombocytes comparativement aux rats témoins. Cela est similaire avec les résultats obtenus par **(PRD, 2010)** qui ont prouvé le même effet sur le taux des leucocytes et des thrombocytes suivant une étude avec le mycobutanil. De même les recherches de **Bonnard *et al.* (2010)** ont trouvé une augmentation du taux des leucocytes qui est expliqué par une réaction inflammatoire suite à une exposition au prothiconazole.

En effet, les analyses des paramètres biochimiques constituent un outil appréciable pour évaluer et suivre les altérations possibles du métabolisme des lipides, des protéines ou des carbohydrates, qui peuvent être associées à des lésions au niveau des organes résultant de l'effet du différent polluant. Le foie est l'organe cible majeure pour les produits chimiques et

les médicaments (**Saad et al., 2017**). L'hépatotoxicité représente donc un critère important pour évaluer l'effet d'un xénobiotique particulier (**Al-Awthman et al., 2012**). En plus, le foie est un organe essentiel dans le métabolisme énergétique. Il synthétise le cholestérol et les triglycérides et il produit et recycle les lipoprotéines (**Postic et Girard, 2008 ; Heise et al., 2015**)

En effet, dans notre étude, une exposition de 30 jours chez les rats au 5 PTT a augmenté significativement les niveaux du cholestérol, et des triglycérides plasmatiques. Selon **Hamdi et al.(2019)**, cette augmentation en cholestérol sérique peut être attribuée à l'effet des pesticides sur la perméabilité de la membrane cellulaire du foie et/ou le dysfonctionnement hépatique prouvé par les perturbations de l'activité des transaminases, et encore du l'hyperglycémie provoque un désordre métabolique traduit par des changements de la voie normale du glucose ; où une partie du glucose est transformée en acides gras et glycérol puis la synthèse des triglycérides et du cholestérol (**Yang et al., 2018**).

De plus, plusieurs études ont montré que l'augmentation de la production des ROS peuvent provoquer des altérations des biomarqueurs sériques (**Mustafa et al., 2015; Cao et al., 2015**).

Les transaminases (ASAT et ALAT), dans le plasma reflètent l'activité fonctionnelle du foie. Ces enzymes sont principalement utilisées dans l'évaluation des dommages et du dysfonctionnement hépatiques (**Heise et al., 2015**).

Par ailleurs, Les données obtenus en terme d'activité enzymatique des ASAT et ALAT ont démontré que l'administration subchronique du 5 PTT est accompagné d'une élévation significative du taux de ces enzymes, cela confirme les résultats des études antérieures, réalisées sur des rats adultes qui ont montré que le myclobutanil peut induire l'endommagement du foie par l'élévation des taux sanguins en transaminases (ASAT et ALAT) (**EFSA., 2009 ; Raj et al., 2012**).

Ainsi que le traitement au triadimifon à des concentrations de 25mg/kg porte une action hépatotoxique qui mène à l'altération de la perméabilité de la membrane plasmique et par conséquence la fuite des enzymes du tissu vers le plasma entraînant ainsi une nécrose et affection hépatique (**El-Demerdash et al., 2012 ; Heise et al., 2018**).

Le rein est un organe cible pour les composés xénobiotiques notamment les polluants environnementaux suite au volume sanguin supplémenté élevé et leur rôle en concentrant les

solutés. Cette susceptibilité du rein à la toxicité produise une variété d'effets toxiques rénaux impliquant les cellules tubulaires et glomérulaire (**Raj et al., 2014**).

L'urée et la créatinine sanguines des animaux d'expérience sont parmi les paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Raj et al., 2014**).

En effet, les analyses sériques ont révélé que l'exposition à une dose de 10mg/kg de 5 PTT durant 30 jours n'a pas influencés sur le taux sériques de l'urée et la créatinine. Ces résultats s'accordent avec l'étude de **Somchit et al (2012)** qui ont montré que l'exposition à différentes doses (10, 50 et 100 mg/kg/j) pendant 14 jours au voriconazole n'entraîne aucun effet sur le taux sérique de l'urée et créatinine.

3. Effet de 5 PTT sur le comportement cognitif chez les rats

Après les données biochimiques, nous avons jugé utile d'étudier l'effet de l'exposition aigue et subchronique au 5 PTT sur l'état de l'anxiété, la mémoire et l'exploration et de l'activité locomotrice des rats de notre expérimentation ; Nous avons choisi une batterie des tests d'ordre neurocomportemental.

Concernant le test l'exploration et de l'activité locomotrice open Field suite à une exposition aigue et subchnique des rats au 5PTT on a observé une hypoactivité locomotrice, ce changement dans l'exploration d'environnement peut être expliqué par la peur de l'environnement nouveau (**EFSA, 2014**) ou l'action de 5 PTT sur le système de transmission dopaminergique qui se traduit soit par une baisse de la synthèse et de la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, soit par inhibition des récepteur post synaptiques. Ces résultats sont en accord avec les travaux entrepris par (**WHO, 2004**) qui rapport que le triadimefon un dérivé de triazol diminue l'activité locomotrice par inhibition de la synthèse et la libération de dopamine dans la synapse. (**Ikaidi et al., 1997**). De plus, **Crofton . (1996)** a indiqué que l'exposition au triadimefon induit une diminution de recaptage de la dopamine par les fentes pré-synaptiques. De même, d'autres chercheurs ont montré que l'action du triadimefon induit une baisse de la synthèse, la libération de la dopamine ou l'inhibition des récepteurs D1 et D2 de la dopamine et une diminution de 30% de la concentration de DA dans le striatum chez les rats traités. (**Filipov et Lawrence, 2001; Gagnaire et Micillino ,2006**).

Par ailleurs, le test de la mémoire spatiale Le labyrinthe de Barnes a rapporté que le nombre d'erreurs et le temps écoulé avant de trouver la cible des rats exposé au 5 PTT est significativement élevé par rapport aux rats témoins.

Le test de la mémoire de travail Le labyrinthe en Y qui a révélé que le pourcentage d'alternance spontanée est significativement inférieur chez les rats exposés au 5 PTT par rapport aux rats témoins. Ces résultats suggèrent que le 5 PTT a provoqué l'altération de l'apprentissage et la mémoire de référence spatiale.

Ma et al. (2007) indiquant que l'exposition au tebuconazol a causé des déficits neuro-comportementaux chez les rats. Ce déficit d'apprentissage est bien corrélé aux résultats neuropathologiques (perte de cellules pyramidales dans l'hippocampe) (**Moser et al., 2001**). De même, le résultat trouvé par **Lingappa et al. (2008)** selon lequel le déficit alternatif pour ces tests observés chez les rats exposés au triazole, serait dû à une augmentation de la sécrétion des médiateurs chimiques qui ont une incidence sur l'apprentissage et la mémoire, comme certaines cytokines (**Lathe, 2001**)

Ainsi que **Xi et al. (2012)** ont montré que le triadimefon inhibait l'apprentissage et la mémoire spatiale et diminue la concentration d'acide rétinoïque dans l'hippocampe.

Pour les tests de l'anxiété et la dépression dont on cite le test de double compartiment obscurité/lumière et le test de la nage forcée, Nous avons noté que les animaux exposés au 5PTT avaient une préférence pour les espaces noirs et fuyaient les espaces lumineux, Cela reflète l'instauration d'un état d'anxiété et de désespoir.

Ces résultats suggèrent que le 5PTT a considérablement réduit le pouvoir d'exploration des animaux reflétant un comportement anxieux (**Langen et al., 2005 ; Fairon , 2006**).

Le myclobutanil, qui est un dérivé de triazole, provoque une inhibition du récepteur 5HT impliqué au niveau central jouant un rôle dans le contrôle de l'anxiété et de la dépression, Sachant que le système sérotonergique a un rôle central dans la modulation de l'anxiété (**Voigt et al., 1999**), une augmentation des taux de 5-HT dans l'hippocampe est l'origine d'un effet anxiogène (**Reeves et al., 1999**).

Afin de confirmer ces données expérimentales nous avons procédé à un dosage du cortisol et le glucose sanguin. Sachant bien que la cortisol et la glycémie compte parmi les principales hormones de stress est à l'origine d'une pléthore de troubles physiques.

Les résultats de l'exposition subchronique et aigue obtenus montrent clairement que l'administration de 5-phenyl-1, 2,4-triazole-3-thione chez les jeunes rats induit une augmentation significative des teneurs sériques en glucose accompagnée d'une hypercortisonémie par rapport aux rats témoins.

Cette augmentation de la concentration sanguine du glucose et la cortisone est probablement le résultat de la glycogénolyse hépatique et hypersécrétion des hormones de stress (**Gillies *et al.*, 2008 ; Helden *et al.*, 2009**)

Il a été clairement prouvé qu'une glycémie élevée est la conséquence d'un déficit de sécrétion d'insuline ou d'un mauvais stockage du glucose par le foie. Ces résultats sont en accord avec ceux de (**Gillies, 2008 ; Vander *et al.*, 2009**) qui montrent que le triazole entraîne un dysfonctionnement du métabolisme énergétique par l'altération de glycogénolyse hépatique qui a pour conséquent l'augmentation de la glycémie. (**Nesnow *et al.*, 2011**).

Les travaux de **Vander Heiden *et al.* (2009)**, confirment que l'exposition au Propiconazole inhibe le NADH nécessaire pour la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie du foie qui se traduit par une réduction de la formation d'ATP nécessaire pour la synthèse de glycogène.

En effet les travaux réalisés par **Nesnow *et al.* (2011)**, révèlent que l'exposition au propiconazole engendre un effet stressant qui se traduit par une hyperglycémie sous l'action des hormones de stress à savoir, la cortisone activant ainsi les enzymes du métabolisme glucidique.

En plus, il a été constaté dans des travaux antérieurs que l'exposition au propiconazole diminue significativement l'expression de l'insuline comme premier facteur de croissance (IGF-1) (**Lu *et al.*, 2003; Radu *et al.*, 2003; Puc *et al.*, 2005**) ce qui confirme nos résultats.

En outre, une augmentation significative en glucose sanguin est probablement due aux effets du stress oxydant induit par le 5 PTT. En effet, le stress oxydatif est responsable d'une multitude de dysfonctions métaboliques comme la résistance à l'insuline (**Santure *et al.*, 2002**). L'état de résistance à l'insuline est caractérisé par la diminution de la réponse à l'insuline dans les cellules insulinosensibles. L'insulinorésistance entraîne une élévation des taux circulants d'insuline et une intolérance au glucose et une diminution de la stimulation du captage du glucose par l'insuline. Ce qui inhibe la pénétration du glucose dans les tissus (**Baudler *et al.*, 2003**).

De plus, ont été rapporté dans des études métaboliques que les paramètres biochimiques varient lors d'un stress, dans les tests toxicologiques, ces variations sont liées à la perturbation de l'axe hypothalamo hypophyso-surrénalien traduisant une hyperglycémie liée à l'activation du système orthosympathique (**Manser, 1992**). Des résultats similaires ont été

enregistrés indiquant que l'exposition au propiconazole engendre un effet stressant qui se traduit par une hyperglycémie sous l'action des hormones de stress à savoir, la corticotropin-Releasing-Factor (CRF), la corticotropine (ACTH) et la cortisone au niveau de l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénale respectivement, activant ainsi les enzymes du métabolisme glucidique (Rodriguez *et al.*, 1996 ; Nesnow *et al.*, 2011).

4. Activité des enzymes du statut oxydant au niveau cérébral, hépatique, rénal et érythrocytaire

Récemment, l'utilisation répandue des triazoles est devenue un intérêt environnemental essentiel, cependant l'exposition répétée à de faible dose de triazole peut avoir des effets néfastes sur l'homme et la santé des animaux. (Narra *et al.*, 2017).

