

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DR. MOULAY TAHAR-SAIDA  
FACULTE DES SCIENCES  
Département De Biologie  
Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme  
DE MASTER EN BIOLOGIE  
Option : Biochimie et Physiologie Cellulaire  
Intitulé

***Contribution à l'étude de l'effet d'une exposition aiguë et subchronique au 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol (5-PTT) sur le statut oxydant et biochimique chez des jeunes rats Wistar***

Présenté par :

- ZERARKI Nour El Imane
- ASLI Mokhtaria

Soutenu le 21-06-2017 devant le jury composé de :

M Adli Djallal Eddine Houari	Maitre de conférences «B» -U de Saida	Président
M <sup>lle</sup> Chikhi Amira	Maitre assistante «A»- U de Saida	Examinatrice
M <sup>me</sup> Hadjadj Hassina	Maitre assistante «A»- U de Saida	Encadrante

Année Universitaire : 2016-2017

## Résumé

---

Le présent travail sert à évaluer l'effet du 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol (5-PTT) suite à une exposition subchronique et aigue sur des jeunes rats Wistar selon une approche biochimique et à travers l'étude du statut oxydatif au niveau érythrocytaire, hépatique et rénal.

L'exposition subchronique à une dose de 10mg/kg au 5-PTT a permis d'observer une réduction significative du poids corporel et hépatique chez les sujets exposés au 5-PTT comparés aux sujets témoins, tandis que le poids rénal ne présente aucune différence significative.

Les résultats de quelques paramètres biochimiques révèlent une élévation significative du taux de glucose sanguin, de cholestérol, des triglycérides, de l'activité enzymatique de la TGO et la TGP chez les rats traités par rapport aux rats témoins. Le taux sérique de l'urée et de la créatinine ne présente aucune différence significative entre les deux groupes de rats.

En outre, 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 dont on note une diminution significative de la teneur hépatique et érythrocytaire de la catalase et le glutathion peroxydase et une augmentation de glutathion réduit. Le 5-PTT n'a provoqué aucune variation des paramètres oxydatifs pour les reins.

En bref, l'exposition aigue et subchronique au 5-PTT a entraîné des modifications de certaines paramètres biochimiques et un déséquilibre du statut oxydatif qui se reflète sur les fonctions hépatiques et érythrocytaire.

**Mots clés :** 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol, statut oxydatif, hépatique, érythrocytaire, antioxydant.

## *Abstract*

---

This study evaluates the effect of 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol (5-PTT) on subchronic and acute exposure to young Wistar rats using a biochemical approach and Study of oxidative status at the erythrocytic, hepatic and renal level.

Subchronic exposure at a dose of 10mg / kg to 5-PTT resulted in a significant reduction in body and hepatic weight in subjects exposed to 5-PTT compared to control subjects, while renal weight showed no difference significant.

The results of some biochemical parameters reveal a significant increase in blood glucose, cholesterol, triglycerides, enzymatic activity of TGO and TGP in treated rats compared to control rats. The serum urea and creatinine levels showed no significant differences between the two groups of rats.

In addition, analysis of antioxidant status in blood, liver and kidney indicates that acute exposure to 5-PTT at a dose of 200 mg / kg disrupts the activity of the various antioxidants, of which there is a significant decrease in Hepatic and erythrocytic content of catalase and glutathione peroxidase and a reduced glutathione increase. The 5-PTT did not cause any variation in oxidative parameters for the kidneys.

In short, acute and subchronic exposure to 5-PTT resulted in changes in some biochemical parameters and an imbalance in oxidative status that is reflected in liver and erythrocyte function.

**Key words:** 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol, oxidative status, liver, erythrocyte, antioxidants.

## **Remerciement**

*Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout au bon Dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

*Nous voudrions tout d'abord remercier notre chère promotrice Mme. Hadjadj Hassina pour son soutien et sa contribution à la réalisation de ce mémoire et pour ses Précieux conseils.*

*Nous tenons à dresser nos remerciements les plus sincères aux membres de jury qui vont juger notre mémoire : M. Adli le président du jury et Mlle. Chikhi l'examinatrice.*

*Nous remercions Pr. Benali pour la synthèse de la molécule étudiée.*

*Nous remercions également M. Kahloula, M. Ammam et les doctorants de biochimie et toxicologie cellulaire pour leurs aides pour la réalisation de notre pratique.*

*Nos remerciements s'étendent également à tous nos professeurs sans distinction pour leur savoir et savoir-faire dont nous avons pu tirer profit et qui, par leurs compétences, nous ont soutenues dans la poursuite de nos études.*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes ayant participé à la réalisation de ce mémoire de près ou de loin.*

*Merci encore une fois.*

## Dédicace

*Je dédie très sincèrement ce mémoire de master*

*A ma mère et mon père, qui m'ont toujours aidé, soutenu et encouragé tout au long de mes études.*

*A mes grands parents.*

*A mes frères et mes sœurs.*

*A mes tantes et mes oncles.*

*A toute ma famille, Je ne vous remercierai jamais assez.*

*A mes amies Nacera, Aïcha et à toute ma promotion.*

*Et à tous ceux qui me sont chers.*

***Nour El Imane***

## Dédicace

*Avant toute chose je remercie Allah le tous puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.*

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes chers parents, qui m'avez dirigé et suivi pondent toute mes années d'étude et surtout MA Mère Sakina la plus belle mère dans la vie, pour toutes tes efforts fournée, toutes tes sacrifices pour toute la confiance que vous m'avez donné afin de me motivé dans mes études et me voir satisfaite et heureuse.*

*A mon père Mokhtar pour sa patience, sa confiance et son respect de mes choix rien au monde ne vont les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être*

*Je vous offre toutes mes années d'étude ainsi que mon diplôme.  
Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :  
Ma grande -mère , Ma grande-père  
que dieu la garde pour nous.*

*Mon frères Mohamed et mes seure: Hadjira,Souade,Ahlam  
Mes très chères amies Aicha,Zerareki Nour elIman, Nasira,Malika, Fatima,  
Et bien sur tous mes enseignants depuis la période de primaire jusqu'à  
l'université et  
spécialement Mr Benthabet Adjire,Nabi Abdelkarime,Mr Slimani Miloude,  
Mr Adli Djalaledine,Kahloula Kaled, Rajee Amina*

**ASLI MOKHTARIA**

## Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Remerciement	
Dédicace	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Etude bibliographique.....	2
CHAPITRE I :les triazoles.....	3
Les triazoles.....	4
1. Généralités.....	4
2. Définition des triazoles.....	4
2. 1. L'isomérisation des triazoles .....	4
2. 2. Le tautomérisme dans les triazoles .....	5
2. 3. Aromaticité et stabilité .....	5
3. Mécanisme d'action biochimique.....	5
4. Applications et activités biologiques de 1,2,4-triazole.....	6
4.1. Applications agricoles.....	6
4.2. Applications pharmacologiques .....	7
4.2.1. Activités anticancéreuses.....	7
4.2.2. Activités antifongiques.....	8
4.2.3. Activités antibactériennes.....	8
4.2.4. Activités anti-inflammatoires.....	8
4.2.5. Activités anti convulsivantes.....	9

4.2.6. Activités antioxydantes .....	9
4.3. Applications industrielles .....	9
5. La toxicocinétique des 1,2,4-triazole.....	9
5.1. Absorption.....	9
5.2. Distribution.....	10
5.3. Métabolisme.....	10
5.4. Elimination.....	10
6. Les effets toxiques des triazoles.....	10
6.1. Effets sur le système nerveux.....	10
6.2. Effets géniques.....	11
6.3. Effets sur la reproduction et développement .....	11
6.4. Effets hépatiques .....	11
6.5. Effets sur le système endocrinien.....	12
6.6. Effets tératogène.....	12
6.7. Effets cancérogènes.....	12
CHAPITRE II : Le statut oxydatif.....	13
Le stress oxydatif.....	14
1. Le paradoxe de l'oxygène.....	14
2. Définition.....	14
3. Origine du stress oxydant.....	15
4. Les radicaux libres.....	15
4.1. Les cibles des RL.....	15
4.2. Espèces oxygénés réactive "EOR, ROS".....	16
4.2.1. Rôle physiologique des EOR.....	17
4.2.2. Origines et destinée des EOR.....	17
4.2.3. Le radical superoxyde .....	19
4.2.4. Le peroxyde d'hydrogène.....	20
4.2.5. Le radical hydroxyle.....	20
5. Les défenses antioxydantes.....	21
5.1. Définition des antioxydants .....	21
5.2. Le système antioxydant enzymatique.....	22
5.2.1. Les superoxydes dismutase.....	22

5.2.2. La catalase.....	22
5.2.3. Les glutathions peroxydases.....	22
5. 3. Le système antioxydant non enzymatique.....	22
6. Conséquences biochimiques du stress oxydant.....	23
6. 1. La peroxydation lipidique.....	23
6. 2. L'oxydation des protéines.....	24
6. 3. L'oxydation des glucides.....	24
6. 4. L'oxydation de l'ADN.....	24
Matériel et méthodes.....	26
<u>I.</u> L'objectif.....	27
<u>II.</u> Protocole expérimental.....	27
1. Le matériel biologique et conditions d'élevage.....	27
2. Synthèse de 5-phenyl-1,2,4-triazole-3,thiol (5-PTT).....	28
3. Préparation de la solution injectable.....	29
4. Le traitement des rats.....	29
5. Partie I: exposition subchronique.....	29
5.1. Répartition des groupes.....	29
5.2. Sacrifices et prélèvements sanguins.....	29
5.3. Evolution du poids corporel et poids des organes.....	29
6. Partie II: exposition aigue.....	30
6.1. Répartition des groupes.....	30
6.2. Sacrifices et prélèvements du sang et organes.....	30
7. Dosages des paramètres biochimiques.....	32
7.1. Dosage de glucose .....	32
7.2. Dosage de cholestérol.....	32
7.3. Dosage des triglycérides plasmatiques.....	33
7.4. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO).....	33
7.5. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP).....	34

7.6. Dosage d'urée.....	34
7.7. Dosage de créatinine.....	34
8. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	35
8.1. Protocole de l'homogénéisation des érythrocytes et organes.....	35
8.2. Préparation de l'homogénat.....	35
8.3. Dosage des protéines.....	36
8.4. Dosage du glutathion réduit (GSH).....	37
8.5. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px).....	38
8.6. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase(CAT).....	39
9. Expression et analyse statistique des résultats.....	40
Résultats et Interprétations.....	41
I. Résultats de l'exposition subchronique.....	41
1. La croissance pondérale .....	41
2. Action sur le poids de certains organes (foie et rein).....	41
3. Dosage des paramètres biochimiques .....	43
3.1. Action sur la glycémie.....	43
3.2. Action sur certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique.....	43
3.2.1. Profile lipidique (cholestérol, triglycérides).....	43
3.2.2. Activité des transaminases.....	44
3.3. Action sur la variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine.....	46
II. Résultats de l'exposition aigue.....	47
1. Activité des biomarqueurs du statut oxydant au niveau hépatique, rénal, érythrocytaire.....	47
1.1. Glutathion réduit.....	47
1.2. Effet sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes tissulaires.....	49
1.2.1. Activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	49
1.2.2. Activité de la catalase (CAT).....	50

Discussion.....	53
Discussion partie 1: exposition subchronique.....	54
1. La croissance pondérale et le poids des organes.....	54
2. Bilan biochimique.....	55
Discussion partie 2: exposition aigue.....	58
1. Activités des enzymes du statut oxydant au niveau hépatique, rénal et érythrocytaire.....	58
Le glutathion peroxydase.....	58
La catalase.....	59
2. Activités non enzymatique de système antioxydant.....	60
Le glutathion réduit.....	60
Conclusion.....	61
Références bibliographique.....	64

## *Liste des abréviations*

---

**5-PTT**: 5-phenyl 1,2,4-triazole 3-thiol.

**AINS** : anti-inflammatoire non stéroïdien.

**ATP** : adénosine triphosphate.

**CAT** : catalase.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**EDTA** : Acide éthylènediamine-tétracétique.

**EOR** : espèces oxygénées réactives.

**EP** : eau physiologique.

**GSH** : Glutathion.

**GSH-px** : glutathion peroxydase.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**HO<sup>•</sup>** : Radical hydroxyle.

**IF** : infections fongiques.

**IP** : intra-péritonéale.

**NO<sup>•</sup>**: Monoxyde d'azote.

**RL**: radical libre.

**ROS**: reactive oxygen species.

**SO** : stress oxydant.

## Liste des Figures

---

<b>Figure 1</b> : Structure chimique de 1,2,3- et 1,2,4-triazoles.....	04
<b>Figure 2</b> : Structures chimiques des triazoles et leurs formes tautomères.....	05
<b>Figure 3</b> : Mécanisme d'action des fongicides azolés.....	06
<b>Figure 4</b> : Activités pharmacologiques des dérivés de 1,2,4-triazoles.....	07
<b>Figure 5</b> : Agents antifongiques triazole utilisés en thérapie clinique.....	08
<b>Figure 6</b> : Définition du stress oxydatif.....	14
<b>Figure 7</b> : L'O <sub>2</sub> , à l'origine des radicaux libres.....	16
<b>Figure 8</b> : La double vie des ERO.....	17
<b>Figure 9</b> : Origines et actions des ERO .....	18
<b>Figure 10</b> : Voie métabolique de l'oxygène et des ERO.....	19
<b>Figure 11</b> : Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production.....	21
<b>Figure 12</b> : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....	24
<b>Figure 13</b> : Les rats d'expérimentation.....	27
<b>Figure 14</b> : Schéma représentant les étapes de synthèse de 5-PTT.....	28
<b>Figure 15</b> : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	31
<b>Figure 16</b> : La courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des protéines.....	36
<b>Figure 17</b> : réaction d'Ellman.....	37
<b>Figure 18</b> : L'évolution du poids corporel des rats pendant 30 jours d'expérimentation...	41
<b>Figure 19</b> : Comparaison du poids de foie entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins.....	42

## Liste des Figures

---

<b>Figure 20</b> : Comparaison du poids du rein des sujets témoins et des sujets exposés au 5-PTT.....	42
<b>Figure 21</b> : Comparaison entre la glycémie entre rats traités par 5-PTT et rats témoins....	43
<b>Figure 22</b> : Comparaison du taux de cholestérol entre les rats traités par 5-PTT et les rats témoins.....	44
<b>Figure 23</b> : Comparaison du taux de triglycérides entre les rats traités par 5-PTT et les rats témoins.....	44
<b>Figure 24</b> : Comparaison du taux du TGO entre les rats témoins et les rats traites par le 5-PTT.....	45
<b>Figure 25</b> : Comparaison du taux du TGP les rats traités par 5 PTT et les rats témoins.....	45
<b>Figure 26</b> : L'effet du 5 PTT sur le taux sérique de l'urée.....	46
<b>Figure 27</b> : Comparaison du taux de la créatinine entre les rats témoins et les rats exposés au 5 PTT.....	46
<b>Figure 28</b> : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau rénal des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....	47
<b>Figure 29</b> : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau des érythrocytes des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....	48
<b>Figure 30</b> : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau du foie des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....	48
<b>Figure 31</b> : Comparaison de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase au niveau rénal des rats traites par 5-PTT avec les témoins.....	49
<b>Figure 32</b> : Comparaison de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase au niveau hépatique des rats traites par 5-PTT avec les témoins.....	50
<b>Figure 33</b> : comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau érythrocytaire des rats traites par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....	50

## *Liste des Figures*

---

- Figure 34** : Comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau rénal des rats traités par 5-PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....51
- Figure 35**: comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau hépatique des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....52
- Figure 36** : comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau érythrocytaire des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO.....52

La vie dépend totalement des composés hétérocycliques, tels que les bases de purine et de pyrimidine « unité de construction d'ADN et d'ARN » (Shneine et Alaraji., 2014). Ils sont particulièrement importants (Tumosiene et al., 2009). Les triazoles constituent une classe cruciale des hétérocycles biologiquement actifs (Rajkumar et Pancholi., 2011). Parmi les 2 types des triazoles, 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 (Sharma et al., 2011). tel que l'effet antibactérien, antifongique, hypoglycémiant et agrochimique (Hamoir et al.,2001).

L'oxygène est l'élément indispensable à notre survie, à notre vie, à notre développement, à notre capacité d'adaptation ; mais il est également susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation d'espèces oxygénées réactives « EOR » (Koechlin-Ramonatxo., 2006, Haleng et al., 2007). Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants (Pincemail et al., 2002).

Ces dernières années, la recherche toxicologique s'est concentrée sur l'induction du stress oxydant (SO) après l'exposition aux pesticides comme mécanisme possible de la toxicité ; à cet effet plusieurs études ont montrés que les pesticides ont causé la surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO) dans les espaces intra et extracellulaires, ayant pour résultat la perturbation d'équilibre prooxydant/antioxydant cellulaires induisant de ce fait un état de stress oxydant.

C'est ainsi que nous sommes intéressés à entreprendre ce travail qui a pour objectif d'étudier le statut oxydatif des jeunes rats Wistar suite à une exposition aigue et subchronique au 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol (5-PTT).

# *Etude bibliographique*

*CHAPITRE I*  
*LES TRIAZOLES*

## Les triazoles

### 1. Généralités

Le mot triazole fut donné pour la première fois par Bladin en 1885 aux systèmes cycliques carbone-azote de formule moléculaire  $C_2H_3N_3$  (Bladin., 1885).

Les triazoles ont été développés dans les années 1970-1980 (Regnault – Roger., 2014). Ils sont utilisés en agriculture depuis une bonne trentaine d'années (Maumené., 2008).

Les fongicides à base de triazole sont la deuxième catégorie de fongicides la plus importante selon leur valeur de marché à l'échelle mondiale (WBISS Consulting Co, Ltd, 2016).

Tous les triazoles sont d'origine synthétique, ils n'existent pas dans la nature.

### 2. Définition des triazoles

Les triazoles comportent un hétérocycle à cinq chaînons composé de deux atomes de carbone et trois atomes d'azotes.

#### 2.1. L'isomérisie 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) :

Les 1,2,3-triazoles « v-triazole » (Bentiss 2006).

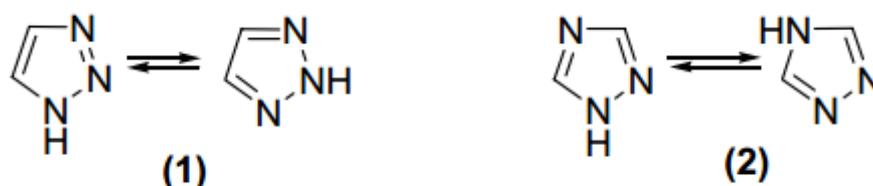
Les 1,2,4-triazoles « S-Triazole ou Pyrrodiazole » (INERIS 2014).



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

## 2.2. 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).



(1) : les deux tautomères de v-triazoles (2) : les deux tautomères de s-triazole

Figure 2 : Structures chimiques des triazoles et leurs formes tautomères.

## 2.3. Aromaticité et stabilité

Les 1,2,3- ou 1,2,4-triazoles possèdent une structure pseudo-aromatique, qui se traduit notamment par une interaction entre les liaisons  $\pi$ , ce sont des composés très stables vis-à-vis d'autres réactifs chimiques, de l'oxydation et de la réduction (Ennaji., 2011). Ils sont stables aussi à l'hydrolyse acide ou basique (OUKESSOU., 2014). L'aromaticité est la principale raison de la stabilité du noyau de triazole (Shneine et Alaraji., 2014).

## 3. 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 (Vandeputte., 2008).

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). 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 $\alpha$ -déméthylase fongique (Ghannoum and Rice., 1999). Encore plus précisément, ils bloquent le site actif de cet enzyme qui est un cytochrome P450 « CYP51» (Maumené., 2008). Cet enzyme clé est codé par le gène ERG11 « Figure 3 ».

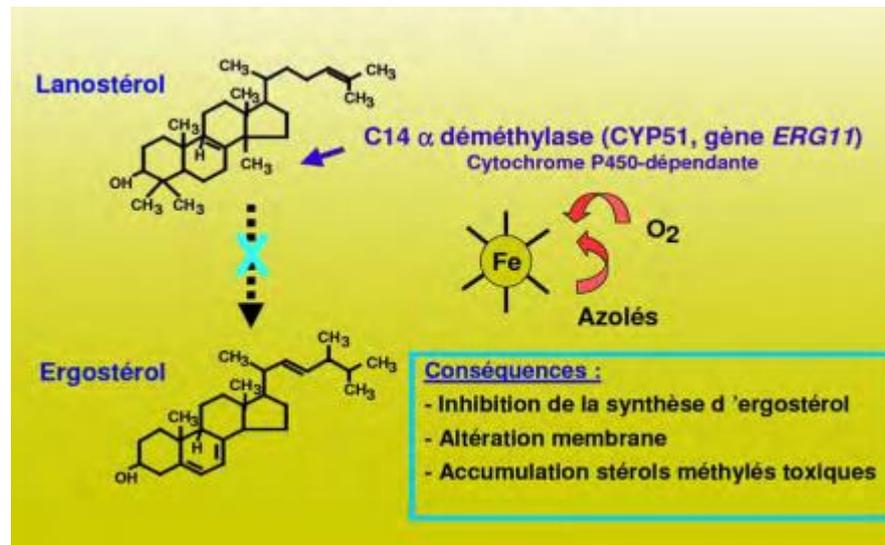


Figure 3 : mécanisme d'action des triazoles (Denis., 2010).

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).

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).

#### 4. Applications et activités biologiques de 1,2,4-triazole

##### 4.1. Applications agricoles

Les triazoles sont une classe de fongicides utilisés en agriculture sur les fruits, les légumes, les céréales, les graines (Martin et al ; 2007). La capacité antifongique des triazoles fait de cette classe de composés un outil efficace pour contrôler de nombreuses espèces et souches de champignons (Ghannoum and Rice, 1999).

Ces dérivés ont été utilisés également dans la technologie de protection des plantes en tant que pesticides (Jess et al., 2014).

## 4.2. Applications pharmacologiques

Le système triazole est un élément structural de nombreux médicaments (Wujec et al., 2004). Le 1,2,4-triazole a été incorporé dans une large variété des médicaments intéressants sur le plan thérapeutique (Prasad et al., 2009), telles que les anti-inflammatoires, les antitumorales, les antifongiques, les antivirales, les anticonvulsants, les antidépresseurs, Les médicaments antituberculeux ... « Figure 4 ».



Figure 4 : Activités pharmacologiques des dérivés de 1,2,4-triazoles (Shneine et Alaraji., 2014).

### 4.2.1. 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 des dérivés triazoliques sont connus pour présenter une activité anticancéreuse (Khatak et Vema., 2014). Ils possèdent un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses.

### 4.2.2. 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, fluconazole, voriconazole, itraconazole et posaconazole « figure 5 » sont indiqués en première ligne dans les traitements préventifs et/ou curatifs des infections fongiques invasives (Scodavolpe., et al ; 2014).

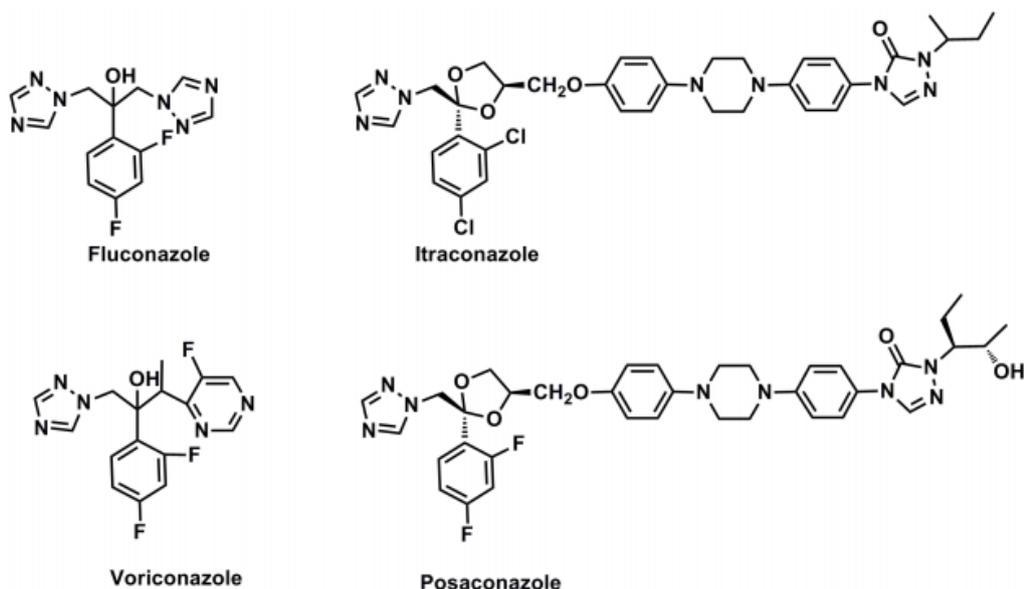


Figure 5 : Agents antifongiques triazole utilisés en thérapie clinique.

#### 4.2.3. 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 (Prasad et al., 2009). 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 - [(3- (4-substitué-phénoxy-méthyl) -5-benzylsulfonyl) -1,2,4-triazol-4-yl] méthyl] -morpholine et tous les composés du titre ont montré bonne activité antibactérienne (Shneine et Alaraji., 2014).

#### 4.2.4. 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). 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).

#### 4.2.5. Activités anti-convulsivantes

Les anticonvulsivants sont des médicaments qui évitent ou diminuent la gravité et le taux de convulsions dans différents 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-1-yl) éthanone (**Karakurt et al., 2006**).

#### **4.2.6. Activités antioxydantes**

Les dérivés de 4-amino-5-phényl-4h-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.

### **4.3. Applications industrielles**

Les fongicides triazoliques sont utilisés dans les produits de préservation du bois, les textiles, le cuir, les adhésifs, les agents antisalissures et les peintures (**Lv et al ; 2016**). Certains systèmes de triazole ont une utilisation extensive dans la séparation de l'argent des autres cations métalliques dans les systèmes à membrane liquide (**Izatt et al., 1988**). Certains d'autres ont la capacité d'inhiber la formation de brouillard dans les émulsions photographiques (**Yoshioka et al., 2014**). Le triazole a été utilisé également comme indicateur acide-base car il montre un changement de couleur réversible et transparent (**Shneine et Alaraji., 2014**).

## **5. La toxicocinétique des 1,2,4-triazoles**

La toxicocinétique de triazole représente son absorption, sa distribution, son métabolisme, et son excrétion.

### **5.1. Absorption**

Le 1,2,4-triazole est rapidement et extensivement absorbé par voie orale (**Anses ., 2011**). Chez l'animal, l'absorption de l'aminotriazole (ou 3-amino-1,2,4-triazole) par voie orale est quasi complète (75-95%)(**CCTV., 2012**). La biodisponibilité de myclobutanil« un fongicide systémique qui fait partie des 1,2,4-triazoles » atteint 100 % en 96 heures chez le rat (**Jargot et al., 2016**).

## **5.2. Distribution**

Le 1,2,4-triazole est largement distribué dans l'organisme (Anses., 2011). Le myclobutanil et l'aminotriazole sont rapidement et largement distribué dans l'organisme, principalement dans le foie (Jargot et al.,2016; CCTV.,2012).

## **5.3. Métabolisme**

Le myclobutanil est largement métabolisé, de faibles quantités de myclobutanil sous forme inchangée sont retrouvées dans les urines et les fèces après administration par voie orale chez le rat. Le myclobutanil ne se clive pas et la voie de biotransformation majeure consiste en une oxydation de la chaîne latérale butyl (Jargot et al.,2016).

## **5.4. Elimination**

Le 1,2,4-triazole s'accumule pas et est éliminé rapidement, essentiellement dans les urines sous forme inchangée (Anses 2011). L'élimination de l'aminotriazole est presque totale chez l'animal (90%) dans les 24 premières heures, principalement dans les urines mais aussi via les fèces (CCTV., 2012 ; inrs.,2016). Chez le rat 96 heures après l'administration d'une faible dose ( 1 mg/kg) ou d'une forte dose ( 100 mg/kg) , plus de 80 % de la dose administrée est excrétée : 35-48 % dans les urines et 31-44 % dans les fèces (Jargot et al.,2016).

## **6. Les effets toxiques des triazole**

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).

### **6.1. 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 cérébelleuses, convulsions et tremblements chez le rat et la souris) et du système nerveux périphérique

(dégénérescence des nerfs périphériques chez le rat)(Anses., 2011). Le triadimefon augmente l'activité locomotrice et stéréotypée (Reeves et al., 2003).

### **6.2. 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).

### **6.3. 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 et une augmentation des corps jaunes chez le rat. 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 cérébelleuses). Le 1,2,4-triazole induit une toxicité pour le développement du rat et du lapin (Anses., 2011).

Certaines études chez les rats ont associé l'exposition au flutriafol à la diminution du poids corporel (Santana et al., 2009).

### **6.4. Effets hépatiques**

Le myclobutanil pourraient perturber les fonctions biologiques régulées par les récepteurs nucléaires hépatiques ( dont CAR « Constitutive Androstane Receptor » et PXR « Pregnane X Receptor » ) incluant l'altération de l'expression de 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'hypertrophieaprès l'exposition au flutriafol (Santana et al., 2009). L'exposition au triadimefon peut également provoquer de multiples effets toxiques chez les mammifères (Xi et al., 2012).

**6.5. 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**).

**6.6. Effets tératogène**

Il existe des preuves montrant que le triadimefon peut interférer avec l'embryogenèse (**Xi et al., 2012**).

**6.7. Effets cancérogènes**

L'exposition au triadimefon peut provoquer des effets cancérogènes. L'aminotriazole induit des tumeurs de la thyroïde chez la souris et le rat (**inrs., 2006**).

*CHAPITRE II*  
*LE STATUT*  
*OXYDATIF*

## Le stress oxydatif

### 1. Le paradoxe de l'oxygène

L'oxygène « ou dioxygène, O<sub>2</sub> » est un gaz indispensable à la vie (Gardès-Albert., 2004), mais il est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives « EOR » (Haleng et al., 2007).

### 2. Définition

Le stress oxydatif ou stress oxydant correspond à un déséquilibre au sein d'un individu entre les systèmes pro-oxydants « les radicaux libres » et les systèmes de défense antioxydants « Figure 6 ». Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense (Morena et al., 2002). Il conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (kabouche., 2010).



Figure 6 : Définition du stress oxydant (Morena et al., 2002).

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des EOR (Koechlin-Ramonatxo., 2006). Il se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, et non pas dans tout l'organisme (Favier., 2003). Les conséquences du stress oxydant se traduisent par des réponses inflammatoires et de la toxicité (Guerby et al., 2015).