De nombreuses études ont montré que les pesticides sont des inducteurs de stress oxydatif, pendant le métabolisme des xénobiotiques, le cycle catalytique P450 produit gratuitement des radicaux libres (Yang *et al.*, 2018). altérant ainsi l'homéostasie du statut oxydant et la réduction du système de défense au sein la cellule (Hattab *et al.*, 2015; Hamdi *et al.*, 2019).

4.1. La glutathion peroxydase (GPx) :

La GPx est une enzyme clé qui règle le niveau des ROS (Khan *et al.*, 2015). la GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés (Zhuang *et al.*, 2015)

4.2. La catalase :

La catalase est un antioxydant enzymatique, qui décompose le radical hydroxyle, il est largement distribué dans tous les tissus avec une activité importante dans les globules rouges et le foie (RAJ *et al.*, 2014). La réduction de l'activité enzymatique de CAT est la conséquence de divers effets délétères dus à l'accumulation des radicaux superoxydes et hydroxyles (Ramachandran *et Saravanan*, 2013).

4.3. Activités non enzymatique de système antioxydant : Le glutathion réduit :

Le GSH est l'un des composés essentiels de régulation de la fonction cellulaire. (Narra *et al.*, 2017), comme il est un système antioxydant important de la plupart des cellules aérobies (Hamdi *et al.*, 2019) et joue un rôle clé en tant que cofacteur avec une variété d'enzymes, dont la peroxydase GSH. (Satpute *et al.*, 2017).

De plus, GSH participe également à la détoxification des xénobiotiques en tant que substrat de l'enzyme glutathionS-transférase. La synthèse et la dégradation du GSH se produisent en

continu tout au long du cycle du glutamyl qui a été bien caractérisée chez les animaux (**Raj et al., 2014**)

4.5. Activité des enzymes du statut oxydant au niveau érythrocytaire et cérébral

Etant donné que le cerveau et les érythrocytes sont fortement susceptibles aux radicaux libres qui sont dus à leurs activités métaboliques accrue et leurs teneurs élevées en acides gras polyinsaturés (**Zuang et al., 2015**). Nous avons entrepris une série d'expériences portant sur l'analyse du statut oxydant, ainsi que la résistance des cellules à l'attaque des radicaux libre après une exposition aigue au 5 PTT au niveau cérébral et érythrocytaire.

Nos résultats ont montré que le traitement aigue au 5PTT a induit des dommages oxydants important qui se manifestent par une diminution de la concentration du glutathion peroxydase et de la catalase chez les rats traités par le 5 PTT par rapport aux rats témoins.

La diminution des taux de GPx, la CAT et le glutathion réduit a clairement confirmé son utilisation accrue par les cellules du cerveau et des érythrocytes qui pourrait être le résultat de la réduction de la synthèse ou le renforcement de la dégradation de GST par l'augmentation de stress (**Jia et al., 2009 ; Saad et al., 2017**).

En effet, **Rai et Sharma. (2007) et Rai et al. (2009)** ont signalé que le carbofuran (un insecticide carbamate) a causé la génération des ERO dans le cerveau et les érythrocytes.

Par ailleurs la diminution de la teneur en GSH cérébral après une exposition au 5 PTT sont conformes aux études **Satpute et al. (2017)** indiquant que le début du stress oxydatif est un événement important dans l'exécution des dommages biochimiques et fonctionnels induits par les pesticides dans le cerveau (**Fouzia D et al., 2013**)

Activité des enzymes du statut oxydant au niveau hépatique et rénal

Dans une autre série d'expérimentations, nous avons exploré le statut antioxydant dans le foie et les reins après une exposition des rats au 5 PTT, dont nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique de la catalase et GPx au niveau hépatique.

La diminution observée de l'activité de la CAT et de la GPx pourrait probablement être due à l'utilisation de ces enzymes dans la conversion du H_2O_2 en H_2O (**Garg et al., 2008 ; 2009**). Ces observations sont en accord avec ceux de plusieurs études qui ont prouvé l'effet inhibiteur du méthomyl (un insecticide de la famille des carbamates) sur l'activité enzymatique de la CAT et et de la GPx au niveau hépatique chez les animaux d'expérience

(El-Khawaga, 2005 ; Garg et al., 2008 ; 2009a ; Manawadi *et* Kaliwal, 2010 ; El-Demerdash *et al.*, 2012).

Par ailleurs **yang *et al.* (2018)** ont montré qu'une exposition subchronique au Tébuconazole a induit un stress oxydatif et a causé de multiples dommages dans les fonctions enzymatiques au niveau hépatique.

Cependant, Aucun changement n'a été enregistré au niveau hépatique et rénal du taux glutathion réduit après une administration de 5 PTT chez les rats. .

Cette stabilité des taux de GSH peut être interprétée par la disponibilité du groupement thiol présent dans la molécule de 5PTT qui a compensé les pertes du glutathion endogène, étant donné que le groupement thiol représente le groupement majoritaire au niveau intracellulaire du glutathion réduit (**Khan *et al.* , 2005 ; Saad *et al.* , 2017**) utilisé pour neutraliser les radicaux libres par leur propriété comme donneur d'électrons.

Ces résultats ne s'accordent pas avec d'autres travaux qui ont démontré que le méthomyl (un insecticide carbamate) provoque une diminution significative des niveaux du GSH dans les organes, foie, reins des rats. (**Manawadi *et* Kaliwal, 2012 ; EL-Khawaga, 2012 ; EL-Demerdash *et al.*, 2013 ; Hamdi *et al.* , 2019**).

5. Effet de 5 PTT sur l'architecture histologique

Afin de confirmer si les changements métaboliques rapportés dans les études biochimiques sont cohérentes avec l'étude de l'architecture tissulaire, nous avons effectué une analyse histologique du cerveau, foie et rein après une exposition aiguë et subchronique au 5 PTT chez des jeunes rats.

Les données des résultats de l'étude subchronique enregistrés au niveau du cortex cérébral révèlent un arrangement palissade périvasculaire d'oligodendrocytes, avec la présence des cellules hyper chromatiques.

Ce résultat est en accord avec celle de **Faro (2010)** qui a montré que l'exposition au triazole provoque généralement des lésions neuropathologiques dans le cerveau du rat. En confirmation, les études de neurotoxicité subchroniques avec le prothioconazole à une dose de (43,3 mg / kg / j) ont montré une augmentation induite de la lésion nerveuse périphérique. (**Galal *et al.* 2014**).

De plus, on a noté des changements histologiques du foie suite à exposition aiguë et subchronique au 5PTT qui s'est caractérisés par une congestion de la veine centrolobulaire

et une congestion sinusöide ainsi qu'un phénomène de nécrose cellulaire accompagnée d'une dystrophie hépatocytaire a noyau hyperplasique, l'installation de changement architectural du foie pourrait résulter de la génération de ROS qui interagit avec les molécules cibles biologiques, provoquant ainsi des lésions hépatiques induites par le 5 PTT. Cela est en accord avec d'autres travaux, qui ont montré des changements histopathologiques des hépatocytes après exposition au cyproconazole avec une augmentation de l'incidence et la gravité de la nécrose de cellules chez les rats (**Richard et al. 2007 ; Heister et al. ,2012**).

Les travaux de **Saad et al. (2017)** ont montré que le traitement au tebuconazol induit divers changements histologiques dans le foie, y compris une infiltration leucocytaire et une vacuolisation cytoplasmique, pendant le traitement.

En fait, des études in vivo de **Raj et al. (2014)** ont indiqué que l'exposition à long terme du triadimefon (l'un des triazoles) aux souris est en mesure d'augmenter l'incidence des adénomes hépatocellulaires chez les souris CF1 / W74.

De plus, **Heise et al. (2018)** ont révélé les effets hépatotoxiques révélant une congestion de la veine centrolobulaire et hypertrophie du foie suite à une exposition subaiguë a un mélange de deux triazoles (cyproconazole et époxiconazole) et d'un imidazole (prochloraze) chez le rat.

Cependant les résultats histologiques obtenus suite à une exposition des rats pendant 30 jours au 10mg/Kg de 5 PTT ne présentent aucune anomalie histologique particulière comme signe inflammatoire, dystrophie ou atypie nucléaire en comparaison avec les rats témoins ce qui signifie que le rein n'est pas l'organe cible contrairement aux tissus hépatique et cérébral. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus par (**Zarn et al., 2004**) qui ont montré que l'exposition à court terme (28 jours) au triadiménol, n'a provoqué aucun changement fonctionnel, pathologie clinique ou histopathologie du rein.

En effet les recherches de **Hamdi et al. (2019)** ont révélé que l'exposition faible dose chez des rats a l'époxiconazole (EPX) qui est un fongicide triazole couramment utilisé en agriculture chez des rats provoque des dommages tissulaires important au niveau rénal.

Par ailleurs, **Bonnard et al. (2010)** ont montré que le rein été défini comme organe cible chez le rat suite à une exposition subaiguë (14 jours) par gavage du prothioconazol. Les effets observés sont ; une augmentation du poids de l'organe accompagnée de modification histologiques, en plus d'une néphropathie chronique progressif.

De plus, l'exposition à court terme des rats au tétraconazole provoque une toxicité rénale qui se manifeste également par une hypertrophie des reins et des tubules corticaux ainsi que la présence de corps apoptotiques (**PRD, 2012**).

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion

Les travaux ultérieurs réalisés chez des rongeurs ont permis de montrer que les dérivés du triazole tels que : triadimifon, prothioconazole, tebuconazole, se sont révélés toxiques et touchent tous les compartiments de l'organisme surtout le foie, les reins et le cerveau.

Cette recherche est réalisée dans l'optique d'évaluer les effets d'une exposition aiguë et subchronique au 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione (5 PTT) chez des jeunes rats Wistar, suivant une approche biochimique, neurocomportementale et histologique.

Les résultats obtenus après une exposition subchronique au 5 PTT à une dose de 10mg/kg pendant 30 jours, a entraîné une diminution significative de poids corporel et cérébral qui se traduit par un effet anorexigène qui est dû à son action sur les centres nerveux responsables de la régulation de la satiété et de la faim, accompagné d'une augmentation du poids du foie interprété par une hypertrophie hépatique.

En effet, l'étude neurocomportementale entreprise chez les rats dévoile clairement que l'exposition subchronique et aiguë au 5 PTT provoque une hypoactivité locomotrice, une réduction du comportement d'exploration du milieu, une perturbation de processus d'apprentissage et de mémorisation spatiale avec l'instauration d'un état d'anxiété et de dépression.

Afin de confirmer l'état de stress chez les rats traités par le 5PTT, nous avons procédé au dosage du glucose sanguin et de la cortisone, qui ont indiqué une hyperglycémie accompagnée d'une hypercortisonémie qui pourrait être dues à l'action des hormones de stress à savoir la cortisone qui active ainsi les enzymes du métabolisme glucidique.

À propos de l'étude des paramètres hématologiques, l'exposition subchronique au 5 PTT a provoqué un état d'anémie et une réaction inflammatoire caractérisés par une diminution du nombre de globules rouges et d'hémoglobines et une augmentation des taux des leucocytes.

Toutefois, les analyses biochimiques des biomarqueurs sanguins relatifs au fonctionnement hépatique et rénal ont révélé une augmentation du taux des triglycérides, du cholestérol et d'activité des transaminases (TGO et TGP), tandis qu'aucune augmentation significative n'a été enregistrée pour les biomarqueurs de la fonction rénale (urée et créatinine) chez les sujets traités au 5-PTT.

Afin d'apprécier la fonctionnalité des enzymes antioxydantes au niveau érythrocytaire, cérébral, hépatique et rénal, une étude du statut oxydant est réalisée, dont on a trouvé que le 5 PTT provoque la production des EROs et perturbe la balance oxydative par régression l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px) et de l'activité de la catalase au niveau

érythrocytaire cérébral et hépatique, qui pourrait probablement être due à l'utilisation accrue de ces enzymes dans la conversion du H_2O_2 en H_2O .

En effet, l'étude des composés antioxydants non enzymatique tel que le glutathion réduit (GSH) a montré que le 5 PTT diminue le taux de GSH au niveau érythrocytaire et cérébral, cependant aucun changement n'est enregistré au niveau hépatique et rénal, cette stabilité des taux de GSH peut être interprétée par la disponibilité du groupement thiol présent dans la molécule de 5PTT qui a compensé les pertes du glutathion endogène.

L'étude histologique viens de confirmer si les changements métaboliques rapportés dans les études biochimiques, neurocomportementales et du stress oxydant sont cohérentes avec l'étude de l'architecture tissulaire, l'analyse histologique du cerveau, foie et reins a clairement révélé que le 5PTT provoque des lésions et des altérations de l'architecture tissulaire hépatique et cérébral, Ceci témoigne l'effet cytotoxique de 5 PTT et ces métabolites exercés sur ces deux organes qui sont les plus susceptibles d'être endommagés.

En conclusion, Le 5-PTT est définit comme une substance toxique, qui peut provoquer des effets délétères pour la santé humaine, surtout au niveau cérébral et hépatique.

Les résultats de notre travail ouvrent d'autres nouvelles voies de recherche dont il serait judicieux de procéder à des expérimentations ultérieures et complémentaires :

- Etudier des mécanismes cellulaire et moléculaire (étude de génotoxicité) autant sur la compréhension des mécanismes d'entrée de triazole 5 PTT et de son mode d'action.
- Effectuer des analyses immuno-histochimique au niveau cérébral et hépatique.
- Trouver une thérapie naturelle contre l'effet toxique des 5 PTT en utilisant des plantes médicinales.
- Tester les effets de 5 PTT sur le système reproductif femelle et males (ovaires et testicules) et savoir l'action de ces molécules sur les hormones introduites dans le cycle menstruel féminin et la spermatogenèse, afin de déterminer sa répercussion sur la stérilité féminine et masculine.

A

Abdul Hameed.A , Hassan.F (2014) Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity of Some 4-Amino-5-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol Derivatives,"Int. J. App. Sci. Tech., 4 (2), 202-211.

Agrawal R, Pancholi S. (2011) Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of a series of 1, 2, 4-triazoles. *Der Pharma Chemica*;3 (6):32-40.

Almasirad A, Tabatabai SA, Faizi M, Kebriaeezadeh A, Mehrabi N, Dalvandi A. (2004) Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 2, 4-triazoles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.*; 14(24):6057-9.

Amsden, J. R., & Gubbins, P. O. (2017). Pharmacogenomics of triazole antifungal agents: implications for safety, tolerability and efficacy. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 13(11), 1135-1146.

Andes D. Optimizing antifungal choice and administration. *Curr MedRes Opin*2013 ; 29 : 13-8.

Aneja, B., Azam, M., Alam, S., Perwez, A., Maguire, R., Yadava, U., ... & Abid, M. (2018). Natural product-based 1, 2, 3-triazole/sulfonate analogues as potential chemotherapeutic agents for bacterial infections. *ACS omega*, 3(6), 6912-6930.

Asif M. (2015) Antiviral and antiparasitic activities of various 10/substituted triazole derivatives: A mini. *Chemistry International*.1(2):71-80.

Asmus KD, Bonifacic M (2000) Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier; p. 3–53.

B

Barouki.R (2006), Stress oxydant et vieillissement, *MEDECINE/SCIENCES* ; 22 : 266-72.

Barouki.R, Morel.Y (2001) [Oxidative stress and gene expression]. *J Soc Biol*;195:377–82.

Barouki.R, Morel.Y (2001), Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *BiochemPharmacol*; 61 : 511-6.

Belskaya N, Subbotina J, Lesogorova S Synthesis of 2H-1,2,3-Triazoles *Top HeterocyclChem* (2015) 40: 51–116 DOI: 10.1007/7081_2014_125.

Bentiss.F (2006), hétérocycles pentaatomique : synthèses organiques, études des propriétés inhibitrices de la corrosion et des propriétés complexantes : 39.

Bonnard N, Jargot D, FalcyM, Fastier A, OudarS, Rambourg MO. (2010) prothioconazole ,INRS ; Edition 2010 :1-8.

C

Carrillo-Muñoz, A. J., G. Giusiano, P. A. Ezkurra, and G. Quindós (2006), Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.* 19:130-139.

Catherine Regnault – Roger (2014), Produits de protection des plantes, Lavoisier, paris ISBN : 978-2-7430-1539-8.

CCTV : COMITE DE COORDINATION DE TOXICOVIGILANCE (Novembre 2012). Cas d'exposition à l'aminotriazole seul ou associé à un thiocyanate (ammonium, sodium) *Chemica Sinica*, 2010, 1 : 36-47.

Conrad CD, Grote KA, Hobbs RJ, Ferayorni A. (2003) Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. *Neurobiology of learning and memory.* 79(1):32-40.

Crofton K, Boncek V, MacPhail R. (1989) Evidence for monoaminergic involvement in triadimefon-induced hyperactivity. *Psychopharmacology.* 97(3):326-30

Crofton K. (1996) A structure-activity relationship for the neurotoxicity of triazole fungicides. *Toxicology letters;* 84(3):155-9.

Crouse, L. C., Lent, E. M., & Leach, G. J. (2015). Oral toxicity of 3-nitro-1, 2, 4-triazol-5-one in rats. *International journal of toxicology*, 34(1), 55-66.

D

Dauge V, Rossignol P, Roques BP. (1988) Comparison of the behavioural effects induced by administration in rat nucleus accumbens or nucleus caudatus of selective μ and δ opioid peptides or ketorphan an inhibitor of enkephalin-degrading-enzymes. *Psychopharmacology;*96(3):343-52.

Dehaen, W., & Bakulev, V. A. (Eds.). (2015). *Chemistry of 1, 2, 3-triazoles.* Springer International Publishing.

Denis.B (2010), association amicale d'enseignement post universitaire de la region de montmorency: Les mycoses ou infections fongiques, 12p.

Desai NHP, Bairwa R, Kakwani M, Tawari N, Ray MK, Rajan MG.(2013) Novel 4H-1,2,4-triazol-3-yl cycloalkanols as potent antitubercular agents. *Med Chem Res;*22:401:8.

Dheer, D., Singh, V., & Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1, 2, 3-triazoles: Current developments. *Bioorganic chemistry*, 71, 30-54.

Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee E-S, Block ML, et al. (2008) Retinoic acid attenuates β -amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *The Journal of Neuroscience.* 28(45):11622-34.

E

EFSA, 2014. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole. *EFSA Journal* 2014 ;12(1) :3485.

El-Sayed, W. A., Khalaf, H. S., Mohamed, S. F., Hussien, H. A., Kutkat, O. M., & Amr, A. E. (2017). Synthesis and antiviral activity of 1, 2, 3-triazole glycosides based substituted pyridine via click cycloaddition. *Russian Journal of General Chemistry*, 87(10), 2444-2453.

Ennaji. N(2011), dérivés de 2(1H)-pyrimidinones et d'isatogènes : synthèse, application de la chimie clic et activités biologiques : 14.

F

Fairon M. (2006) L'anxiété chez les animaux de compagnie, approches conceptuelle, clinique et thérapeutique: Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC); 2006.

Faro LRF, Alfonso M, Maués LA, Durán R. (2012) Role of ionotropic glutamatergic receptors and nitric oxide in the effects of flutriafol, a triazole fungicide, on the in vivo striatal dopamine release. *The Journal of toxicological sciences*;37(6):1135-42

Faro LRF. (2010) Neurotoxic Effects of Triazole Fungicides on Nigrostriatal Dopaminergic Neurotransmission. Edited by Odile Carisse. 405.

Fatmi W., Kechrid Z., Nazıroğlu, M., & Flores-Arce, M. (2013). Selenium supplementation modulates zinc levels and antioxidant values in blood and tissues of diabetic rats fed zinc-deficient diet. *Biological trace element research*, 152(2), 243-250.

Favier.A (2003), Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique, novembre-décembre, 108-115.

Filipov NM, Lawrence DA. Developmental toxicity of a triazole fungicide (2001) consideration of interorgan communication. *Toxicological Sciences*; 62(2):185-6.

G

Gagnaire F, Micillino J-C. (2006) Effects of triadimefon on extracellular dopamine, DOPAC, HVA and 5-HIAA in adult rat striatum. *Toxicology*. 217(2):91-104.

Galvao, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Faseb J* 28, 1317–1330, <https://doi.org/10.1096/fj.13->

Gautam N, Chourasia O. (2010) Synthesis, antimicrobial and insecticidal activity of some 4H-1, 2, 4 triazole derivatives. *Indian journal of chemistry Section B, Organic including medicinal*. 49(7):956.

Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA (2008) Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *Journal of Nuclear Medicine*.49(Suppl 2):24S-42S.

Goetz and Dix (2009) Mode of action for reproductive and hepatic toxicity inferred from a genomic study of triazole antifungals, *toxicological sciences*110(2), 449–462, doi:10.1093/toxsci/kfp098.

Granier.F (2003) Antifongiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotiques*, 5 : 39–48.

Gubbins, P. O. (2011). Triazole antifungal agents drug–drug interactions involving hepatic cytochrome P450. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 7(11), 1411-1429.

H

H. Yoshioka, H. Sakai, & S. Shibayama (2013), "Silver Halide Photographic Photosensitive Material and Production Method Thereof," United States.

H. Nohl (1994), Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration, *Ann Biol Clin*; 52: 199-204.

Haibaoui, S., Dadda, N., & Rahmouni, M. (2017). *Synthèses et caractérisations des hétérocycles 1, 3, 4-oxadiazole et 1, 2, 4-triazole à partir de l'acide cinnamique* (Doctoral dissertation, Université Ahmed Draia-ADRAR).

Haliwell B (1989) Gutteridge JMC. *Biology and Medicine*. Oxford: Free Radicals in Clanton Prep; [543p].

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989), *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford : Oxford University Press.

Hamdi, H., Othmène, Y. B., Ammar, O., Klifi, A., Hallara, E., Ghali, F. B., ... & Abid-Essefi, S. (2019). Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(17), 17535-17547.

Hamoir J., Goret M., Mignon B., Gustin P (2001) Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann. MédVét*; 145 :226- 23.

Hanif.M, Saleem.M, Hussain.MT, Rama.HN, Zaib.S, Aslam.MAM, Jones.PG, & Iqbal.J, (2012) "Synthesis, Urease Inhibition, Antioxidant and Antibacterial Studies of Some 4-Amino-5-aryl-3H-1,2,4-triazole-3- thiones and Their 3,6-Disubstituted 1,2,4-Triazolo[3,4- b]1,3,4-thiadiazole Derivatives," *J. Braz. Chem. Soc.*, 23 (5), 854-860.

Hartmann.A, Niess.AM (2000), Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier; p. 195–217

Heise, T., Schmidt, F., Knebel, C., Rieke, S., Haider, W., Geburek, I., ... & Marx-Stoelting, P. (2018). Hepatotoxic combination effects of three azole fungicides in a broad dose range. *Archives of toxicology*, 92(2), 859-872.

Heise, T., Schmidt, F., Knebel, C., Rieke, S., Haider, W., Pfeil, R., ... & Marx-Stoelting, P. (2015). Hepatotoxic effects of (tri) azole fungicides in a broad dose range. *Archives of toxicology*, 89(11), 2105-2117.