### **3. Origine du stress oxydant**

La rupture de l'homéostasie redox peut avoir plusieurs origines (**Migdal et al., 2011**) :

Stress d'origine exogène « agents environnementaux pro-oxydants ».

Intoxication aux métaux lourds.

Irradiations.

Défaillance nutritionnelle ou carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments (**Favier., 2003**).

### **4. Les radicaux libres**

Un radical libre « RL » est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés « célibataires » sur leur couche périphérique. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (**Asmus et al., 2000**). Du fait de leur instabilité, les RL ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants (**Koechlin-Ramonatxo., 2006**).

Les radicaux libres provenant principalement du métabolisme de l'oxygène et de l'azote (**Barouki., 2006**). La production contrôlée de radicaux apparaît comme un mécanisme essentiel de la signalisation cellulaire qui participe au maintien de l'homéostasie de la cellule (**Migdal et al., 2011**). Ces oxydants peuvent endommager la membrane cellulaire ou les molécules intracellulaires (en particulier l'ADN) s'ils ne sont pas efficacement éliminés par les mécanismes de défense antioxydants de la cellule (**CHU et al., 2010**).

#### **4.1. Les cibles des RL**

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**).

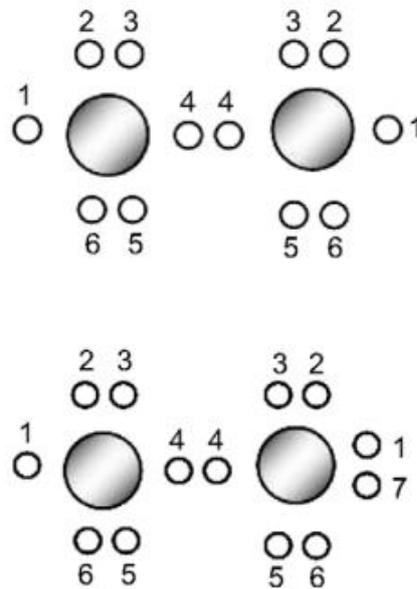


Figure 7 : L'O<sub>2</sub>, à l'origine des radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo., 2006).

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

#### 4.2. Espèces oxygénés réactives « EOR, ROS »

Les ROS sont des molécules simples issues du métabolisme de l'oxygène, produites physiologiquement dans tous les organismes aérobies (Guerby et al., 2015). Ils sont considérés comme potentiellement toxiques car ils ont la capacité d'endommager différents composants cellulaires vitaux, et de conduire à la mort des cellules par stress oxydatif (Ré et al., 2005).

Les EOR regroupent non seulement des radicaux libres telles que l'anion superoxyde « O<sub>2</sub><sup>•-</sup> » ou le radical hydroxyle « °OH » mais également des dérivés non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène « H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> » (Haliwell., 1989). Ces derniers sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier., 2003). C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène est préféré à celui de radicaux libres (J. GOUDABLE et al., 1997). Notre mode de vie, mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOR dans notre organisme (Haleng et al., 2007).

#### 4.2.1. Rôles physiologiques des EOR

Le rôle des EOR est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration« Figure 8 » (Haleng et al., 2007).

Leurs effets physiologiques ne s'observent que lorsqu'il existe un équilibre entre ces substances et les antioxydants (Koechlin-Ramonatxo., 2006).

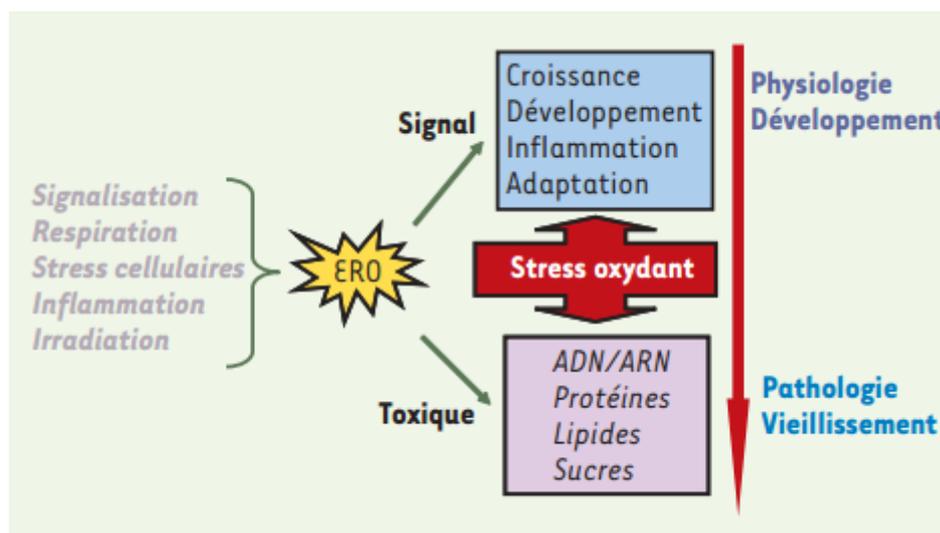


Figure 8 : La double vie des ERO (Barouki., 2006).

Les EOR participent à de nombreuses fonctions : phagocytose, bactéricidie, signalisation cellulaire (Ji., 2001 ; Barouki et al., 2001). Elles participent au fonctionnement de certaines enzymes, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule (Favier., 2003). Elles régulent également de nombreux facteurs de transcription qui activent des gènes dits « protecteurs » pour la cellule (Powers et al., 2001 , Macnee et al., 1999). Les EOR sont donc des acteurs majeurs de la régulation métabolique et cellulaire de l'organisme (Migdal., 2011).

#### 4.2.2. Origines et destinée des EOR

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

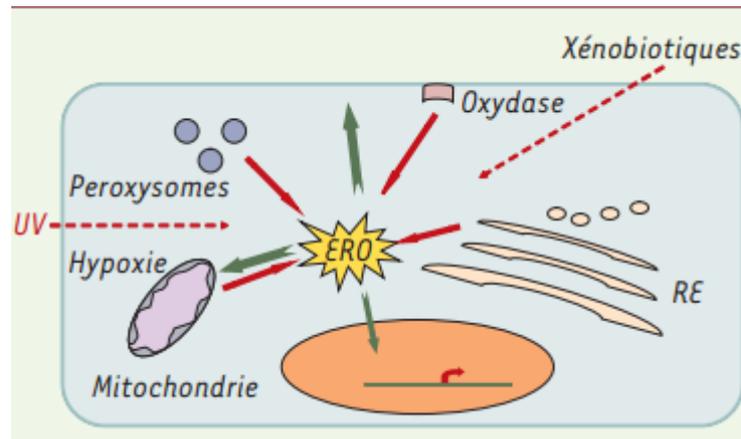


Figure9 : Origines et actions des ERO (Barouki., 2006).

À l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants le dioxygène est indispensable à la production d'énergie (Migdal et al., 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 al., 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., 2002). 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 de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Favier., 2003).

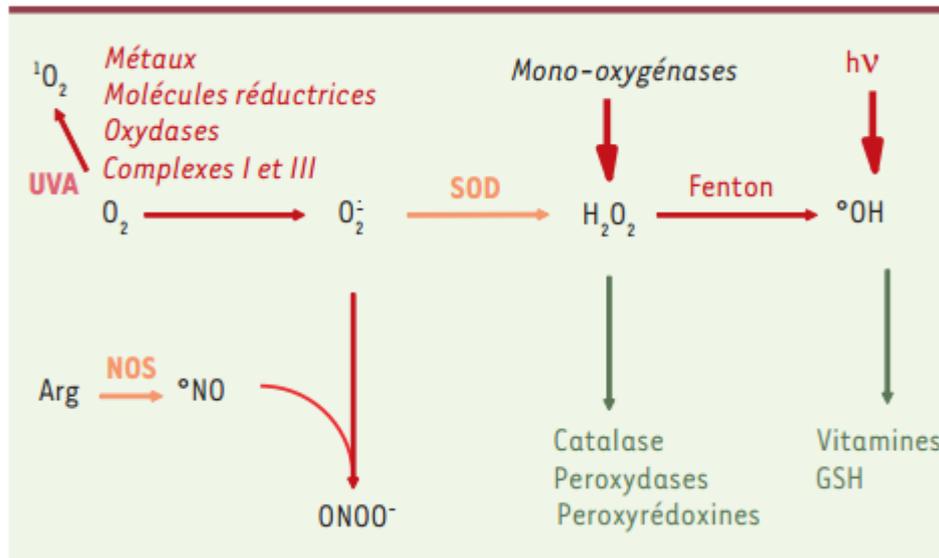
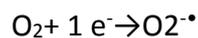


Figure 10: Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (Barouki., 2006).

#### 4.2.3. Le radical superoxyde « O<sub>2</sub><sup>•-</sup> »

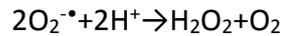
En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes (Barouki., 2006). Environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (Gardès-Albert et al., 2003). Il capte un électron, il est donc converti en radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, selon la réaction suivante :



Le radical superoxyde est peu réactif, il ne traverse pas les membranes cellulaires (Ré et al., 2005). Cependant, l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est capable de produire d'autres radicaux beaucoup plus réactifs, il s'agit de toxicité indirecte (Migdal., 2011). Il représente un précurseur de toutes les autres EOR à l'exception de l'oxygène singulet (Laguerre., 2008). Il est produit principalement par les cellules phagocytaires « neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophile », et il participe à l'inactivation des virus et bactéries (Nohl., 1994).

#### 4.2.4. Le peroxyde d'hydrogène « l'eau oxygéné, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> »

Le peroxyde d'hydrogène peut résulter de l'action dismutasique des superoxydes dismutases « SOD » sur deux radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Laguerre., 2008). Selon la réaction suivante catalysée par la SOD :



C'est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement l'intérieur et l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires (**Goudable et al., 1997**). L'eau oxygénée peut subir des réactions de détoxication catalysées par la catalase, la glutathion peroxydase ou les peroxyrédoxines (**Barouki., 2006**).

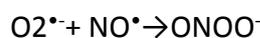
#### 4.2.5. Le radical hydroxyle « OH<sup>•</sup> »

Le radical hydroxyle est le plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant (**Migdal., 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 (**Cord., 1993**). Ceci est en présence de métaux, en particulier de fer Fe<sup>2+</sup> (**Barouki., 2006**).



La génération de radicaux HO<sup>•</sup> est un évènement crucial puisque ces radicaux sont les plus réactifs actuellement connus et qu'ils ne semblent pas pouvoir être détoxifiés par voie enzymatique (**Laguerre., 2008**). Le radical hydroxyle, ne peut être mis en évidence dans les milieux biologiques que par ses produits d'oxydation, car son temps de demi-vie est excessivement court, de l'ordre de la nanoseconde (**Pasquier., 1995**).

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 peroxyde de nitrite, composé extrêmement réactif et toxique, le NO et peroxyde de nitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés (**Barouki., 2006**).



## 5. Les défenses antioxydantes

### 5.1. Définition des antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des EOA, 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 ROS (Guerby et al., 2015).

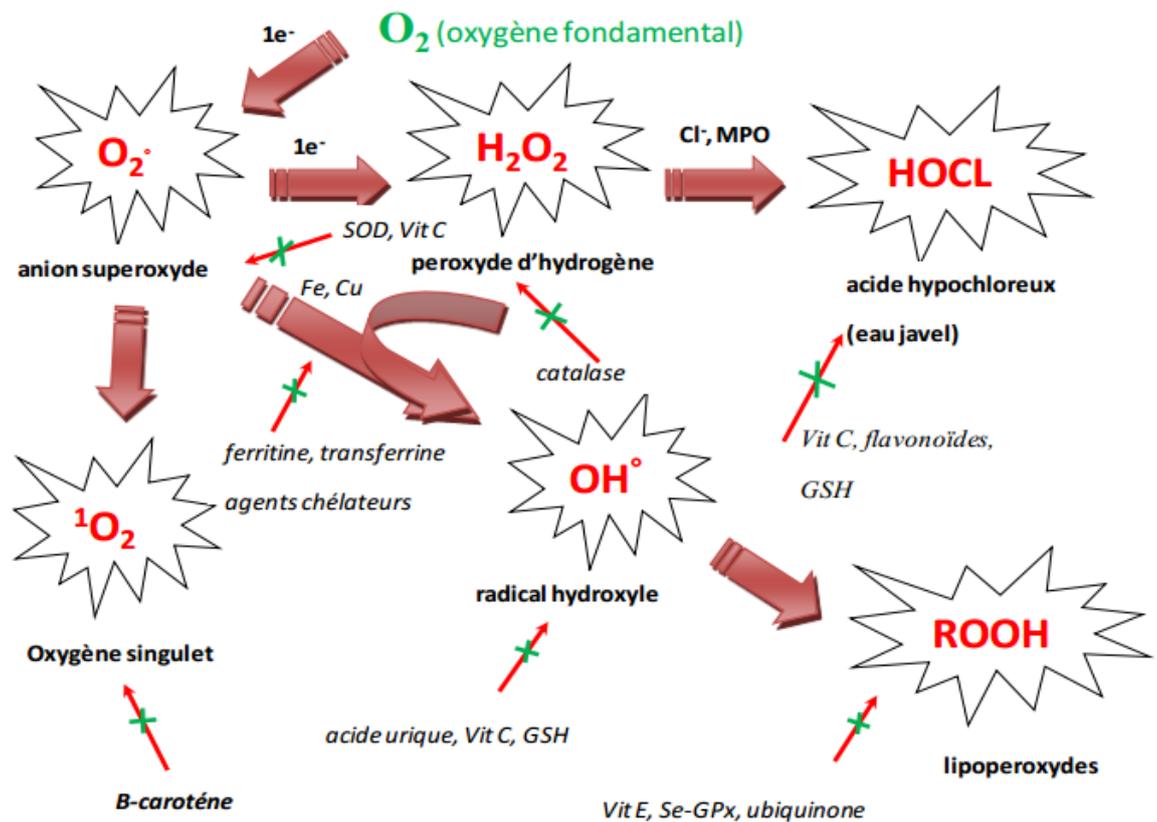


Figure11 : Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al., 2007).

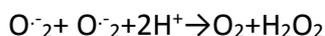
Le système de défense est constitué d'un endogène et d'un autre exogène. Le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs dont l'action est de neutraliser les EOR par leur transformation en molécules stables et non réactives, l'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de RL » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (**Koechlin-Ramonatxo., 2006**).

## 5.2. 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**).

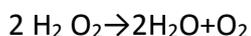
### 5.2.1. Les super oxydes dismutase (SOD)

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en OH<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup> (**Cord et al., 1988**). Selon la réaction suivante :



### 5.2.2. La catalase

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont quantitativement moins efficaces que le système suivant : les glutathion peroxydases (**Goudable et al., 1997**).



### 5.2.3. Les glutathions peroxydases (GPX)

Les GSHPX réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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).

### 5.3. Le système antioxydant non enzymatique

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<sup>2+</sup> et ainsi limiter leur participation à la génération d'ERO par les réactions de type Fenton (Migdal., 2011).

#### 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 (Kinsky., 1989). Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (Favier., 2003).

## 6. Conséquences biochimiques du stress oxydant

Lors d'un stress oxydant, les EOR non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules (Koechlin-Ramonatxo., 2006).

### 6. 1. La peroxydation lipidique

Le radical hydroxyle peut réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique (Gardès-Albert et al., 2004). Ce radical capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical dièneconjugué, oxydé en radical peroxyde (Favier., 2003).