Hester, S., Moore, T., Padgett, W. T., Murphy, L., Wood, C. E., & Nesnow, S. (2012). The hepatocarcinogenic conazoles: cyproconazole, epoxiconazole, and propiconazole induce a common set of toxicological and transcriptional responses. *Toxicological Sciences*, 127(1), 54-65.

Hill D, Ikaidi M, Mazzio E, Soliman KF. (2000) .The neurochemical basis for the behavioral effects of triadimefon. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 914(1):336-53.

Hincky-Vitrat, V. (2011). Les antifongiques systémiques. *Clinique maladies infectieuses-CHU Grenoble.*

I

Ikaidi M, Akunne H, Soliman K. (1996) Behavioral and neurochemical effects of acute and repeated administration of triadimefon in the male rat. *Neurotoxicology*;18(3):771-80.

INERIS (2014) valeur guide environnementale 1,2,4-TRIAZOLE – n° CAS : 288-88-0 .Validation groupe d'experts : Juillet. Version 2 : 17/02/2016. DRC-15-136849-12771B.

INRS (03/2016) Aminotriazole Fiche toxicologique synthétique N°200 Base de données FICHES TOXICOLOGIQUES

Irfan, M., Alam, S., Manzoor, N., & Abid, M. (2017). Effect of quinoline based 1, 2, 3-triazole and its structural analogues on growth and virulence attributes of *Candida albicans*. *PloS one*, 12(4), e0175710.

J

J. Goudable, A. Favier (1997), Radicaux libres oxygénés et antioxydants, *Nutr Clin Métabol*, 11:115-20.

J. Haleng, J. Pincemail, J.O. De fraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle (2007), Le stress oxydant, *Rev Med Liege*, 62 : 10 : 628-638.

J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux, J.O. Defraigne (2002), Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 233–239.

J.A Bladin(1885), *Ber* ; 18,1554.

J.K. Shneine, Y.H. Alaraji (2014), Chemistry of 1, 2, 4-Triazole *International Journal of Science and Research (IJSR)*, ISSN (Online): 2319-7064.

Jagadeesh Prasad , Mithun Ashok , Prakash Karegoudar , Boja Poojary , B. ShivaramaHolla, Nalilu SuchetaKumari. (2009) Synthesis and antimicrobial activities of some new triazolothiadiazoles bearing 4-methylthiobenzyl moiety.

Jargot.D, Falcy.M, Robert.S avec la participation de l'ANSES: **Cavelier , Fastier , Rambourg**(2016), Myclobutanil, Fiche toxicologique n°302,inrs.

Jeyaratnam J. (1990) Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat Q*;43(3):139-44.

Ji. L.L. (2001) Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci*;928:236–47.

JM.Mc Cord, I.Fridovich (1988), Superoxide dismutase: the first twenty years, *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 363-9.

Joshi SD, Dixit SR, More UA, Rai S, Kulkarni VH (2014). Molecular modeling, synthesis, antibacterial and antitubercular activities of some novel pyrrolyl 1,2,4-triazole derivatives. *Indo Am J Pharm Res* ;4(05):2323-38.

K

Karakurt A, Aytemir MD, Stables JP, Ozalp M, Kaynak B, Ozbey S and Dalkara S, (2006) Synthesis of some oxime ether derivatives of 1-(2-Naphthyl)-2-(1,2,4-triazol-1-yl)ethanone and their anticonvulsant and antimicrobial activities, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 339, pp. 513-520.

Kashyap, A., & Silakari, O. (2018). Triazoles: Multidimensional 5-Membered Nucleus for Designing Multitargeting Agents. In *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules* (pp. 323-342). Elsevier.

Kaur, P., Kaur, R., & Goswami, M. (2018). A review on methods of synthesis of 1, 2, 4-triazole derivatives. *IRJP*, 9, 1-35.

Kaur, R., Ranjan Dwivedi, A., Kumar, B., & Kumar, V. (2016). Recent developments on 1, 2, 4-triazole nucleus in anticancer compounds: a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(4), 465-489.

Khan, S. M., Sobti, R. C., & Kataria, L. (2005). Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinica Chimica Acta*, 358(1-2), 131-138.

Koechlin-Ramonatxo.C (2006) Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires, *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 165–177 doi:10.1016/j.nupar.2006.10.178.

Kumar PV, Rao VR. (2008) Synthesis and antitubercular, antiviral and anticancer activity of 3-(3-mercaptoalkyl-7H-[1, 2, 4] triazolo [3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazin-6-yl) chromen-2-one and its derivatives. *Indian J Chem B.* 47:106-11.

Kumar R, Yar MS, Chaturvedi S, Srivastava.A (2013) Triazole as pharmaceutical potentials. *Int J pharm Tech res*;5(4):1844-69.

Kumudha D, Reddy R, Kalavathi T. (2014) synthesis and evaluation of some 1, 3, 4-thiadiazoles having substituted 1, 2, 4-triazole moiety for anticonvulsant and CNS depressant activity.

L

L. Labanauskas, E. Udrenaite, P. Gaidelis, A. Brukštus (2004) *IL FARMACO* 59 255–259.

Laguerre.M (2008), Bases moléculaires de la capacité antioxydante de composés phénoliques : étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire.

Lathe R. (2001) Hormones and the hippocampus. *Journal of Endocrinology*. 169(2):205-31.

Le directeur général, Avis de l'Anses, Saisine n° 2011-SA-0207, Maisons-Alfort Cedex

Ledeti I, Bercean V, Alexa A, Foica C, Futa LM, Dehelean C, et al. Preparation and Antibacterial Properties of Substituted 1,2,4-Triazoles. *J Chem* 2015;2015:879343.

Lingappa B, Girisha K, Kalluraya B, Rai S, Kumari N. (2008) Regioselective reaction: Novel Mannich bases derived from 3-(4, 6-disubstituted-2-thiomethyl) 3-amino-5-mercapto-1, 2, 4-triazoles and their antimicrobial properties. *Ind J Chem*. 47:1858-64.

London L, Flisher A, Wesseling C, Mergler D, Kromhout H. (2005) Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? *American journal of industrial medicine*. ;47(4):308-21.

Ly, X., Pan, L., Wang, J., Lu, L., Yan, W., Zhu, Y., ... & Zhuang, S. (2017). Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. *Environmental pollution*, 222, 504-512.

M

M. Gardès-Albert, D. Bonnefont-Rousselot, Z. Abedinzadeh, D. Jore (2003), Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique, novembre-décembre.

Morena M., M. Martin-Mateo, J.-P. Cristol et B. Canaud (2002), Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie Vol. 23 n° 5*, pp. 201-208.

M. Oukessou (2014) Synthèse, Dérivation et Evaluation de Pharmacophores Hybrides Alcynyl-TriazolylCarbinols N-glycosylés.

M.J.E. Roelofs, AR Temming, A.H. Piersma, M. van den Berg, M.B. Mvan Duursen (2014), Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro.

M. Khatak, P. K. Verma (2014), *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 3, Issue 3, 388-409, ISSN 2278 – 4357.

M.N. Mousa and S.A.N. Al-jadaan (2012), evaluation of the anti-inflammatory activity
M.T. Martin, R.J. Brennan, H. Wenyue, A. Eser, L. Christopher, R. Hongzu, R.W. Carmen R, C. J. Christopher, J. K. Robert, and D. J. Dix (2007), Toxicogenomic Study of Triazole Fungicides and Perfluoroalkyl Acids in Rat Livers Predicts Toxicity and Categorizes Chemicals Based on Mechanisms of Toxicity. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 97(2), 595–613, doi:10.1093/toxsci/kfm065.

Ma LY, Pang LP, Wang B, Zhang M, Hu B, Xue DQ, et al. Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-pyrimidine hybrids as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem* 2014;86:368-80.

Ma M, Chen Y, He J, Zeng T, Wang J. (2007) Effects of morphine and its withdrawal on Y-maze spatial recognition memory in mice. *Neuroscience*. 147(4):1059-65.

MA. Ghannoum, LB. Rice (1999) Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance, *Clin. Microbiol.Rev.*vol. 12 (pg. 501-517).

Maden M. (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(10):755-65.

Maumené.C (2008), Le mode d'action des triazoles, PERSPECTIVES AGRICOLES • N° 345 • MAI.

Mavrova AT, Wesselinova D, Tsenov JA, Lubenov LA. Synthesis and antiproliferative activity of some new thieno[2,3-d] pyrimidin-4(3H)-ones containing 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole moiety. *Eur J Med Chem* 2014;86:676-83.

Mazat JP, Ransac S(2010), Le complexe bc₁ de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell. La preuve par une approche stochastique ? *Med Sci (Paris)*; 26 : 1079-86.

Mc Cord J(1993) Human disease, Free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *ClinBiochem*; 26: 351-7.

Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F, Giavini E. (2006) Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reproductive Toxicology*. 22(2):186-95.

Miceli, M. H., & Kauffman, C. A. (2015). Isavuconazole: a new broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clinical Infectious Diseases*, 61(10), 1558-1565.

Migdal.C, Serres.M (2011), Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant, médecine/sciences, 27 : 405-12 DOI : 10.1051/medsci/2011274017.

Moser V, Barone S, Smialowicz R, Harris M, Davis B, Overstreet D. (2001) The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. *Toxicological Sciences*. 62(2):339-52.

Moser VC, Macphail RC. (1989) Neurobehavioral effects of triadimefon, a triazole fungicide, in male and female rats. *Neurotoxicology and teratology*.11(3):285-93.

N

N.Kinsky (1989) Antioxydants function of carotenoides, *Free Rad. Biol. Med.*, 7, p. 617.

Nadeem S, Waquar A. Triazole incorporatedthiazoles as a new class of anticonvulsants:Design, synthesis and in vivo screening. *Eur J Med Chem* 2010;45:1536-43.

Nesnow S, Padgett WT, Moore T. (2011) Propiconazole induces alterations in the hepatic metabolome of mice: relevance to propiconazole-induced hepatocarcinogenesis. *Toxicological Sciences*; 120(2):297-309

Nesnow S, Ward W, Moore T, Ren H, Hester SD. (2009) Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital by transcriptional analyses of mouse liver gene expression. *Toxicological Sciences*. 2009:kfp076.

Noshy, P. A., Elhady, M. A., Khalaf, A. A. A., Kamel, M. M., & Hassanen, E. I. (2018). Ameliorative effect of carvacrol against propiconazole-induced neurobehavioral toxicity in rats. *Neurotoxicology*, 67, 141-149.

O

Ouici, H. B., Benali, O., Harek, Y., Larabi, L., Hammouti, B., & Guendouzi, A. (2013). The effect of some triazole derivatives as inhibitors for the corrosion of mild steel in 5% hydrochloric acid. *Research on Chemical Intermediates*, 39(7), 3089-3103.

P

P. Guerby, F. Vidal, S. Garoby-Salom, C. Vayssiere, R. Salvayre, O. Paranta, A.Negre-Salvayre (2015) *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 43, 751–75.

P. Vandeputte(2008) mecanismes moleculaires de la resistance aux antifongiques chez candida glabrata.

Palaska, E., Şahin, G., Kelicen, P., Durlu, N. T., & Altinok, G. (2002). Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1, 3, 4-oxadiazoles, 1, 3, 4-thiadiazoles and 1, 2, 4-triazole-3-thiones. *Il Farmaco*, 57(2), 101-107.

Pellow S, Chopin P, File SE. (1985) Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? *Neuroscience letters* ;55(1):5-9.

Petricca, S., Flati, V., Celenza, G., Di Gregorio, J., Lizzi, A. R., Luzi, C., ... & Iorio, R. (2019). Tebuconazole and Econazole Act Synergistically in Mediating Mitochondrial Stress, Energy Imbalance, and Sequential Activation of Autophagy and Apoptosis in Mouse Sertoli TM4 Cells: Possible Role of AMPK/ULK1 Axis. *Toxicological Sciences*, 169(1), 209-223.

Poisson.C(2013), Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: (1977) a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*; 266(5604):730-2.

Prasad D.J, Ashok.M, P. Karegoudar, Poojary.B, Holla B.S, Kumari N.S, Eur. J (2009) *Med. Chem.*, 44, 551-557.

PRD. (2012) Projet de décision d'homologation, Tétraconazole. Santé Canada.

R

R. Reeves , M. Thiruchelvam, E.K. Richfield, D.A. Cory-Slechta (2003), Behavioral sensitization and long-term neurochemical alterations associated with the fungicide triadimefon, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 76 315 – 326, doi:10.1016/j.pbb.2003.08.003.

Raj, J., Rajvanshi, A. C., Dogra, T. D., & Raina, A. (2014). Effect of acute exposure of triazophos on oxidative stress and histopathological alterations in liver, kidney and brain of Wistar rats.

Rajkumar.A, Pancholi.S (2011) Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of a series of 1,2,4-triazoles *Der PharmaChemica*, 3 (6):32-40 ISSN 0975-413X.

Rao. DVN, Prasad. ARG, Spoorthy. YN, Rao. DR, & Ravindranath.LK (2014) Synthesis, Characterization and Pharmacological Studies of Sulphur Containing 1,2,4-Triazole Derivatives, *J. Taibah Uni. Med. Sci.*, 9 (4), 293-300

Ré D.B, Nafia.I, Nieoullon.A, Kerkerian Le Goff.L, Had-Aissouni.L (2005), Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 24 502–509, doi:10.1016/j.annfar.2005.03.004.

Reddy KR,Mamatha R, SurendraBabu MS, Shiva Kumar K, Jayaveera KN,Narayanaswamy G. Synthesis and antimicrobial activities of some triazole, thiadiazole, and oxadiazole substituted coumarins. *J Het Chem*2014;51:132-7.

Reeves R, Thiruchelvam M, Cory-Slechta D. (2004) Development of behavioral sensitization to the cocaine-like fungicide triadimefon is prevented by AMPA, NMDA, DA D1 but not DA D2 receptor antagonists. *Toxicological Sciences*;79(1):123-36.

Reeves R, Thiruchelvam M, Richfield EK, Cory-Slechta DA. (2003) Behavioral sensitization and long-term neurochemical alterations associated with the fungicide triadimefon. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 76(2):315-26.

Rosenfeld, C. S., & Ferguson, S. A. (2014). Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (84), e51194.

S. Jess, S.Kildea, A.Moody, G.Rennick, AK. Murchie,& LR. Cooke (2014) “European Union Policy on Pesticides: Implications for Agriculture in Ireland, ” *Pest. Mang. Sci.*, 70 (11), 1646-1654.

S

S. Scodavolpe, S. Quaranta, B.Lacarelle, C.Solas (2014) Antifongiques triazolés : intérêt et modalités du suivi thérapeutique pharmacologique et perspectives d'optimisation des traitements.*AnnBiol Clin*; 72(4) : 391-404 doi:10.1684/abc.2014.0968.

S.Kabouche(2010),Etude de la relation du thé vert maladies cardiovasculaires et stress oxydant.

Saad, H. B., Feki, A., Boudawara, O., Hakim, A., & Amara, I. B. (2017). Effects of selenium on tebuconazole-induced hepatotoxicity in adult rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 105-109.

Sancak K. Y. Ünver, D. Ünlüer, E. Düğdü, G. Kőr, F. Çelic, & E. Birinci, "Synthesis, Characterization, and Antioxidant Activities of New Tri-Substituted Triazoles," *Turk. J. Chem.*, 36, 457-466, 2012.

Santana M, Rodrigues K, Duran R, Alfonso M, Vidal L, Campos F, et al. (2009) Evaluation of the effects and mechanisms of action of flutriafol, a triazole fungicide, on striatal dopamine release by using in vivo microdialysis in freely moving rats. *Ecotoxicology and environmental safety* ;72(5):1565-71.

Shalini, Kumari, Pramod Kumar Sharma, and Nitin Kumar. "Imidazole and its biological activities: A review." *Der Chemica Sinica* 1.3 (2010): 36-47

Shiradkar M, Pandit U, Akula KC, Maheta A, Kumar GVS. (2006) Microwave assisted synthesis and antimicrobial screening of fused triazoles. *Arkivoc*.14:141-54.

SK. Powers, AM. Locke, HA. Demirel(2001), Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc* ;33: 386–92.

Stefanie C. Holm & Bernd F. Straub (2011) Synthesis of *N*-Substituted 1,2,4-Triazoles. A Review, *Organic Preparations and Procedures International*, 43:4,

Suresh Kumar GV, Rajendra Prasad Y. Chandrashekar SM. Synthesis and pharmacological evaluation of novel 4-isopropylthiazole-4-phenyl-1,2,4-triazole derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. *Med Chem Res* 2013;22:938-48.

T

Thiago Belarmino de Souza, et al. "Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1, 2, 3-triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents." *Chemical Biology & Drug Design* 95.1 (2020): 124-129.

Thakur, A., Gupta, P. S., Shukla, P. K., Verma, A., & Pathak, P. (2016). 1, 2, 4-Triazole Scaffolds: Recent Advances and Pharmacological Applications. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev*, 4(2), 277.

Torres SJ, Nowson CA. (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*. 23(11):887-94.

Tully, D. B., Bao, W., Goetz, A. K., Blystone, C. R., Ren, H., Schmid, J. E., ... & Wolf, D. C. (2006). Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicology and applied pharmacology*, 215(3), 260-273.

Tumosienė, I., & Beresnevičius, Z. J. (2009). Synthesis of azoles from 3, 3'-[(4-alkoxyphenyl) imino] bis (propanoic acid hydrazides). *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 140(12), 1523.**IB.**

O

Obot, AS. Johnson (2012) “Ab initio, DFT and TDDFT Electronic Absorption Spectra Investigations on 3,5-Diamino-1,2,4-triazole, ”I.B. Obot et al., *Elixir Comp. Chem.*, 43, 6658-6661.

V

Vandana S., Rakesh B.: Triazoles in antifungal therapy : a review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical*, 2011, 2 : 417-427

Verheijen, M., Lienhard, Matthias, Schrooders, Yannick, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific reports*, 2019, vol. 9, no 1, p. 4641.

Voigt J-P, Rex A, Sohr R, Fink H. (1999) Hippocampal 5-HT and NE release in the transgenic rat TGR (mREN2) 27 related to behavior on the elevated plus maze. *European neuropsychopharmacology*. 9(4):279-85.

W

W. Macnee, I. Rahman (1999), Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*;160:S58–65.

W.L. Chu, Y.W. Lim , A.K. Radhakrishnan , P.E. Lim (2010), Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC complementary and Alternative Medicine*.vol. 10(53) : 2-8.**DOI:** 10.1186/1472-6882-10-53.

Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism (2009) *Trends in Endocrinology & Metabolism*.20(6):273-9

Walker QD, Lewis MH, Crofton KM, Mailman RB. (1990) Triadimefon, a triazole fungicide, induces stereotyped behavior and alters monoamine metabolism in rats. *Toxicology and applied pharmacology*.102(3):474-85.

Wbiss Consulting Co, Ltd (2016) China triazole Fungicides Market Report. edition <http://www.reportlinker.com/p03762688-summary/China-Triazole-Fungicides-Market-Report-Edition.html>.

WH. Koppenol (2001) The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep*; 6:229–34.

Wujec ,M, Pitucha, M., Dobosz,M , Kosikowska, U, & Malm, A. (2004). Synthesis and potential antimycotic activity of 4–substituted–3–(thiophene–2–yl–methyl)–1, 2, 4–triazoline–5–thiones. *Acta Pharm*, 54(1), 251.

X

X.Lv, L.Pan, J.Wang, L.Lu, W.Yan, Y.Zhu, Y. Xu, M.Guo, S.Zhuang (2016), Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity, *Environmental Pollution* 1-9.

Xi J, Yang Z, Zeng C, Hu X, Wang J. (2012) Suppressive effect of triadimefon, a triazole fungicide, on spatial learning and reference memory in rats. *Behavioural pharmacology*. 23(8):727-34.

Y

Yang, J. D., Liu, S. H., Liao, M. H., Chen, R. M., Liu, P. Y., & Ueng, T. H. (2018). Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental toxicology*, 33(8), 899-907.

Yassine N. (2011) Lésions sélectives de deux populations de neurones affectées dans la maladie d'Alzheimer: Impact sur les performances cognitives et l'histopathologie des souris tg2576: Strasbourg.

YU S., CHAI X., HU H., et al. : Synthesis and antifungal evaluation of novel triazole derivatives as

Z

Z. Soualem-Mami · N. Brixi-Gormat · F.-Z. Djaziri · S. Hmimed · M. Belarbi (2015) Effet du son de seigle chez le rat diabétique. DOI 10.1007/s10298-015-0933-3.

Zhuang, S. L., Bao, L. L., Wang, H. F., Zhang, M., Yang, C., Zhou, X. Y., ... & Naranmandura, H. (2015). The involvement of ER-stress and ROS generation in difenoconazole-induced hepatocellular toxicity. *Toxicology Research*, 4(5), 1195-1203.

**REGULAR ARTICLE**

5-Phenyl-1, 2, 4-Triazole- 3- Thiol subchronic exposure induce neuro-comportemental disorder in Wistar rats

Hassina Hadjadj^{*1}, Khaled Kahloula², Boumediene Meddah³, Miloud Slimani⁴

^{1,2,4}Laboratory Biotoxicologie, Pharmacognosy and biological recycling plant .Department of Biology, Faculty of Science, University Moulay Taher, Saida, Algeria

³Bioconversion Research Laboratory, Engineering Microbiology and Health Safety, Faculty of SNV, University of Mascara, Algeria

ARTICLE INFO*Article History:*

Received: 27 Feb 2019

Revised: 12 Mar 2019

Accepted: 26 Mar 2019

**Corresponding Author:*

Email: hassinahadjad09@yahoo.fr

Telephone: +213(0)551 533 809

Keywords: neurobehavioral, anxiety, depression, locomotor activity

ABSTRACT

Triazole and its derivatives possess a great importance in medicinal chemistry with different biological effects; antiviral, antifungal, antibacterial and analgesic. The purpose of the present work is to assess the effects of 5 phenyl 1,2,4 Traizole 3 thiol (5 PTT) through a neurobehavioral exploration in Wistar rats. 5 PTT exposed rats showed increased body weight and brain weight. The open field test revealed a significant decrease in the number of crossed squares. However, the results related to the forced swimming test present a significant rise in the immobility time compared to the vehicle group. Furthermore, the Y maze test show that exposure to 5 PTT is associated with impairment of spatial learning performance and memory deficit is explained by a significant increase of the percentage of spontaneous alternation in the exposed animals, the plus maze test revealed that 5 PTT administrations reduced significantly the open arms time. Histological brain analysis show an alteration of tissue architecture and perivascular palisade in treated rats compared to vehicle rats. Our study demonstrated that 5 PTT exposures can cause neurotoxic effects that disrupt spatial learning and memory performance and induce a depressive state which reflects an alteration of the neurodevelopment process.