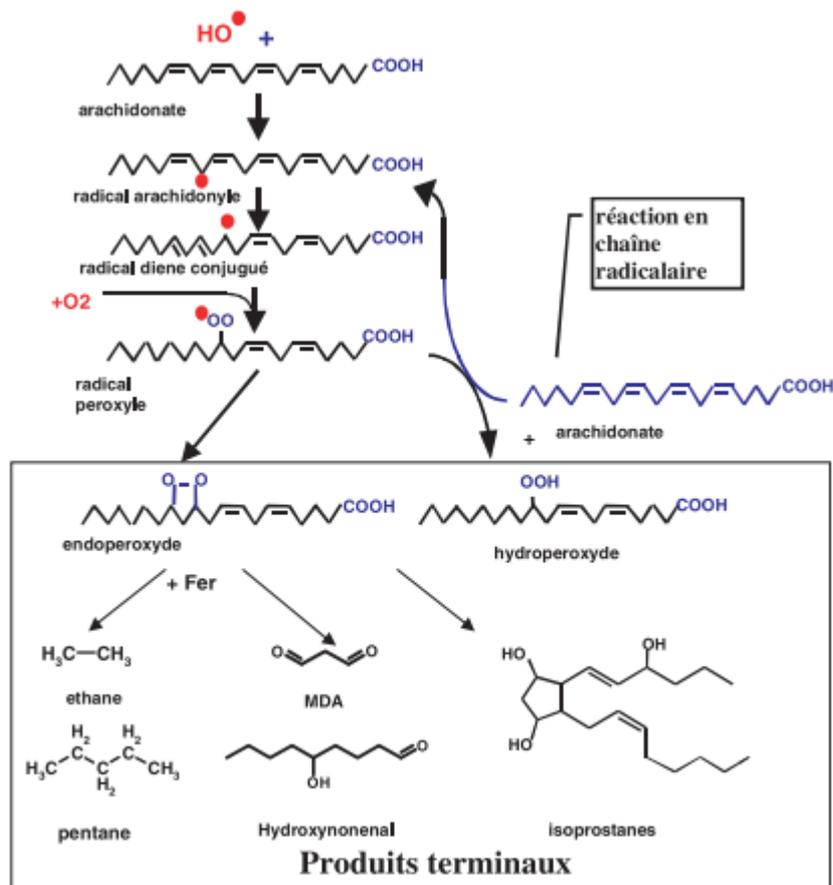


Figure 12 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier., 2003).

## 6.2. L'oxydation des protéines

Les EOR sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction.

## 6.3. L'oxydation des glucides

Le radical  $\text{OH}^\bullet$  est capable de couper les molécules de sucres et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant des épaissements membranaires. La cataracte diabétique serait une conséquence de cette liaison (Pasquier., 1995).

## 6.4. L'oxydation de l'ADN

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR (Koechlin-Ramonatxo., 2006). Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas

«réparées» entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (**Hartmann et al., 2000**). La guanine, par exemple, peut réagir avec  $\text{OH}\bullet$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (**Haleng et al., 2007**).

# *Matériels et méthodes*

## Matériel et méthodes

### I. L'objectif

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet du 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol (5-PTT) suite à une exposition aigue et subchronique sur des jeunes rats Wistar selon une approche biochimique et à travers l'étude du statut oxydatif au niveau érythrocytaire, hépatique et rénal.

### II. Protocole expérimental

#### 1. Le matériel biologique et conditions d'élevage

Dans ce travail, nous avons utilisé 30 jeunes rats blancs « *Rattus norvegicus* » variété Wistar, âgés d'un mois, ayant un poids de  $60 \pm 65$  g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Les rats sont maintenus dans des conditions favorables d'élevage (au niveau de l'animalerie du département de biologie, faculté des Sciences, Université Dr. Tahar Moulay Saida, Algérie). Ils sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois, une température (20 à 25°C), une photopériode de 12 heures le jour et 12 heures la nuit.



Figure 13 : les rats d'expérimentation

## 2. Synthèse de 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol (5-PTT)

Les hétérocycles 1,2,4-triazoles 3-thiones ont été synthétisés au laboratoire PFE, par l'intermédiaire hydrazide de l'acide benzoïque (Almasirad et al.,2004; Karthikeyan, 2009 ; Rostom et al.,2003) L'acide benzoïque est subit une estérification par le méthanol absolu en présence d'une quantité catalytique de l'acide H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Le benzoate de méthyle (**1**) obtenu est ensuite traité avec de l'hydrazine hydraté à dans l'éthanol absolu comme solvant ce qui a abouti à la formation de benzohydrazide correspondant (**2**).

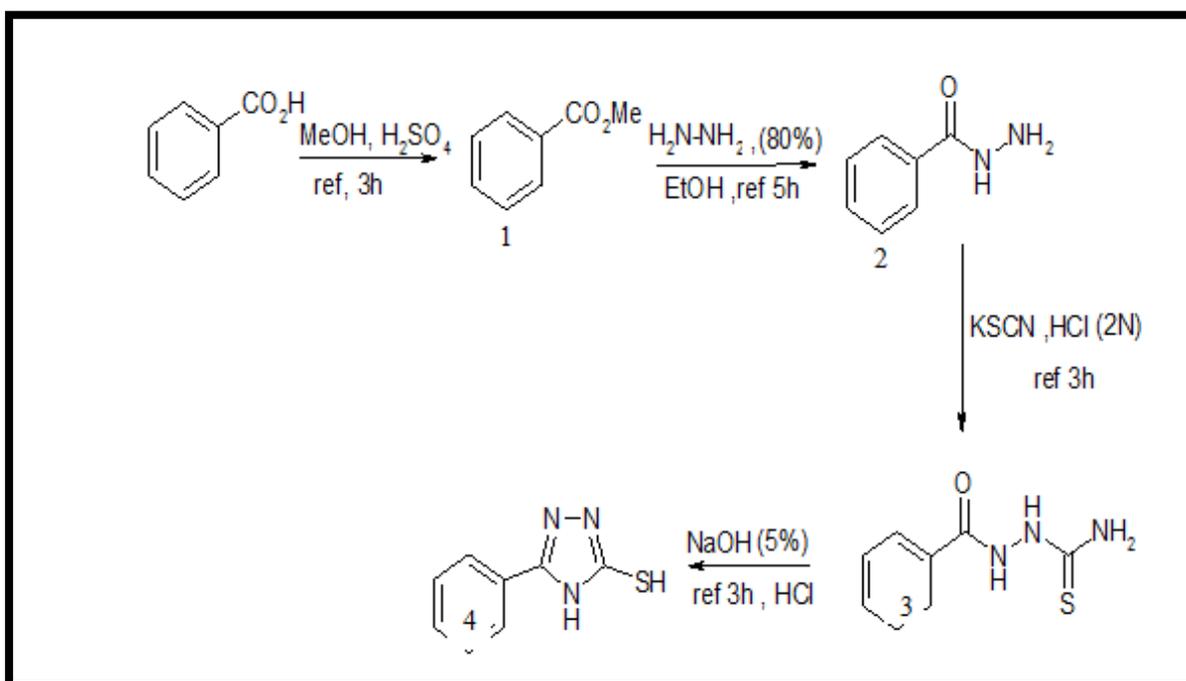


Figure 14 : Schéma représentant les étapes de synthèse de la molécule.

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

### 3. Préparation de la solution injectable

Le 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol se présente dans un état physique solide « des particules blancs », donc il a été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

### 4. Le traitement des rats

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

1/ Une exposition subchronique au 5-PTT a une dose de 10mg/kg durant une période de 30 jours (Palaska et Al., 2002).

2/ Une exposition aigue de 2 jours d'une dose de 200mg/kg (Gannaire et Micillino ., 2005).

### 5. PARTIE I : exposition subchronique

#### 5.1. Répartition des groupes

Après sevrage, les rats sont divisés en deux lots :

- **Lot témoin « T »**: rats injectés par voie intra-péritonéale (IP) avec l'eau physiologique pendant 30 jours (n=6 rats).
- **Lot expérimental « 5-PTT »**: rats traités par 5-PTT avec une dose de (10mg/kg) et cela par une injection intra-péritonéale(IP) pendant 30 jours (n=6 rats).

#### 5.2. Sacrifices et prélèvements sanguins

Après 30 jours de traitement et de 12 heures de jeune les rats sont sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans des tubes héparines pour effectuer les analyses biochimiques.

#### 5.3. Evolution du poids corporel et poids des organes

L'évolution du poids corporel est suivie périodiquement chaque jour tout au long de l'expérimentation (30 jour) ensuite, nous avons procédé au sacrifice de ces rats et le poids du foie et le rein des deux lots a été enregistré.

## 6. Partie II : exposition aigue

### 6.1. Répartition des groupes

Après sevrages les jeunes rats sont répartis en trois lots :

- **Lot témoin « T »** : composé de 6 rats, soumis à deux injections intra-péritonéale (1 injection /jour) de l'eau physiologique à une dose de 200 mg/kg de poids corporel.
- **Lot DMSO** : constitué de jeunes rats dont on injecte le DMSO comme témoin positif par voie intra- péritonéale pendant deux jours à une dose de 200 mg/kg de poids corporel (n=6 rats).
- **Lot expérimental « 5 PTT »**: jeunes rats traités deux jours par injections intra-péritonéale de 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thiol à une dose de 200 mg/kg de poids corporel (n=6 rats).

### 6.2. Sacrifices et prélèvements du sang et organes

Après les deux jours de traitement les trois groupes sont sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans des tubes secs étiquetés, puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 minutes pour récupérer le culot contenant les érythrocytes.

Après la dissection, le foie, le rein, sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (Na Cl) à 0.9 %.

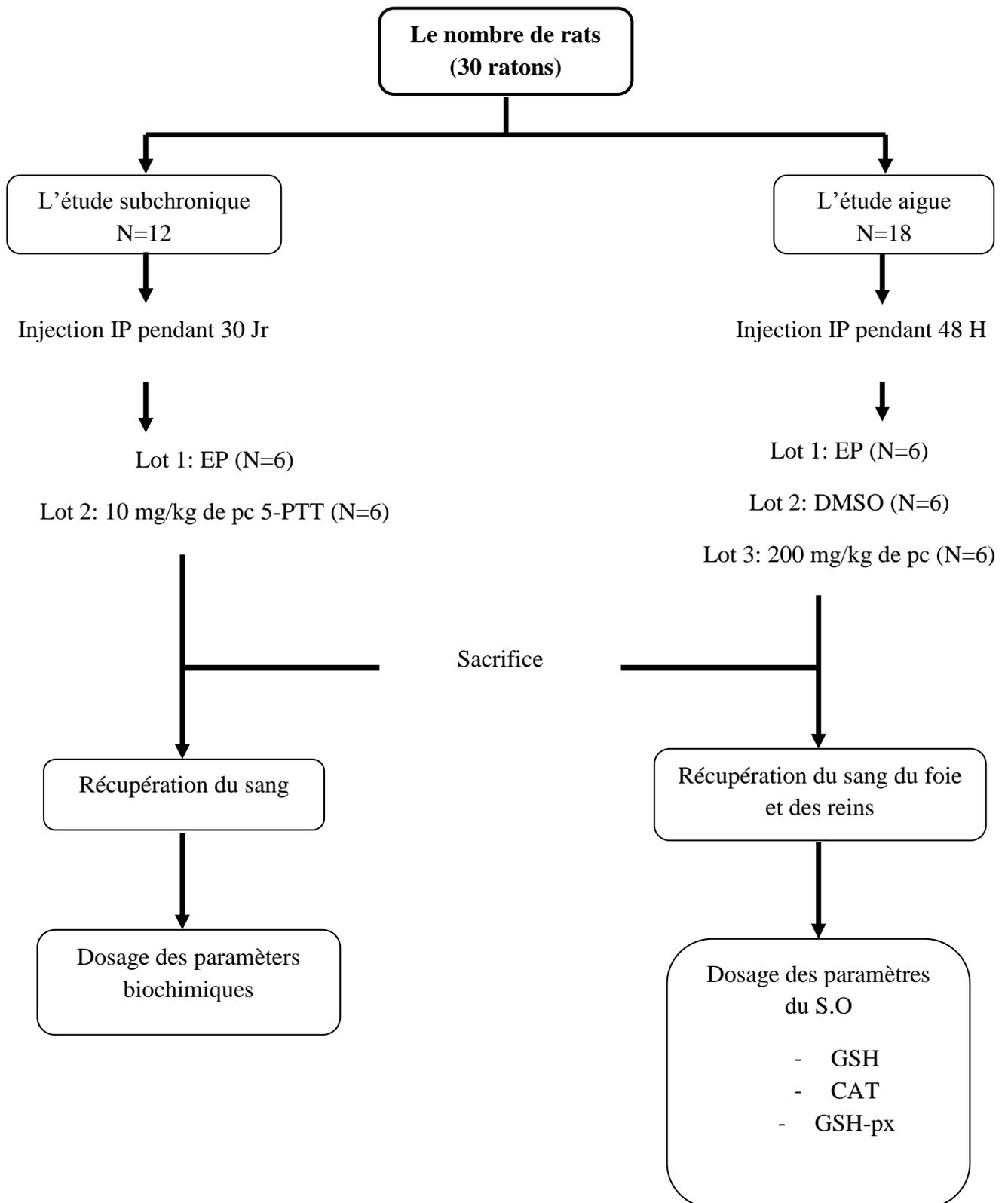


Figure 15 : Schéma récapitulatif du *protocole expérimental*.

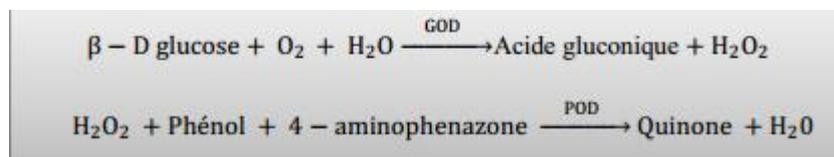
## 7. Techniques de dosage biochimiques

### 7.1. 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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 :

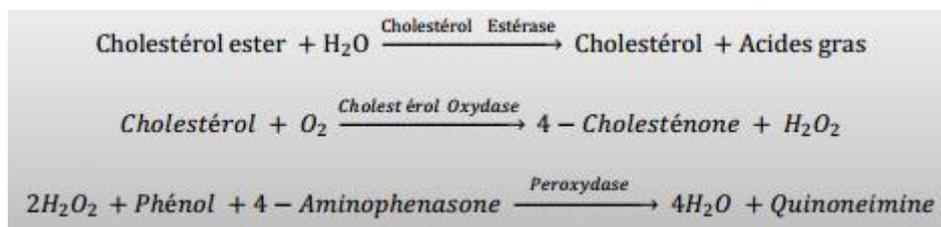


Le lecteur de l'absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

### 7.2. 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 :

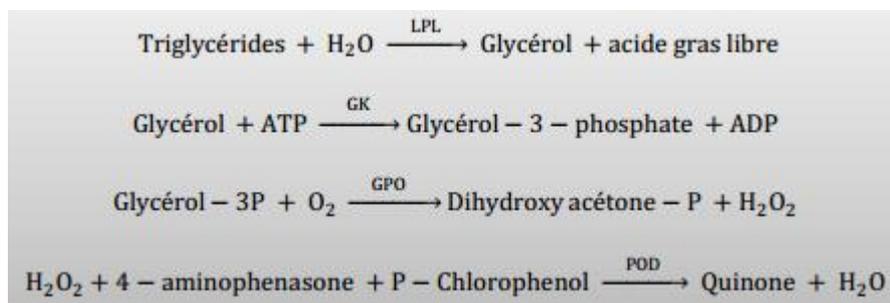


L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Naito, 1984).