1. Introduction

Previously, the synthesis of high nitrogen containing heterocyclic systems has been attracted to many pharmaceutical and agrochemical industries (Kumar et al., 2013). The triazole nucleus is one of the most importantly used heterocycles (Filipov and Lawrence, 2001). 1,2,4-triazoles are well known for their wide spectrum of biological activities (Kumudha et al., 2014) due to their powerful antifungal effects (Lingappa et al., 2008). The pharmacological mechanism of this component is related

to the inhibition of Cytochrome P450 enzymes involved in the formation of the fungal walls (Menegola et al., 2006), antimicrobial (Shiradkar et al., 2006; Kumar and Rao, 2008), there are another biological effects such as: antibacterial (Lingappa et al., 2008; Gautam and Chourasia., 2010), antiviral, anticonvulsant (Asif, 2015), antitumor (Kumar and Rao, 2008), insecticidal (Gautam and Chourasia., 2010). The widespread use of pesticides and specially in agronomic field is currently an important cause of human morbidity and mortality worldwide (Jeyaratnam, 1990), an increase of pes-

ticide poisoning cases is to be expected (London et al., 2005). A study have shown that triazole exposure causes dysfunction of energy metabolism by altering the liver glycogenolysis which lead to hyperglycemia (Gillies et al., 2008). Other studies have confirmed that exposure to propiconazole t of 1250 ppm (157.6 mg / kg) creates a stressful effect that results in hyperglycemia under the action of increased levels of inducible secreted hormones (Nesnow et al., 2011). Moreover, many biochemical disturbances induced by triazole affect the lipid metabolism which is reflected in the form of cholesterol and triglycerides concentrations changes (Wada et al., 2009). It is also suspected that hypocholesterolemia is may be due to a reduction in cholesterol synthesis or an increase in its elimination in rats exposed to triazole (Nesnow et al. 2009)

Further studies have shown that liver and kidney were identified as target organs in rats following exposure to petroleum derived azoles. The observed effects are; increased body weight accompanied by histological changes of the organs accompanied with inflammations (Bonnard et al., 2010) Furthermore, a set of studies published by EPA (2006) propose that triazoles present various deleterious effects on mammalian biological systems, especially on the nervous system. The EPA report showed evidenc that exposure to triazoles, in general, causes neurotoxicity, including neuropathological lesions in rat and mouse brain, impairment in the learning processes, memorization and motor coordination (Santana et al., 2009; Faro et al. 2012)

Other studies have shown that exposure to triazole fungicides and its compounds can induce hyperactivity and stereotypy (Walker et al., 1990), much like classic psychostimulants, presumably because, like cocaine, it binds to the dopamine (DA) transporter (DAT), thereby preventing the re-uptake of DA and increasing levels of DA in the synapse (Ikaidi et al., 1996). Acute systemic administration of Triadimefon, 100 to 200 mg/kg, leads to changes in DA metabolism in both the nigrostriatal (striatum) and mesolimbic (olfactory tubercles) DA pathways (Ikaidi et al., 1996; Reeves et al., 2004; Faro et al., 2012).

Triazoles nucleus have been incorporated into a wide variety of therapeutically interesting drug. They are used as optical brightening agents, as antioxidants, as corrosion inhibitors. However, in spite of their widespread use, toxicity evaluations have

been performed only within regulatory submission requirements for many of the triazole fungicides. Comprehensive data assessing their biological effects has been very limited, and in the case of certain triazole fungicides, almost completely lacking. Moreover, data addressing possible adverse effects of triazole fungicide exposure at the histological and cerebral level. The study in this work is based on exploring the neurobehavioral (depression, locomotor activity, spatial learning and memory) neurotoxicity of 5 PTT in young Wistar rats during sub chronic exposure.

2. Materials and Methods

5phenyl 1, 2, 4 Traizole 3 thiol (5 PTT) synthesis: 5 phenyl 1, 2, 4 Traizole 3 thiol was synthesized in the laboratory of Saida University by hydrazide intermediate benzoic acid (Almasirad et al., 2004). Benzoic acid undergoes esterification with absolute methanol in the presence of a catalytic amount of concentrated H₂SO₄ acid. The obtained methyl benzoate (1) is then treated with hydrazine hydrate in absolute ethanol as a solvent which results in the formation of the corresponding benzohydrazide (2) (Almasirad et al., 2004).

Acyl thiosemicarbazide (3) is prepared by nucleophilic addition of the benzohydrazide (2) by potassium thiocyanate in hydrochloric acid medium which results in a good yield of the acylthiosemicarbazides. The intramolecular cyclization of this intermediate acyl thiosemicarbazide (3) in a sodium hydroxide NaOH solution (4%) at reflux leads to the formation of 5-phenyl 1, 2,4-triazoles 3-thiones (Bonnard et al., 2010; Agrawal and Pancholi, 2011). (Fig. 1).

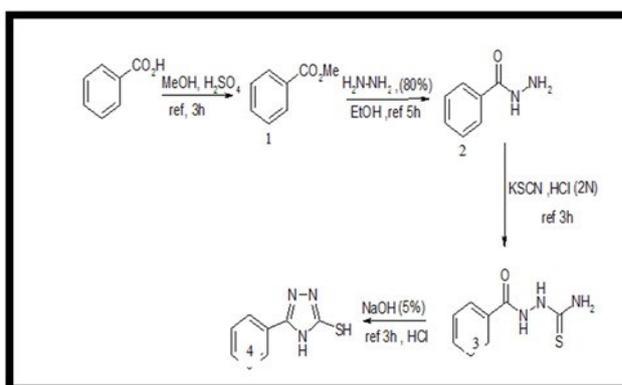


Figure 1: Diagram showing the steps of synthesis of the 5-phenyl 1, 2,4-triazoles 3-thiones molecules. (Almasirad et al., 2004).

2.1. Animals and Treatment

The study was performed on young Wistar rats, at the breeding farm located in the Department of Biology (University of Saida). Their body weight ranged between 50-55 g. Animals were housed individually in a temperature (22±2 °C) and photoperiod (12-h light/ dark cycle 07:00 to 19:00 h) controlled room and allowed free access to control diet. The animals were housed according to the EEC 609/86 Directives regulating the welfare of experimental animals (CEC, 1986). Twenty rats (20) were used in our study. After weaning, rats were separated into two groups with 10 rats in each group;

The First group (n = 10 rats) received (5 PTT 10mg / kg) in intraperitoneal injection (IP) for 30 days.

The second group (vehicule, n = 10 rats) the young rats received the same dose of distiller water for 30 days.

2.2. Neurobehavioral Study

2.2.1. Open Field Test (OFT)

The OFT test evaluates the general motor activity of rats. The apparatus was constructed of plywood and measured 72× 72 cm with 36 walls. The lines divided the floor into sixteen 18× 18 cm squares. Each animal was placed in the center of the arena and allowed to explore the apparatus for 5 min. The following parameters were recorded through the test: Number of squares crossing, Center squares entries, Rearing (Frequency with which the animal stood on their hind legs), Grooming and Defecation (Number of bolus produced). (Dauge et al., 1988).

2.2.2. Forced Swimming Test (FST)

Each rat was placed in glass cylinder (39 cm height × 20 cm diameter) containing water at 22

°C ±2° and 30 cm of deep. Two forced swimming sessions were conducted: an initial 10 minutes pre-test followed 24 hours by six minutes test. After swimming sessions, each rat was removed from the cylinder, dried and returned to their home cage. The parameters recorded during the test were of mobility and immobility time (Porsolt et al., 1977).

2.2.3. Y-maze test (Yassine, 2011)

The Y maze is commonly used for assessing spatial working memory in rats and mice, especially for

spontaneous alternation tasks. Immediate working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behaviour in a Y-maze. The maze was made of black-painted wood and each arm is 13 cm long, 4.5 cm high, 5.5 cm wide and positioned at equal angles. Rats were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during a 5 minutes session. The series of arm entries were recorded visually and arm entry was considered to be completed when the hind paws of the rat were completely placed in the arm. Alternation was defined as successive entries into the three arms on overlapping triplet sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of actual to possible alternations (defined as the total number of arm entries minus two), multiplied by 100.

$$\text{Percentage of alternation} = \frac{\text{Nb Alt} \times 100}{\text{Nb Visit} - 2}$$

At the end of the behavioral tests, rats were killed in the morning after 12 hours of fasting. Sacrifice was done by cervical decapitation. The brain is removed, rinsed with physiological solution (NaCl 0.9 %) and stored at -80 °C until use. Blood was collected in heparin tubes, and then it was centrifuged 3000 rpm/ 10 minutes. Samples of plasma were conserved for further examination.

2.2.4. Elevated plus Maze test

Anxiety was evaluated in the elevated plus maze test. The test apparatus consisted of two open arms, 50 × 10 cm (length × width) and two closed arms, 50 × 10 × 50 cm (length × width × height) with an open roof arranged in such ways that the two arm types were opposite to each other. For the test, each animal was placed in the center of the maze, facing one of the closed arms, the number of entries into the two arms, the time spent in the open and the closed arms were registered for five minutes. (Pellow et al., 1985).

2.3. Histopathological Examination

For histopathology analysis, a section of cortex brain from each rat was taken to the macroscopic examination in order to investigate the following aspects namely; the size and the location of the injured region. The removed tissue is selected for Microscopic examination using a basic technique with different stages including; fixation 10% with neutral buffered formalin, dehydration, paraffin embedding (5 micron paraffin sections), realization of the cuts and coloring of these by hematoxylin-

eosin followed by observation under an optical microscope using enlargement of 40.

2.4. Statistical Analysis

Results were expressed in standard error mean (SEM). Data were analyzed using the two-way analysis of variance (ANOVAs). When a significant difference was found, the Student Newman-Keuls posthoc test was conducted. For all analyses, a difference was considered significant at $P \leq 0.05$. Statistical analyzes were performed with the Sigma 3.5 statistics software.

3. Results

3.1. Body and Brain Weight

Administration of 5 PTT showed a significant decrease ($p < 0.001$) in the body weight of exposed rats compared to vehicle groups. The brain weight also decreased significantly ($p < 0.001$) in the treated rats compared to the vehicle groups (Table 1).

	Body weight (g)	Brain weight(g)
Vehicles	85,18± 4,16	1,71
5 PTT	53,35 ± 3,13	1,49

Table 1: Body weight (g) and brain weight (g) of vehicle and 5 PTT exposure rats.

Statistical analyses in the open-field test, demonstrated that 5 PTT exposure rats have decreased the number of crossed squares ($p < 0,001$), the number of recovery ($p < 0.001$) and the number of visits to the center ($p < 0.01$) compared to vehicle group, but there was no significant difference in recorded on the latency ($p > 0.05$), grooming ($p > 0.05$) and defecation ($p > 0.05$) between two groups (fig.2).

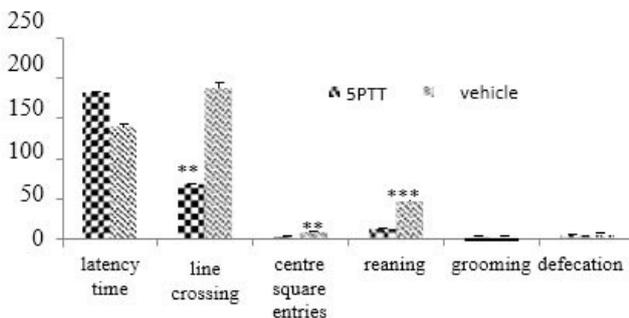


Figure 2: Effect of the exposure to 5 PTT open field parameters. Data are mean±S.E.M. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (5 PTT vs. Vehicle)

In addition, we registered a significant increase of immobility time in the exposed animals, in the

forced swimming test (FST), compared to the vehicles ($p < 0.001$) (Fig. 3).

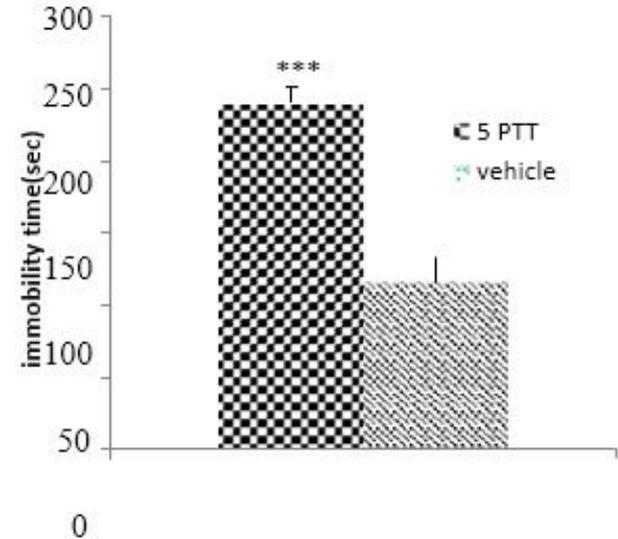


Figure 3: Effect of 5 PTT exposure on depression. Data is mean ±S.E.M. *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (5 PTT vs. vehicle)

Data concerning the Y maze test show that the percentage of spontaneous alternation (SPA) is significantly higher ($p < 0.01$) in animals exposed to 5 PTT compared to vehicle animals. (Fig4).

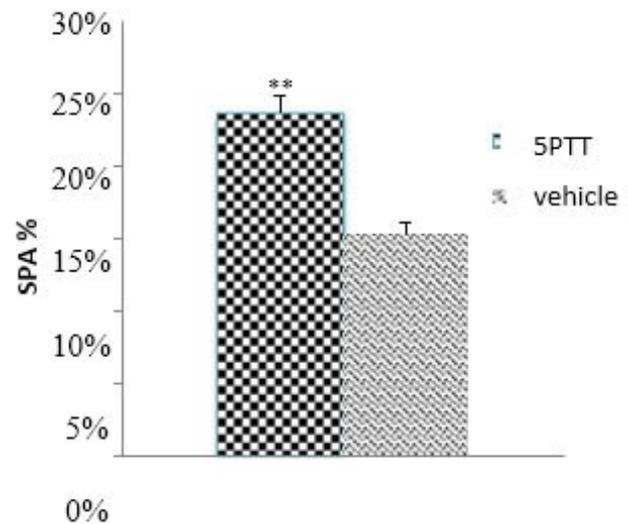


Figure 4: Effect of the exposure to 5 PTT on acquisition. Data are mean ±S.E.M. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (5 PTT vs. Vehicle)

Furthermore, the test of plus maze revealed that 5 PTT administration reduced significantly the time in the open arms ($p < 0.001$) and the number of entries into the open arms ($p < 0.001$) (Fig. 5).

3.2. Histological study

The qualitative regional analysis of the cerebral cortex indicated that the administration of 5 PTT

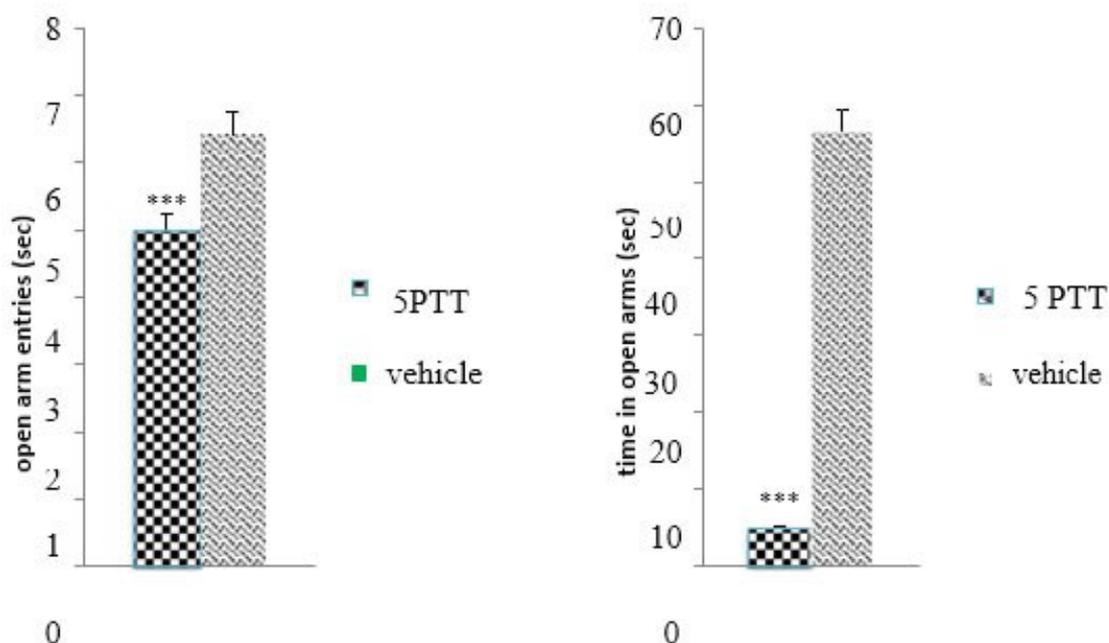


Figure 5: Effect of 5PTT exposure on anxiety behavior (plus maze test). Data are mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$; (5 PTT vs. Vehicle)

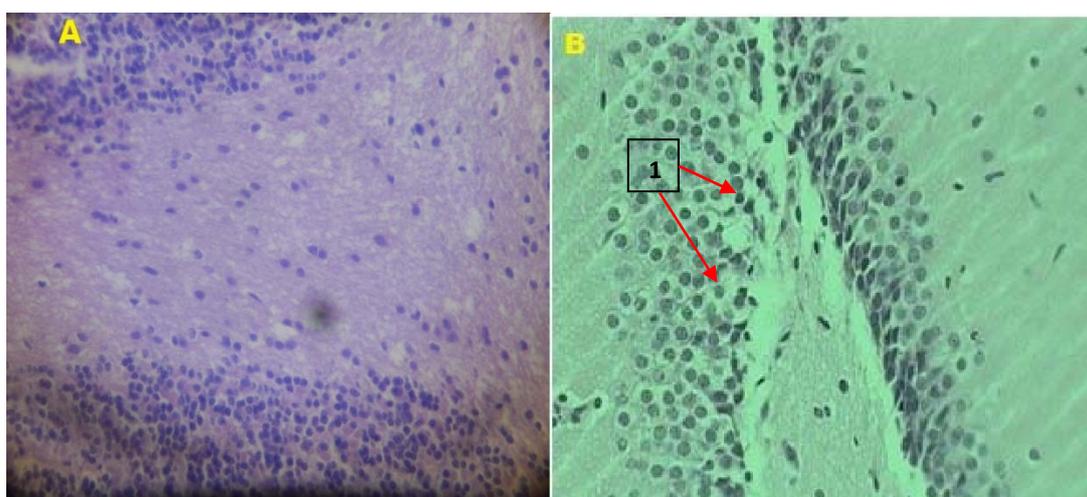


Figure 6: Histological section of the cerebral cortex of rat vehicle and rat exposed to 5 PTT. A: cerebral cortex of rat vehicle; B: cerebral cortex of rats exposed to 5 PTT GrX (40) 1: hyper chromatic cells.

causes an oligodendrogloma with palisade arrangement perivascular. At high magnification we note the presence of hyper chromatic cells in rats treated compared to control rats. (Fig 6).

4. Discussion

Triazole derivatives are a broad group of antimycotic compounds used widely in agriculture as well as in clinical and veterinary therapy (Xi et al.,2012). However, exposure to triazole derivatives can also causes multiple toxic effects in mammalian species, such as hepatotoxicity, thyrotoxicity, reproductive organs toxicity, carcinogenicity, and teratogenicity (Xi et al.,2012). This study was carried out to evaluate the behavioral modifications and their levels in

young rats exposed to 5 PTT at a dose of 10mg / kg during the period of 30days.

4.1. Body and Brain Weights

The present findings show that 5 PTT exposures cause a decrease in the body weight of the exposed rats compared to vehicle rats, this shows that this compound induces reduction of food intake; which seems to be due to the action of 5 PTT on certain neuro-centers in the brain responsible for the control of hunger in the brain (Moser and Macphail,1998). In addition, Bonnard *et al.*(2010); have shown a significant reduction in terms of body weight of wistar rats exposed to prothioconazole from 6th to 19th day of pregnancy at doses of 0.80;

500 or 1000 mg / kg / day. This compound could particularly affect the dopaminergic, serotonergic and glutamatergic neurons knowing that dopamine is involved in the physiology of hunger (Reeves and Thiruchelvam, 2004) and could play a primary role in the control of satiety (Torres and Nowson, 2007). In the same series of experiments, we observed a significant reduction in brain weight of 5PTT exposed rats. These results could be due to delayed development of the internal organs, brain included (Torres and Nowson, 2007). Similar observations have been reported by different authors (Bonnard et al., 2010)

4.2. Neurobehavioral tests

Concerning locomotor activity and stereotyped behavior, 5PTT exposure caused a significant decrease in the horizontal and the vertical locomotor activity in the open field test, the decline in the middle of the exploration is accompanied by changes in stereotyped behaviors show that 5PTT has induced locomotor hypoactivity. Firstly, it is known that changes in motor activity may occur as a result of neurochemical changes, specifically in the dopaminergic neurotransmission in the nigrostriatal pathway (Crofton et al., 1998).

Many suggestions have been proposed to explain this effect; some of this linked the change in the open field behavior to the alteration of dopaminergic, serotonergic and cholinergic systems (Faro et al., 2012). Several studies demonstrated that the changes caused by some triazole compounds like Triadimefon at a dose of 200mg in the brain through an alteration of dopaminergic activity associated with decrease of postsynaptic receptors in the striatum (Reeves et al., 2003; Santana et al., 2009). The 200 mg/kg was the highest dose of triadimefon that decreased concentration of dopamine (DA) (Walker et al., 1990; Moser and Macphail, 1998). Hence, Crofton (1996) reported that exposure to triadimefon at a dose of 50-400 mg / kg induced a decrease in the dopamine reuptake by presynaptic terminals. Likewise, other researchers have shown that the action of triadimefon induced a drop in the synthesis, the release of dopamine or by the inhibition of dopamine D1 and D2 receptors and about 30% DA concentration decrease in striatum in rats treated with 200 mg/kg i.p. triadimefon. (Walker et al., 1990; Filipov and Lawrence, 2001; Moser et al., 2001). In contrast to the above findings, our data and results have demonstrated that triadimefon have caused hyperactivity; one hypothesis to explain this is that triadimefon inhibits the

uptake of dopamine at the synapse by binding the dopamine transporter. This hypothesis is in fact supported by other studies (Crofton et al., 1989; Gagnaire and Micillino, 2006). Moreover, the observed data for the forced swimming test have showed that the time of immobility in the 5PTT exposed group was longer than the one in the control group.

This could be due to the fact that 5PTT acts as a depressive element on the monoaminergic systems particularly the serotonergic system and glutamatergic transmission in brain and its receptors respectively: 5HT1A and NMDA which are involved in the physiopathology of depression. This increase explains the animal's inability to swim which is, maybe, due to a decrease in muscle's tone and the establishment of a desperate behavior immobility is interpreted as depression. These results, which are in accordance with many studies such as (Filipov and Lawrence, 2001; Conrad et al., 2003; Santana et al., 2009), shows that exposure to triadimefon can cause alteration in the dopaminergic and serotonergic pathways mainly at the levels of the striatum and hippocampus (Moser et al., 2001; Faro et al., 2012).