### 7.3. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce dernier forme avec le 4-aminophénol et le p-chlorophénol en présence de peroxydase un complexe rouge, selon les quatre réactions suivantes:

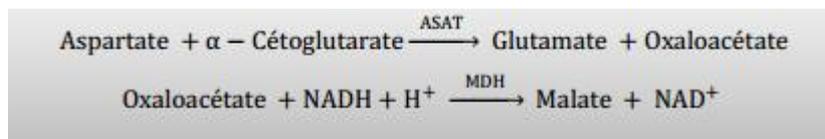


L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans les échantillons (Kaplan et al., 1984).

### 7.4. 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  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup> (Murray, 1984).

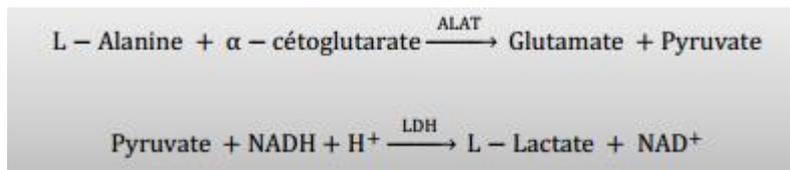


### 7.5. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP)

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

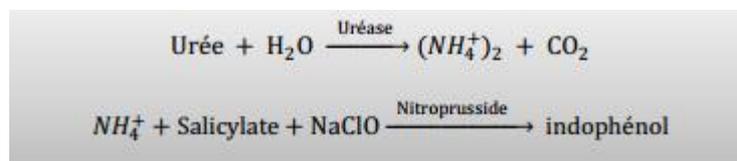
La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (Murray, 1984).

Le principe est présenté selon la réaction suivante :



### 7.6. Dosage d'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique à l'uréase selon la fiche technique (Spinréact). L'urée est hydrolysée enzymatiquement à l'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ) et le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les ions ammoniacaux ainsi formés réagissent avec du salicylate et l'hypochlorite ( $\text{NaClO}$ ), 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).

### 7.7. 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).

## 8. Dosage des paramètres du stress oxydant

### 8.1. 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) et voila sa composition :

Solution de lavage (pH=7.4)	-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	-1.36g.
	-Na CL.	-9g.
	-Eau distillée	-1Litre.

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 cette foie, qui contient le lysat des érythrocytes à utiliser dans les dosages.

Maintenant pour les organes, on ajoute 2ml de TBS et on fait l'homogénéisation à l'aide d'un broyeur. Après le broyage, on fait une centrifugation à 9000trs/min pendant 15 min et on récupère le surnageant qui contient l'homogénat des organes.

N.B : Si vous n'avez pas au labo une ultracentrifugeuse (pour 9000trs/min), vous pouvez faire4500trs/min pendant 30min.

### 8.2. 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.

### 8.3. 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 ( $-NH_2$ ) 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 :  $C_4H_{11}NO_3$

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml de réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- Lire à 595 nm les densités optiques 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.

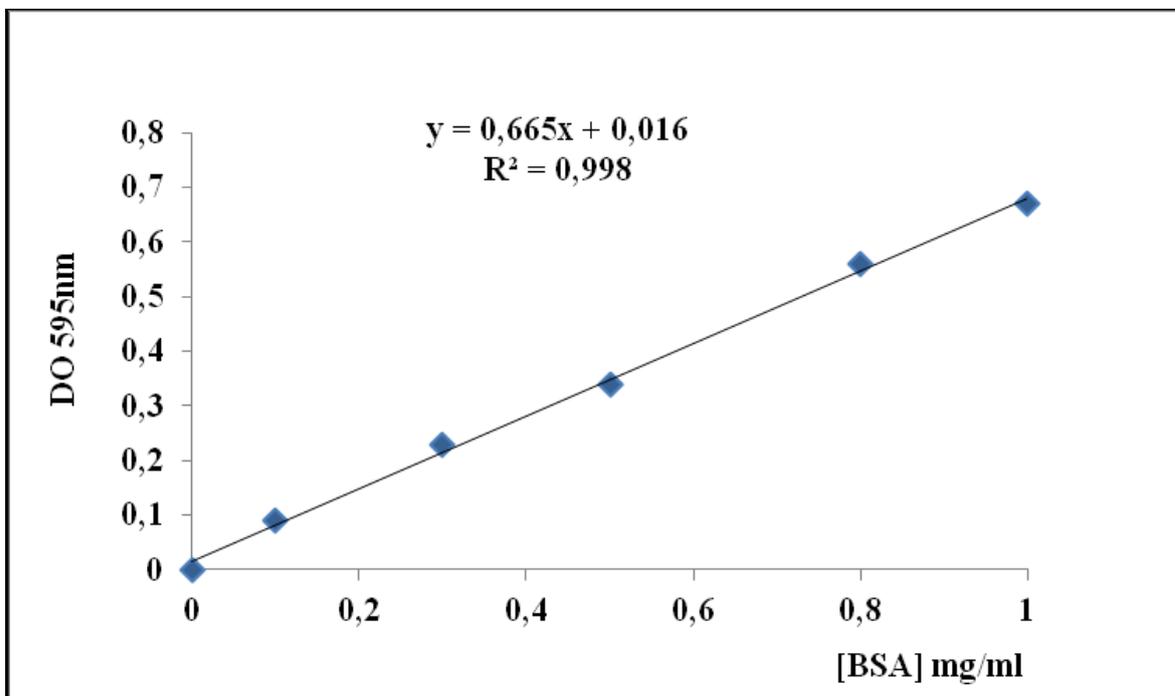


Figure 16 : La courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

#### 8.4. 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-mercaptopurique 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.

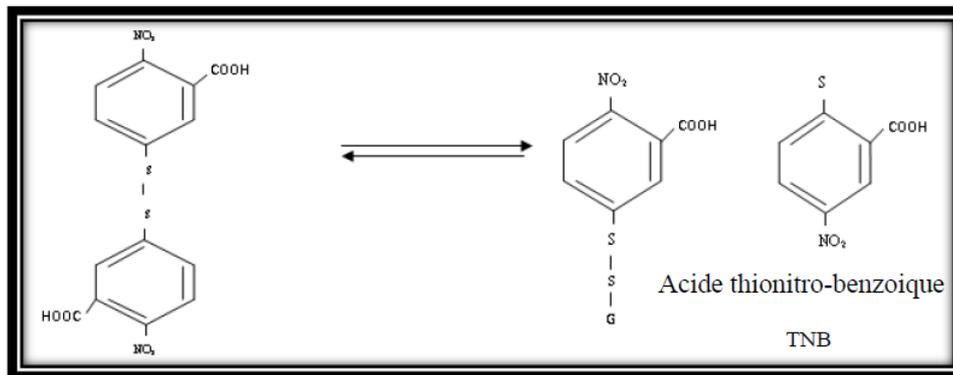


Figure 17 : réaction d'Ellman.

La procédure expérimentale de dosage du glutathion réduit est la suivante

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat ;
- ✓ Ajouter 0.2 ml de solution d'acide salicylique (0.25%) ;
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace ;
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min ;
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- ✓ Ajouter 1 ml de tampon Tris, pH 9.6 ;
- ✓ Mélanger et ajouter 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.

### 8.5. 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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).
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM) ;
- Ajouter 0.2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- Ajouter 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans un bain de glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- Prélever 0.48 ml de surnageant.
- Ajouter 2.2 ml de solution tampon TBS.
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM).
- Mélanger 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 :

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

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

### 8.6. 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'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction suivant :



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

Réactifs	Zéro (μl)	Blanc (μl)	Essai (μl)
-Tampon phosphate (100mM) PH 7.4	1000	800	780
-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (500mM)	-	200	200
-Surnageant	-	-	20

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

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

Avec :

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.

- $\epsilon$  : Coefficient d'extension d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.043mM-1cm-1).
- l : Largeur de la cuve.
- X : Quantité de protéines en mg/ml.
- Fd : Facteur de dilution pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la solution tampon (0.02).

### **9. 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. La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée par une analyse de variance (ANOVA) avec le facteur traitement (Triazole, Solvant).

Une probabilité  $p < 0,05$  est considérée significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Sigma statistique 3,5.

## I. Résultats de l'exposition subchronique

### 1. La croissance pondérale

Nos résultats montrent une diminution significative de poids corporel et une baisse du gain de poids chez le lot traité par le 5 PTT par rapport au groupe témoin, (voir figure 18)

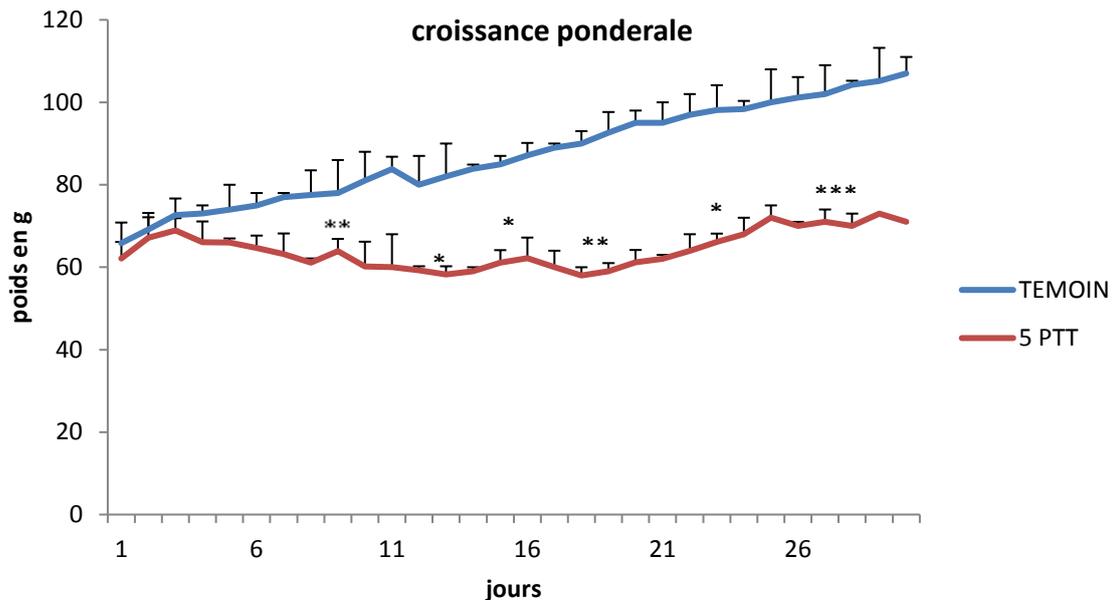


Figure 18 : L'évolution du poids corporel des rats pendant 30 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ). (5-PPT vs témoins)

### 2. Action sur le poids de certains organes (foie et rein)

L'analyse des données révèle une élévation significative ( $p < 0,001$ ) du poids hépatique chez les rats exposés au 5-PTT par rapport à celui des rats témoins. (figure 19)

Tandis que, le poids rénal ne présente aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) entre les sujets exposés au 5 PTT et les sujets témoins. (figure 20)

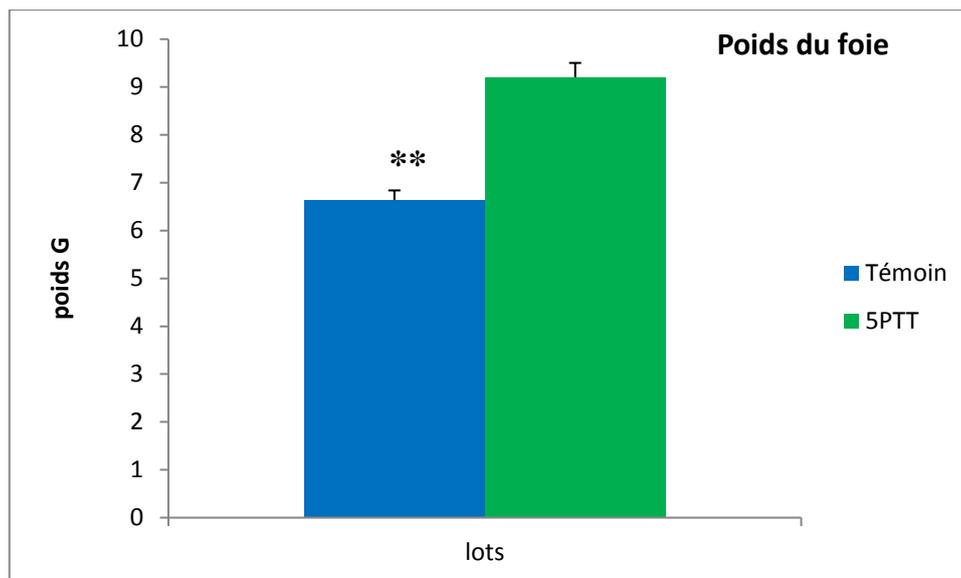


Figure 19: Comparaison du poids de foie entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées à la moyenne  $\pm$  SEM. (\*\*:  $p < 0.01$ ). (5 PPT vs témoins)

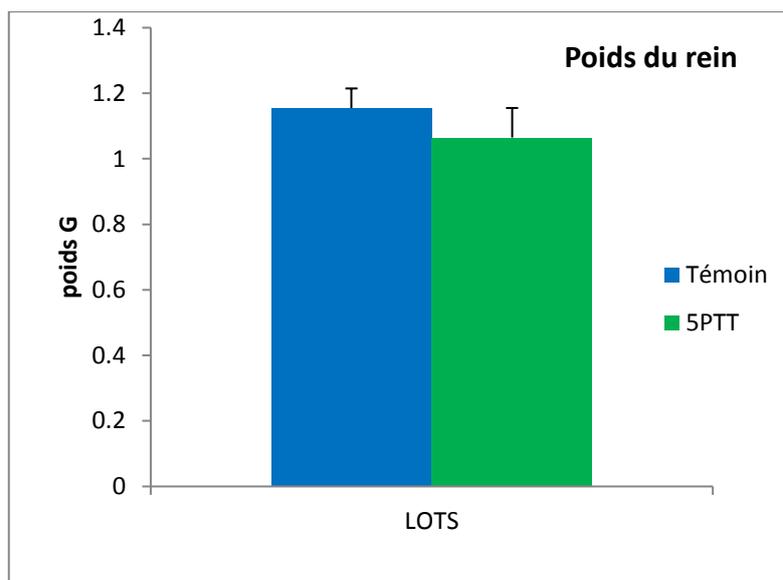


Figure 20 : Comparaison du poids du rein des sujets témoins et des sujets exposés au 5-PPT. Les valeurs sont exprimées au moyenne  $\pm$  SEM. ( $p > 0.05$ ). (5 PPT vs témoins)

### 3. Dosage des paramètres biochimiques

#### 3.1. Action sur la glycémie

Les résultats montrent une élévation très significative ( $p < 0,01$ ) du taux de glucose sanguin chez les sujets exposés au 5 PTT par rapport à celle des sujets témoins (figure 21)

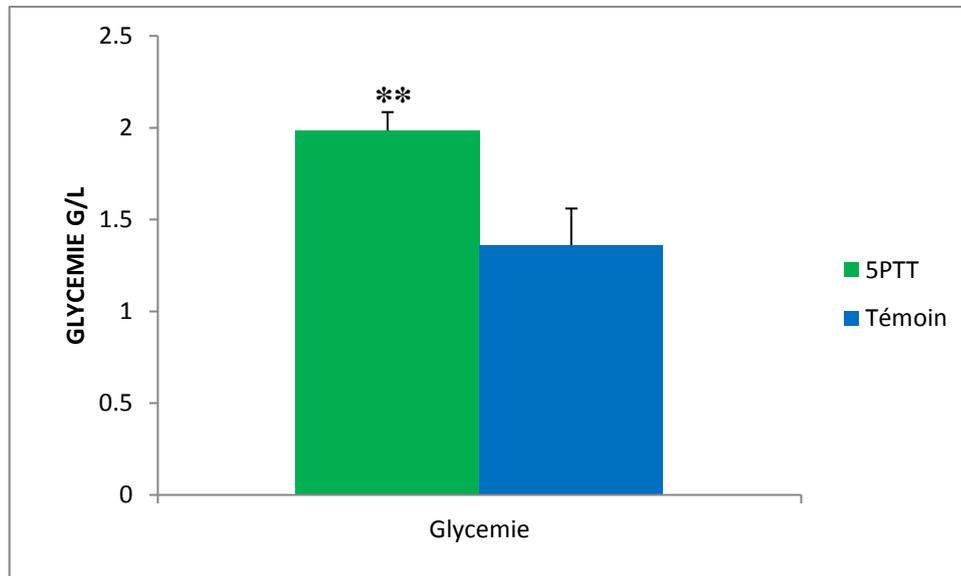


Figure 21: Comparaison entre la glycémie chez les différents rats traités par 5 PTT et les rats témoins (\*\* :  $p < 0,01$ ). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

(5 PPT vs témoins)

#### 3.2. Action sur certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique

##### 3.2.1. Profile lipidique (cholestérol, triglycérides)

L'interprétation des résultats démontre une augmentation très significative ( $p < 0.01$ ) de la concentration sérique de cholestérol et une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration sérique des triglycérides des rats traités par le 5 PTT par rapport au rats témoins (voir figures : 22 et 23 )

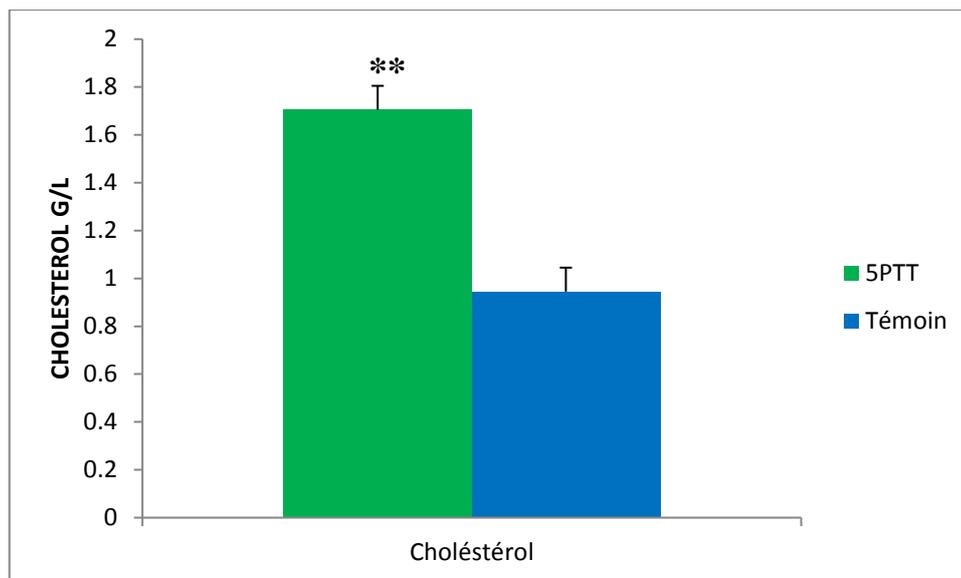


Figure 22: Comparaison du taux de cholestérol entre les rats traités par 5 PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées au moyenne  $\pm$ SEM (\*\*:  $p < 0.01$ ). (5 PPT vs témoins)

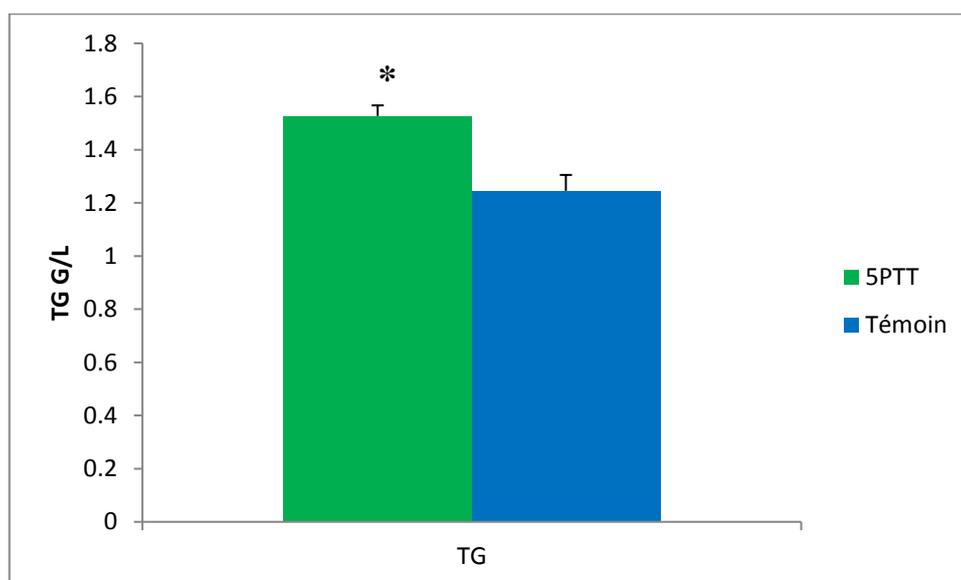


Figure 23 : Comparaison du taux de triglycérides entre les rats traités par 5PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées à la moyenne  $\pm$  SEM (\*:  $p < 0.05$ ) (5 PPT vs témoins)

### 3.2.2. Activité des transaminases

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

Toutefois, le test ANOVA montre une augmentation hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la teneur sérique en ASAT chez les rats ayant subi une exposition subchronique 5 PTT comparés aux animaux témoins (figure 24, figure 25)

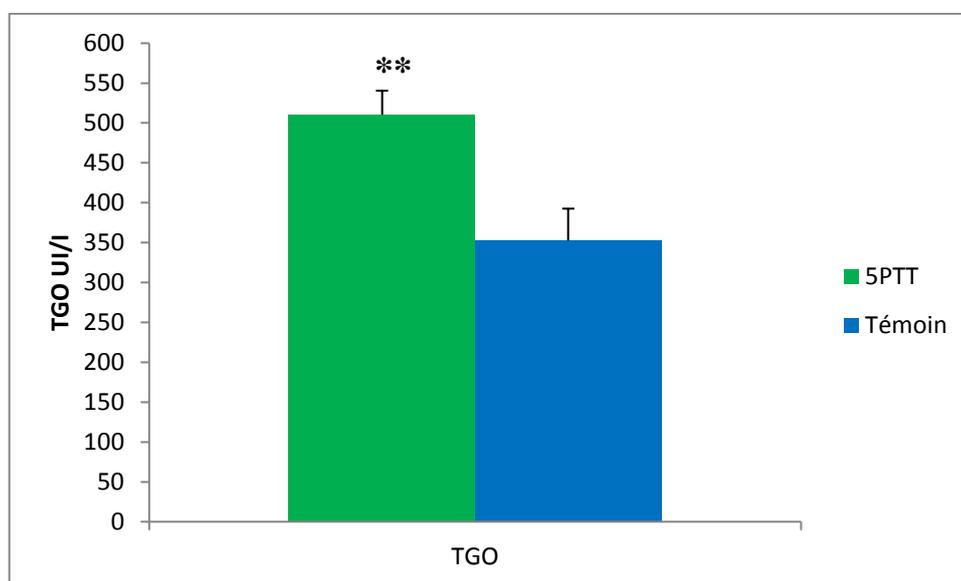


Figure 24 : Comparaison du taux du TGO entre les rats témoins et les rats traités par le 5 PTT, Les valeurs sont exprimées au moyenne  $\pm$  SEM (\*\*:  $p < 0.01$ ). (5 PPT vs témoins)

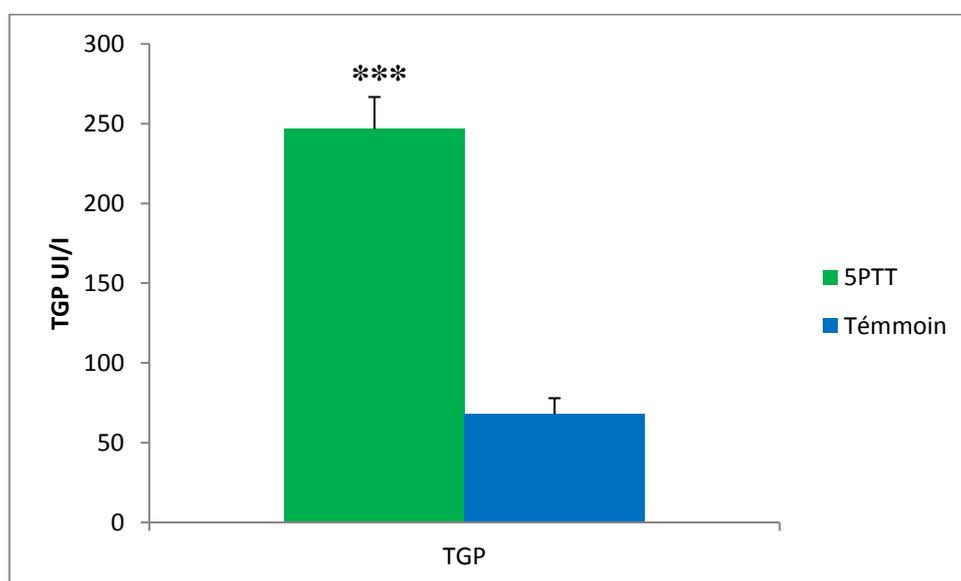


Figure 25: Comparaison du taux du TGP les rats traités par 5 PTT et les rats témoins. Les valeurs sont exprimées au moyenne  $\pm$  SEM (\*\*\*:  $p < 0.001$ ). (5 PPT vs témoins).

### 3.3. 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 (26,27) respectivement.

L'analyse statistique du taux sérique de l'urée et de la créatinine ne présente aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) entre les sujets exposés au 5 PTT et les sujets témoins

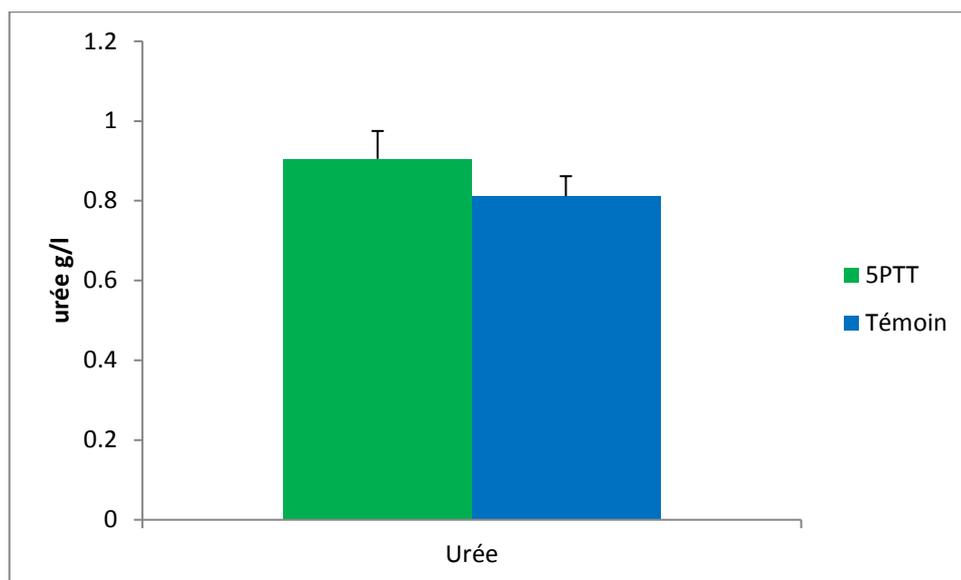


Figure26 : L'effet du 5 PTT sur le taux sérique de l'urée. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. ( $p > 0.05$ ). (5-PTT vs Témoin)

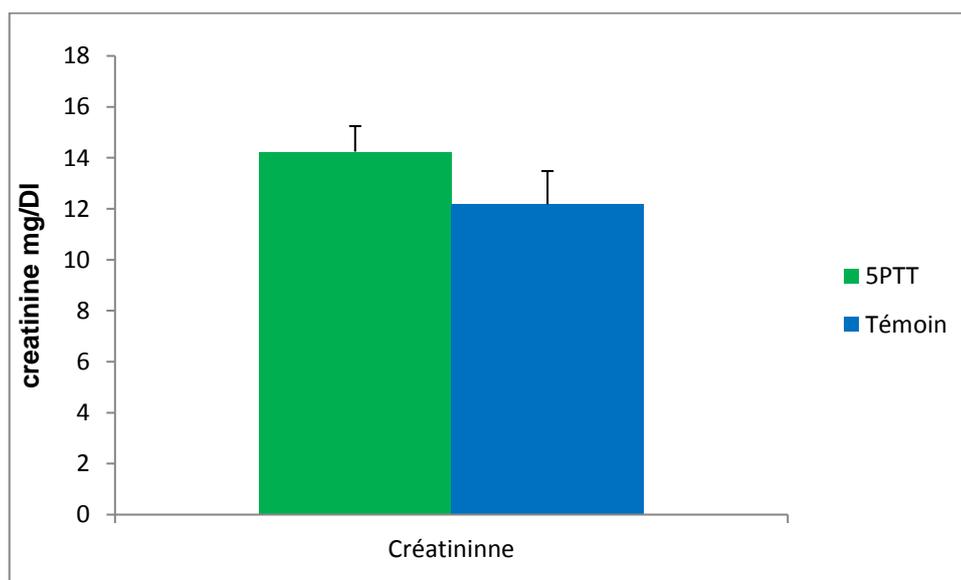


Figure 27: Comparaison du taux de la créatinine entre les rats témoins et les rats exposés au 5 PTT. Les valeurs sont exprimées au moyenne  $\pm$  SEM. ( $p > 0.05$ ). (5-PTT vs Témoin)

## II. Résultats de l'exposition aigue

### 1. Activité des bio-marqueurs du statut oxydant au niveau hépatique, rénal et érythrocytaire

#### 1.1. Glutathion réduit

Le traitement des rats par le 5 PTT entraîne une augmentation significative de la Teneur tissulaire en glutathion réduit (GSH) au niveau érythrocytaire et hépatique ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) (voir les figures 29,30).

En revanche, L'analyse statistique de l'activité de Glutathion réduit dans le rein montre qu'il n'existe pas de Différences significatives chez les trois groupes expérimentaux. (Figure 28).