Furthermore, the Y-maze is a specific and sensitive test for spatial recognition memory in rodents (Ma et al., 2007). Hence, to evaluate the learning ability and memory of the animals some studies have used the number of arm visits as an index of locomotor activity as well (Lathe, 2001). In this regards, our results revealed higher alternation of the spontaneity percentage at the exposed group compared to the control group is higher. Which was in agreement with the studies of those of Ma et al (2007) indicating that exposure to the compound Tebuconazole caused a neurobehavioral deficit in rats. This learning deficit is well correlated with reported neuropathological findings (such as the loss of pyramidal cells in the hippocampus) (Conrad, 2003). Further the results by Lingappa et al (2008) found that the alternating deficit associated with this test as observed in rats exposed to Triazole, including the hippocampus damage, would be linked with increased secretion of factors that have on learning and memory such as certain cytokines (Maden, 2007). Further studies show that exposure to Propiconazole, Triadimefon and Myclobutanil affect the glutamatergic system, specifically the NMDA receptor and memory function and is related to the NMDA receptor/Ca²⁺ influx signaling pathway (Ma et al., 2007). It is a complex interfer-

ence process responsible for a variety of changes in intracellular signaling and synaptic plasticity of the hippocampus which is known to interfere with learning and memorization (Crofton et al., 2006).

In summary, compared to the study by Moser *et al* (2001) which detected a hippocampal deficit following perinatal tebuconazole exposure, we observed a significant reduction in retinoic acid (RA) concentration in the hippocampus following the administration of triadimefon. Including the regeneration and maintenance of the adult nervous system (Filipov and Lawrence, 2001)] mainly by regulating gene transcription (Ding et al., 2008). There is evidence showing that RA serves a vital function in the development and maintenance of spatial memory (Fairon, 2006). Xi et al. (2012) showed that triadimefon inhibited spatial learning and impaired spatial reference memory, and decreased hippocampal retinoic acid concentration. There is evidence that triadimefon can play a role in regulating the metabolism of retinoic acid, which serves a critical function in the development and maintenance of spatial memory.

Furthermore, on the test of elevated plus-maze, which is a test to assess the relative degree of anxiety, we noted that animals exposed to 5PTT had a preference for dark spaces and were fleeing open and bright spaces. This was reflecting a significantly high level of anxiety compared to vehicle animals. These results show that 5PTT significantly reduced their exploring faculties through its anxiety behavioral disorders effect observed in anxious animal (Voigt et al., 1999). Based on the above results and discussion, it is therefore concluded that the compound Myclobutanil, which is a triazole derivative at dose 1800 ppm, causes inhibition of 5HT receptor and is hence involved at playing a central role in controlling anxiety and depression keeping in mind that the serotonergic system has a central role in the modulation of anxiety (Hill et al., 2000) and increase in levels of 5-HT in the hippocampus is the origin of anxiogenic effects. Moreover, the observed increase in 5-HIAA suggests an increase in serotonin turnover. This was also noticed by Walker et al. (1990). Moser et al. (2001) in the same way, previous *in vitro* studies have reported that triadimefon competitively binds to the dopamine transporter and inhibit its uptake (Ikaidi et al., 1996; Hill et al., 2000).

4.3. Histological study

In order to see if the administration of triazole is accompanied or not by an alteration of tissue architecture, we performed histological brain in control and triazole exposed rats, the histological review is designed to complement our previous result. The recorded results data show a perivascular palisade arrangement of oligodendrocytes; at high magnification we note the presence of hyper chromatic cells in treated rats compared to control rats. Studies by Faro (2010), show that exposure to triazoles in general causes neuropathological lesions in the rat brain. In confirmation, the sub chronic neurotoxicity studies with prothioconazole at a dose of (43.3 mg /kg/p.c/j) showed an induced increase in peripheral nerve lesion.

5. Conclusion

The present study demonstrates that a sub chronic exposure to 5- phenyl -1, 2, 4 triazole-3- thiol (5PTT) can produce adverse effects, thus induces significant perturbation of emotional reactivity which is reflected in the forms of depression, anxiety, altered learning and memory processes and impairment of the nervous system.

Acknowledgements

The authors are graceful to Special thanks to Dr. Rachedi Abdelkrim for his invaluable help and outstanding contribution to this work

References

- Agrawal R, Pancholi S (2011) Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of a series of 1, 2, 4-triazoles. *Der Pharma Chemica* 3 (6):32-40.
- Almasirad A, Tabatabai SA, Faizi M, Kebriaeezadeh A, Mehrabi N, Dalvandi A, et al (2004) Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 2, 4-triazoles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14(24):6057-9.
- Asif M (2015) Antiviral and antiparasitic activities of various 10/ substituted triazole derivatives: A mini. *Chemistry International*; 1 (2):71-80.
- Bonnard N, Jargot D, Falcy M, Fastier A, Oudar S, Rambourg MO (2010) prothioconazole INRS ; Edition :1-8.
- Conrad CD, Grote KA, Hobbs RJ, Ferayorni A (2003) Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. *Neurobiology of learning and memory* 79 (1):32-40.
- Crofton K A (1996) structure-activity relationship for the neurotoxicity of triazole fungicides. *Toxicology letters* 84(3):155-9.

- Crofton K, Boncek V, MacPhail R (1989) Evidence for monoaminergic involvement in triadimefon-induced hyperactivity. *Psychopharmacology* 97(3):326-30
- Dauge V, Rossignol P, Roques BP (1988) Comparison of the behavioural effects induced by administration in rat nucleus accumbens or nucleus caudatus of selective μ and δ opioid peptides or ketorphan an inhibitor of enkephalin-degrading-enzymes. *Psychopharmacology* 96(3):343-52.
- Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee E S, Block ML, et al (2008). Retinoic acid attenuates β -amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *LeJournal de Neuroscience*. 28(45):11622-34.
- Fairon M (2006) L'anxiété chez les animaux de compagnie, approches conceptuelle, clinique et thérapeutique: Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC).
- Faro LRF, Alfonso M, Maués LA, Durán R (2012) Role of ionotropic glutamatergic receptors and nitric oxide in the effects of flutriafol, a triazole fungicide, on the in vivo striatal dopamine release. *The Journal of Toxicological Sciences* 37(6):1135-42.
- Faro LRF (2010) Neurotoxic Effects of Triazole Fungicides on Nigrostriatal Dopaminergic Neurotransmission. Ed. Odile Carisse:405.
- Filipov NM, Lawrence DA (2001) Developmental toxicity of a triazole fungicide: consideration of interorgan communication. *Toxicological Sciences* 62(2):185-6.
- Gagnaire F, Micillino JC (2006) Effects of triadimefon on extracellular dopamine, DOPAC, HVA and 5-HIAA in adult rat striatum. *Toxicology* 217(2):91-104.
- Gautam N, Chourasia O (2010) Synthesis, antimicrobial and insecticidal activity of some 4H-1, 2, 4 triazole derivatives. *Indian journal of chemistry Section B*. 49(7):956.
- Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA (2008) Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *Journal of Nuclear Medicine* 49(Suppl 2): 24S-42S.
- Hill D, Ikaidi M, Mazzi E, Soliman KF (2000) The neurochemical basis for the behavioral effects of triadimefon. *Annals of the New York Academy of Sciences* 914(1): 336-353.
- Ikaidi M, Akunne H, Soliman K (1996) Behavioral and neurochemical effects of acute and repeated administration of triadimefon in the male rat. *Neurotoxicology* 18(3):771-80.
- Jeyaratnam J 1990. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat Q*. 43(3):139-44.
- Kumar PV, Rao VR (2008) Synthesis and antitubercular, antiviral and anticancer activity of 3-(3-mercaptoalkyl-7H-[1, 2, 4] triazol[3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazin-6-yl) chromen-2-one and its derivatives. *Indian Journal of Chemistry B* 47:106-11.
- Kumar R, Yar MS, Chaturvedi S, Srivastava A (2013) Triazole as pharmaceutical potentials. *International Journal of PharmTech Research* 5(4):1844-69.
- Kumudha D, Reddy R, Kalavathi T. synthesis and evaluation of some 1, 3, 4-thiadiazoles having substituted 1, 2, 4-triazole moiety for anticonvulsant and depressant activity. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3:728-740.
- Lathe R (2001) Hormones and the hippocampus. *Journal of Endocrinology* 169(2):205-31.
- Lingappa B, Girisha K, Kalluraya B, Rai S, Kumari N (2008) Regioselective reaction: Novel Mannich bases derived from 3-(4, 6-disubstituted-2-thiomethyl) 3-amino-5-mercapto-1, 2, 4-triazoles and their antimicrobial properties. *Indian Journal of Chemistry* 47:1858-64.
- London L, Flisher A, Wesseling C, Mergler D, Kromhout H (2005) Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? *American Journal of Industrial Medicine* 47(4):308-321.
- Ma M, Chen Y, He J, Zeng T, Wang J (2007) Effects of morphine and its withdrawal on Y-maze spatial recognition memory in mice. *Neuroscience* 147(4):1059-1065.
- Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 8(10):755-65.
- Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F, Giavini E (2006) Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reproductive Toxicology* 22(2):186-95.
- Moser V, Barone S, Smialowicz R, Harris M, Davis B, Overstreet D, et al (2001) The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. *Toxicological Sciences* 62(2):339-352.
- Moser VC, Macphail RC (1989) Neurobehavioral effects of triadimefon, a triazole fungicide, in male and female rats. *Neurotoxicology and teratology* 11(3):285-293.
- Nesnow S, Padgett WT., Moore T (2011) Propiconazole induces alterations in the hepatic metabolome of mice: relevance to propiconazole-induced hepatocarcinogenesis. *Toxicological Sciences* 120(2):297-309.
- Nesnow S, Ward W, Moore T, Ren H, Hester SD (2009) Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital by transcriptional analyses of mouse liver gene expression. *Toxicological Sciences* 110:68-83.
- Pellow S, Chopin P, File SE (1985) Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? *Neuroscience letters* 55(1):5-9.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266 (5604):730-732.
- PRD (2012) Projet de décision d'homologation, Tétraconazole. Santé Canada.
- Reeves R, Thiruchelvam M, Richfield EK, Cory-Slechta DA (2003) Behavioral sensitization and long-term neurochemical alterations associated with the fungicide triadimefon. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 76(2):315-326.
- Reeves R, Thiruchelvam M, Cory-Slechta D (2004) Development of behavioral sensitization to the cocaine-like fungicide triadimefon is prevented by AMPA, NMDA, DA D1 but not DA D2 receptor antagonists. *Toxicological Sciences* 79(1):123-136.
- Santana M, Rodrigues K, Duran R, Alfonso M, Vidal L, Campos F, et al (2009) Evaluation of the effects and mechanisms of action of flutriafol, a triazole fungicide, on striatal dopamine release by using in vivo microdialysis in freely moving rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(5): 1565-71.
- Shiradkar M, Pandit U, Akula KC, Maheta A, Kumar GVS (2006) Microwave assisted synthesis and antimicrobial screening of fused triazoles. *Arkivoc* 14:141-54.
- Torres SJ, Nowson CA (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23(11):887-894.

Voigt JP, Rex A, Sohr R, Fink H (1999) Hippocampal 5-HT and NE release in the transgenic rat TGR (mREN2) 27 related to behavior on the elevated plus maze. *European Neuropsychopharmacology*. 9(4):279-285.

Wada T, Gao J, Xie W (2009) PXR and CAR in energy metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20(6):273-279

Walker QD, Lewis MH, Crofton KM, Mailman RB(1990) Triadimefon, a triazole fungicide, induces stereotyped behavior and alters

monoamine metabolism in rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 102(3):474-85.

Xi J, Yang Z, Zeng C, Hu X, Wang J (2012) Suppressive effect of triadimefon, a triazole fungicide, on spatial learning and reference memory in rats. *Behavioural Pharmacology* 23(8):727-734.

Yassine N(2011) Lésions sélectives de deux populations de neurones affectées dans la maladie d'Alzheimer: Impact sur les performances cognitives et l'histopathologie des souris tg2576: Strasbourg.



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).