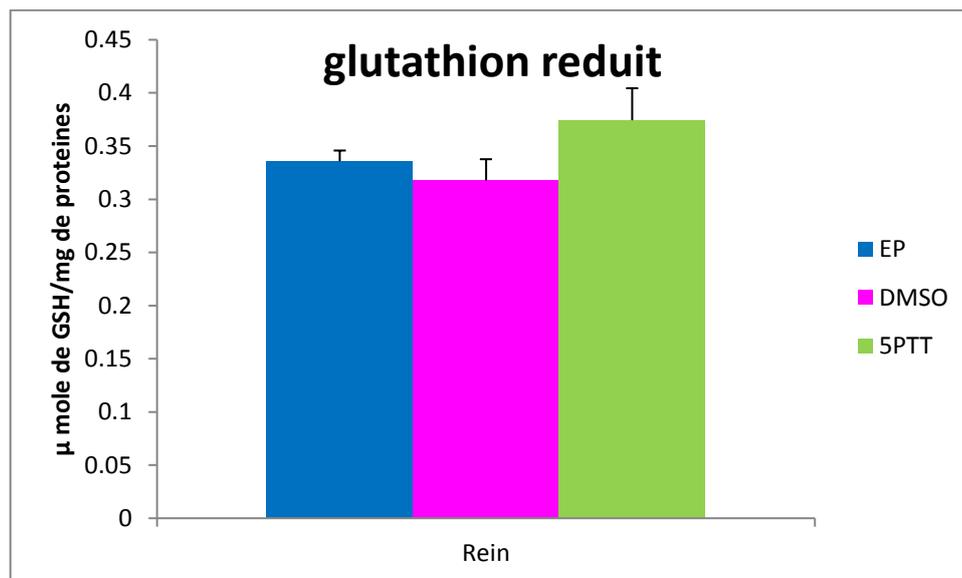


Figure 28 : L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau rénal des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO, Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. ( $p > 0.05$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

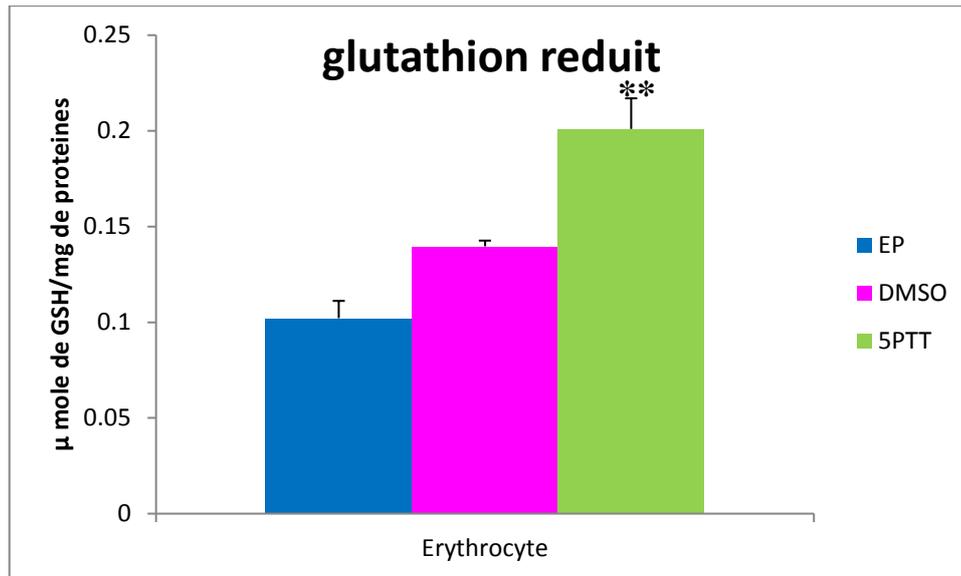


Figure29: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau des érythrocytes des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO, Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. (\*\* :  $p < 0.01$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

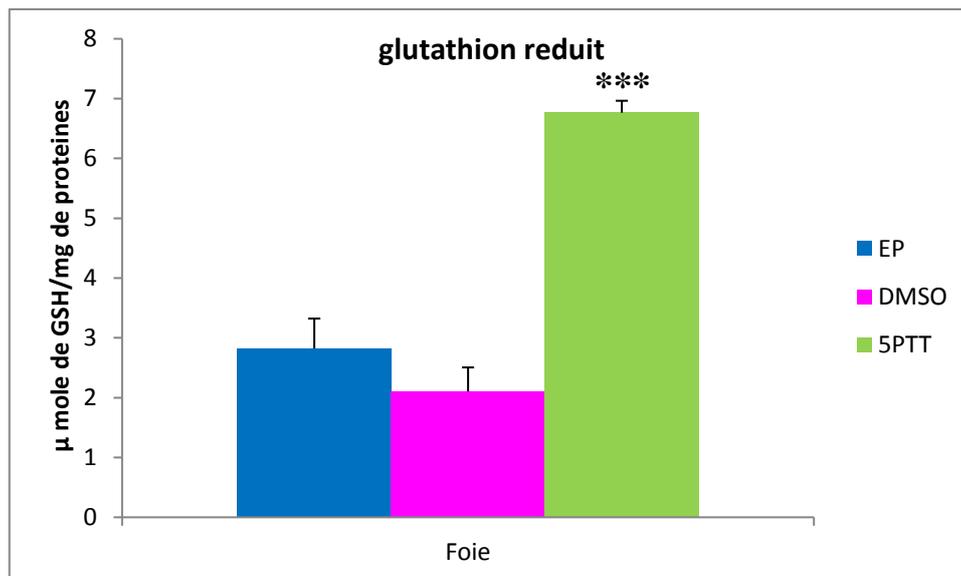


Figure 30: L'effet du 5 PTT sur l'activité enzymatique de la Catalase au niveau du foie des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO, Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. (\*\* :  $p < 0.01$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

## 1.2. Effet sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes tissulaires

### 1.2.1. Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

La variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) au niveau du foie, reins et dans les érythrocytes des rats traités par le 5 PTT et ceux traités par l'eau physiologique et le DMSO sont présentés dans les figures 31, 32, 34.

Le traitement des rats par le 5 PTT provoque une diminution très hautement significative de la glutathion peroxydase (GPx) dans le foie, et dans les érythrocytes ( $p < 0.01$  ;  $p < 0.001$ ) respectivement par rapport aux rats témoins et ceux traités par le DMSO

En revanche, aucune différence significative n'est observée dans le rein des trois groupes expérimentaux.

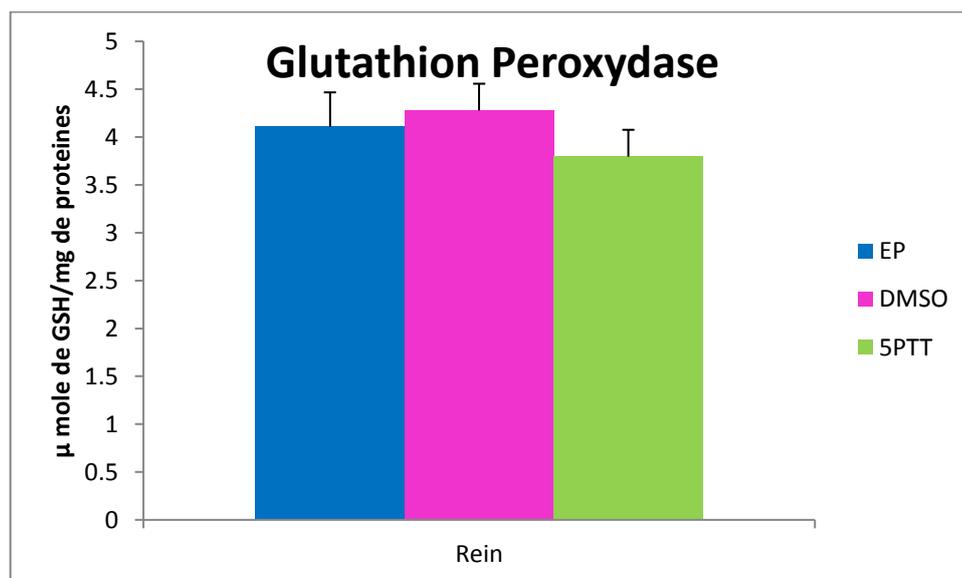


Figure 31 : comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau rénal des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. ( $p > 0.05$ ). (5 PTT vs EP) et (DMSO vs EP).

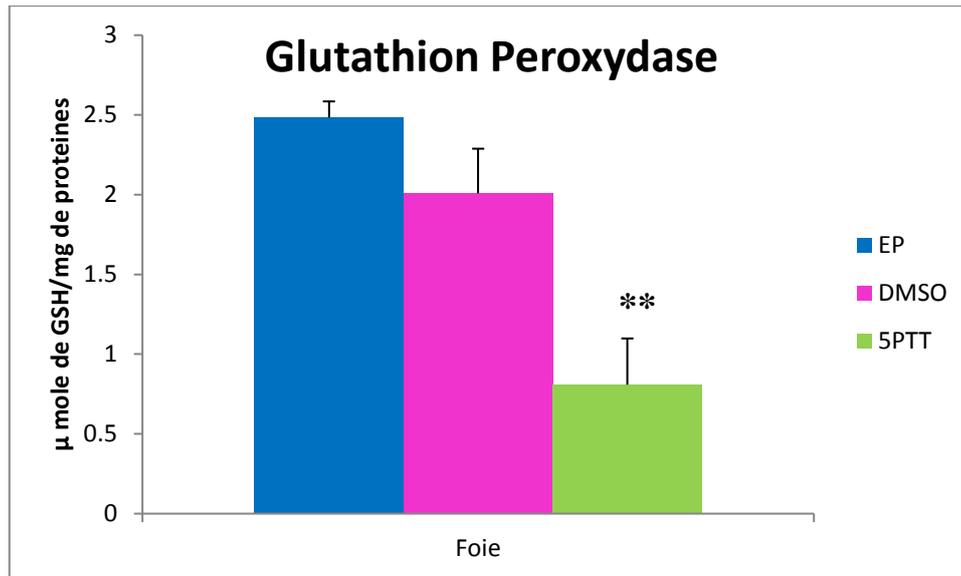


Figure 32 : comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau hépatique des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. (\*\*:  $p < 0.01$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

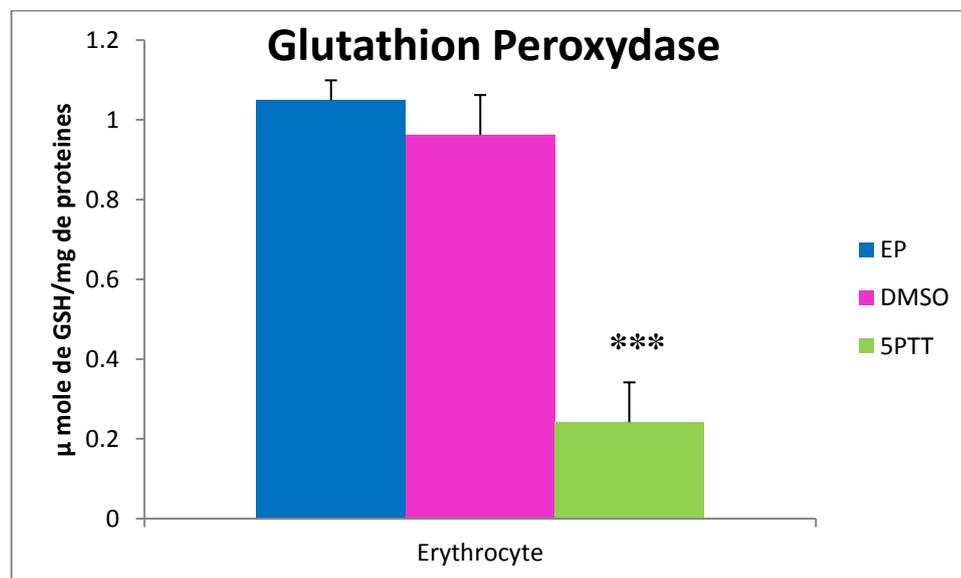


Figure 33: comparaison de l'activité enzymatique de Glutathion peroxydase au niveau érythrocytaire des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. (\*\* \* :  $p < 0.001$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

### 1.2.2. Activité de la catalase (CAT)

Les résultats obtenus montrent que le traitement des rats par le 5 PTT provoque une diminution très significative de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans le foie et les érythrocytes par rapport aux deux groupes témoins cependant aucunes différences significatives dans le rein des trois groupes expérimentaux (voir figure 34, 35, 36).

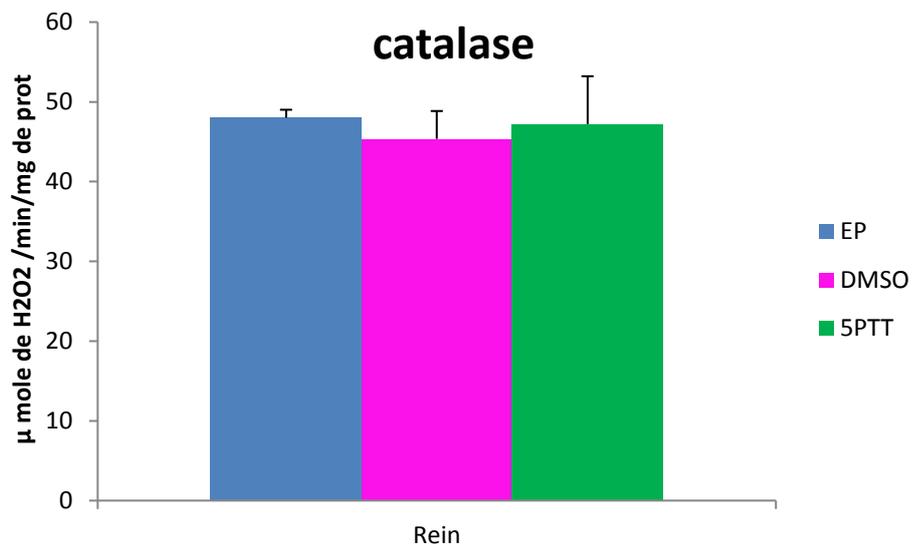


Figure 34 : comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau rénal des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. ( $p > 0.05$ ). (5 PTT vs EP). et (DMSO vs EP).

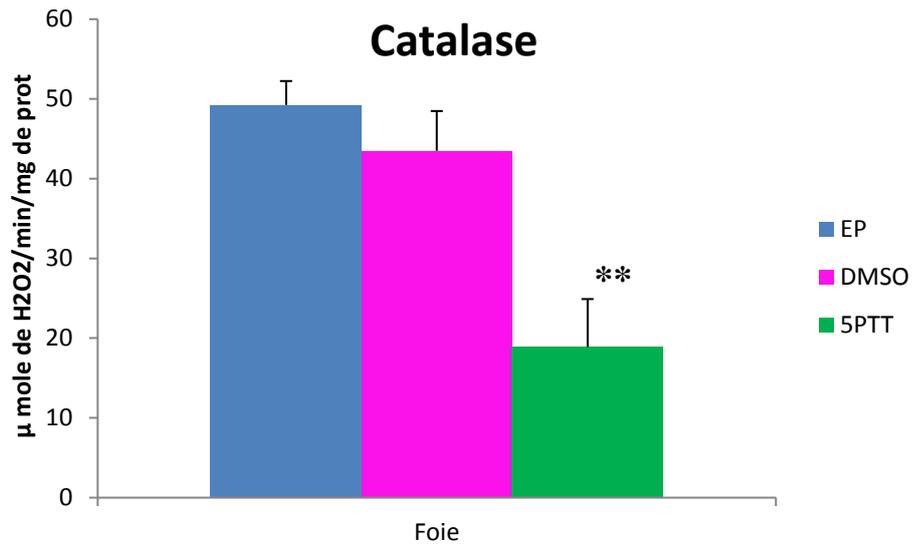


Figure 35: comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau hépatique des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO  
 Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. (\*\*:  $p < 0.01$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

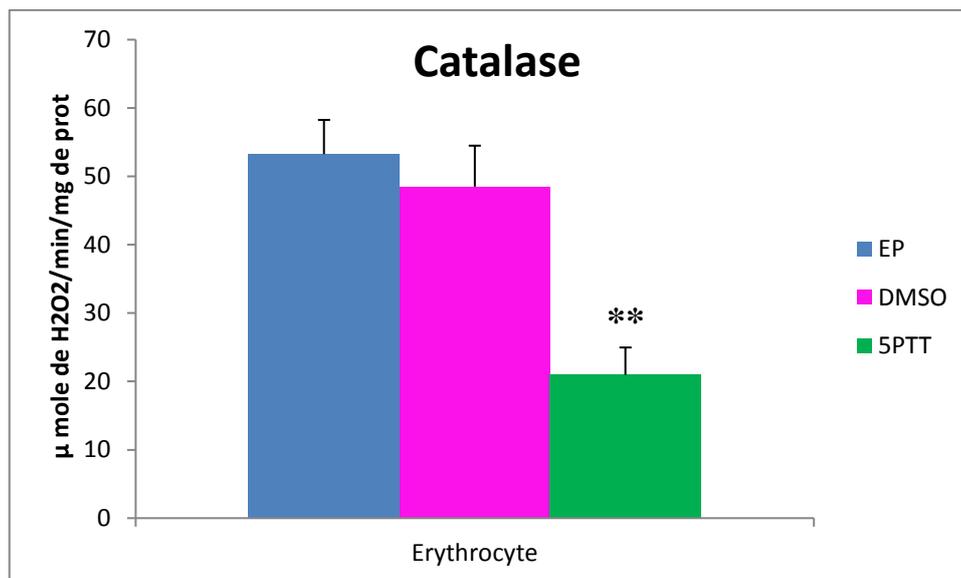


Figure 36 : comparaison de l'activité enzymatique de la catalase au niveau érythrocytaire des rats traités par 5PTT avec les témoins EP, et le DMSO  
 Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. (\*\* :  $p < 0.01$ ). (5 PTT vs EP).et (DMSO vs EP).

# *Discussion*

Les triazoles représentent une classe des composants hétérocycliques qui sont au cours d'étude depuis plusieurs ans (**Gurkirpal et al., 2011**).

Le 1,2,4-triazoles est bien connu pour son large éventail d'activités biologiques (**Kumudha et al., 2014**), il possède un puissant effet antifongique (**Lingappa et al., 2008**). Le mécanisme pharmacologique de ce composant est lié à l'inhibition des enzymes du Cytochrome P450 impliquées dans la formation des membranes fongiques (**Menegola et al., 2006**), il existe d'autres effets biologiques tels que: un antibactérien (**Lingappa et al., 2008 ; Gautam et Chourasia ., 2010**), un antiviral (**Kumar et Rao., 2008**), un anticonvulsivant (**Asif., 2015**), antitumoral (**Kumar et Rao., 2008**), insecticide (**Gautam et Chourasia ., 2010**) et en tant qu'un anticorrosif (**Lebrinie et al., 2007; Ouici et al., 2013**).

Ces produits sont estimés comme des substances chimiques peuvent causer des difficultés pour la santé humaine par une large gamme de propriétés toxicologiques (**Zarn et al., 2003 ; EPA, 2009 ; AFSA, 2007**). Ils modifient le fonctionnement des cellules en troublant de nombreuses voies métaboliques (**Nesnow et al., 2011**).

L'objectif visé dans ce travail de recherche est d'explorer dans une première partie l'effet d'une exposition subchronique d'un dérivé triazolique le 1,2,4 triazole-5 - phenyl - 3 thiol (5 PTT) a une dose de 10mg/kg sur le fonctionnement hépatique et rénal à travers exploration de quelques paramètres biochimiques

Et en deuxièmes partie est d'évaluer la modification du statut oxydant au niveau tissulaire (foie, rein) et érythrocytaire suite à une exposition aigue au 5-PTT a une dose de 200mg/kg

## **Partie 1 : exposition subchronique**

### **1 La croissance pondérale et le poids des organes (foie et rein) :**

Les résultats enregistrés concernant le poids corporel montrent 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 confirme que le 5 PTT à 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 (**Moser et AL., 2001 ; PRD.,**

**2007 ; Anses., 2011** ), qui rapportent que la diminution du poids corporel est liée à la réduction de la prise alimentaire suite à une exposition subchronique au prothioconazole dont le dose est de 1 000 mg/kg /j.

De même, ce résultat obtenu est similaire à celui de **(Martin et al., 2007)** qui présente que certain dérivé triazolique tel que le triadimifon avec une dose de 175mg/kg entraine une baisse de poids corporel qui due 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.

En outre, **(Bonnard et al., 2010)** ont montré que le foie et le rein ont été identifiés comme un organe cible chez les rats après l'exposition à des azoles dérivés du pétrole.

Le foie, principal organe de détoxification, est capable de neutraliser toutes les substances toxiques. Vu son rôle dans la transformation des xénobiotiques environnementaux à savoir le 5-PTT, le foie présente un grand risque de dommages **(Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011)**

Concernant le poids hépatique, nous avons remarqué une augmentation significative du poids chez les rats exposés au 5 PTT par rapport aux rats témoins. Nos données sont en accord avec ceux de **(Martin et al., 2007 ; Allen et al ., 2006 ;Gotez et al., 2007)** qui montrent que l'exposition à certains dérivés triazoliques tel que le myclobutanil avec une dose de 125mg/kg dans une exposition chronique et le propiconazole avec une dose de 500 mg/kg pendant 30 jours induisent une élévation de la prolifération hépatocytaire qui est à l'origine de l'hypertrophie hépatique.

D'autre part, Les données obtenus concernant le poids rénal ne présentent aucune différence significative entre Les rats traités et les rats témoins, et cela se contrarie avec d'autres travaux tels **(Gotez et al., 2007; PRD, 2007 ;Bonnard et al., 2010)** qui ont prouvé que l'exposition au prothiconazole aux doses de (20, 100 et 500 mg/kg/j) durant 8 semaines, induit une élévation significative du poids du rein, en raison d'une hypertrophie

## **2/Bilan biochimique**

L'analyse des résultats obtenus a montré une augmentation significative du taux de glucose sanguin chez le lot exposé au 5 PTT par rapport au lot témoin, Certains travaux

ont montré que l'exposition au triazole provoque un dysfonctionnement du métabolisme énergétique par l'altération de la glycolyse du foie, ce qui conduit à une hyperglycémie (Gillies et al., 2010).

En effet les travaux réalisés par (Rodriguez et Acosta, 1996 ; 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.

Plus encore, de nombreuses perturbations biochimiques induites par le triazole affectent le métabolisme lipidique qui se traduit par le changement de taux de cholestérol et de triglycérides (Wada et al., 2009).

En effet, dans notre étude, le 5 PTT a augmenté significativement les niveaux de cholestérol, et des triglycérides plasmatiques des rats. Cette augmentation de 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 (Yousef et al., et encore de 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 (Patricia et al., 1995 ; Valdiguié, 2000)

En plus, l'élévation observée de concentration en cholestérol dans le sérum, qui est associée à l'augmentation en triglycérides, peut indiquer une possible peroxydation lipidique membranaires (Saoudi et al., 2011)

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.

Par ailleurs, Les données obtenues en terme d'activité enzymatique des ASAT et ALAT ont démontré que l'administration subchronique du 5 PTT est accompagnée par une élévation très significative du taux de ces enzymes cela confirme certaines recherches qui indiquent que des études antérieures, réalisées sur des rats adultes, ont montré que le myclobutanil peut induire l'endommagement du foie par l'élévation des taux sanguins en transaminases (ASAT et ALAT) (EFSA., 2009).

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 conséquent la fuite des enzymes du tissu vers le plasma entraînant ainsi une nécrose et affection hépatique (**Résidus de pesticides dans les aliments, 1985 ; Navarro et al., 1993 ; El-Demerdash et al., 2012**).

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 produit une variété d'effets toxiques rénaux impliquant les cellules tubulaires et glomérulaire (**Mohamed et al., 2003**).

L'urée et la créatinine sanguines des animaux d'expérience sont parmi les paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Fingo, 1997**).

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 influencé sur le taux sériques de l'urée et créatinine. Ces résultats s'accordent avec d'autres études de (**Somchit et al., 2012**) qui ont montré que l'exposition à différentes doses (0, 10, 50 et 100 mg/kg/j ) et pendant 14 jours au voriconazole n'entraîne aucun effet sur le taux sérique de l'urée et créatinine.

Certains travaux ont montré que l'exposition au triazole provoque un dysfonctionnement du métabolisme énergétique par l'altération de la glycogénolyse du foie, ce qui conduit à une hyperglycémie (**Gillies et al., 2008**). En outre, d'autres études ont confirmé que l'exposition au propiconazole à 1250 ppm (157,6 mg / kg) crée un effet stressant dans l'hyperglycémie sous l'action des hormones (**Nesnow et al., 2011**).

Plus encore, de nombreuses perturbations biochimiques induites par le triazole affectent le métabolisme lipidique qui se traduit par le changement de taux de cholestérol et de triglycérides (**Wada et al., 2009**). De plus, l'hypocholestérolémie peut être due à une réduction de la synthèse du cholestérol ou à une augmentation de son élimination chez les rats exposés sous l'effet triazole (**Nesnow et al., 2009**).

En outre, **Bonnard et al., 2010** ont montré que le foie et le rein ont été identifiés comme un organe cible chez les rats après l'exposition à des azoles dérivés du pétrole. Les effets

observés sont; Augmentation du poids corporel accompagnée de changements histologiques, avec inflammation (**Bonnard et al., 2010**).

## **Partie 2 : exposition aigue**

### **Activité des enzymes du statut oxydant au niveau hépatique, rénal et érythrocytaire**

Pendant ces deux décennies, la recherche toxicologique s'est concentrée sur l'induction du stress oxydant (SO) après exposition aux pesticides comme mécanisme possible de la toxicité. En fait, le SO est le résultat des processus de multi-étapes causant par un déséquilibre dans la balance entre les oxydants/ prooxydants et les antioxydants (enzymatique et non enzymatique) et menant aux dommages tissulaires conduisant en premier lieu à de nombreuses maladies et finalement à l'apoptose (**Agrawal et Sharma, 2010**).

Plusieurs recherches chez des animaux d'expérience ont rapporté que le SO joue un rôle important dans la toxicité de divers pesticides, y compris des organophosphates (OP) (**Possamai et al., 2007**), des N-méthyle carbamates (NMC) (**Mansour et al., 2009**).

En plus, les études épidémiologiques chez l'homme après exposition de long terme à un mélange des pesticides (OPs, PYRs synthétiques et NMC) ont montré la stimulation des enzymes antioxydantes et l'induction de la peroxydation lipidique dans les érythrocytes (**Ogut et al., 2011**).

### **Le glutathion peroxydase (GPx) :**

La GPx est une enzyme clé qui règle le niveau des ROS (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) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par l'arsenic (**Wang et al., 1997 ; Jing et al., 1999**).

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré une diminution très significative de la concentration du glutathion peroxydase au niveau hépatique et érythrocytaire chez les rats traités par le 5 PTT par rapport à ceux traités par EP et DMSO

La diminution des taux de GPx chez les rats traités par le 5 PTT a clairement suggéré son utilisation accrue par les cellules hépatiques et érythrocytaire qui pourrait être le résultat

de la réduction de la synthèse ou de le renforcement de la dégradation de GSx par l'augmentation de stress oxydant D'après (Jia et al., 2009).

En plus, l'élévation de l'activité enzymatique est afin de contrecarrer le stress oxydant induit par le 5 PTT une manière d'adaptation par l'organisme (Garg et al., 2009).

Le taux élevé de superoxyde et des radicaux libres, convertissent le GSH soit en glutathion oxydé ou en H<sub>2</sub>S, ce qui provoque la diminution de taux hépatique du glutathion.

Les érythrocytes humaines déficientes en GPx sont fortement susceptibles aux métabolites peroxidative des drogues ou des xénobiotiques et sont également enclins à l'hémolyse induite par les peroxydes (Garg et al., 2009). Ces observations suggèrent que la GPx soit essentiel pour l'intégrité de la membrane érythrocytaires (Garg et al., 2008 ; 2009).

#### **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 (Maritim et al., 2003). 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 and Saravanan, 2013).

Dans notre travail, nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique de la catalase suite à l'exposition des rats au 5 PTT par rapport au deux autres groupes expérimentaux.

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (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) sur l'activité enzymatique de la CAT dans différents organes et tissus chez les animaux d'expérience (El-Khawaga, 2005 ; Garg et al., 2008 ; 2009a ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; El-Demerdash et al., 2012).

Ainsi, l'augmentation du stress oxydant et des dommages cellulaires, provoqués par le traitement avec le 5 PTT étaient évidents par les perturbations dans les activités enzymatiques de GPx et CAT dans le foie, reins et érythrocytes des rats.

### Activités non enzymatique de système antioxydant :

#### Le glutathion réduit :

GSH est un puissant antioxydant, important pour la protection cellulaire, la désintoxication des ROS, la conjugaison et l'excrétion des molécules toxiques (**Brown et al., 2004**).

Etant donné que le groupement thiol représente le groupement majoritaire au niveau intracellulaire du glutathion réduit (**Fang et al., 2002**).

Nous avons remarqué après le traitement des rats par le 5-PTT une augmentation significative de taux de glutathion hépatique et érythrocytaire.

En effet cette augmentation peut être expliquée par la disponibilité du groupement thiol exogène présent dans la molécule de 5PTT qui a compensé les pertes du glutathion utilisé pour neutraliser les radicaux libres intra ou extracellulaires par leur propriété comme donneur d'électrons (**Bendich., 1990**).

Par ailleurs, aucune augmentation significative n'est observée au niveau du taux de glutathion réduit pour les rats traités par le 5-PTT par rapport aux rats témoins traités par EP et ceux traités par le DMSO.

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 de GSH dans les organes, foie, reins et dans les érythrocytes des rats. **EL-Khawaga,( Garg et al., 2008 ; 2009 ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; 2012 ; EL-Khawaga, 2012 ; EL-Demerdash et al., 2013)**.

# *Conclusion*

L'intérêt de cette étude est d'évaluer l'intoxication subchronique et aigue du 5-PTT suite à une approche biochimique et une étude du statut oxydatif au niveau érythrocytaire, hépatique et rénal.

En premier lieu les résultats obtenus après une exposition subchronique au 5-PTT par voie intra-péritonéale durant 30 jours à une dose de 10 mg/kg ont indiqué une diminution significative de la croissance pondérale et une augmentation significative du poids hépatique chez les rats traités par le 5-PTT par rapport aux rats témoins, par contre au niveau rénal aucune modification n'a été observée.

Les analyses biochimiques des paramètres relatifs au fonctionnement hépatique ont révélé une augmentation significative du taux de la glycémie, des triglycérides, de cholestérol et d'activité des transaminases « TGO-TGP », chez les rats exposés au 5-PTT par rapport aux rats témoins.

Tandis qu'aucune augmentation significative n'a été enregistrée pour la fonction rénale (urée et créatinine) chez les sujets traités au 5-PTT par rapport aux témoins.

En second lieu nous avons noté que l'exposition aigue au 5-PTT à une dose de 200mg/kg deux fois pendant 48H est à l'origine de :

- L'apparition d'un état de stress oxydant démontré par une diminution significative de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px) et de l'activité du catalase au niveau hépatique et érythrocytaire chez les rats traités par le 5-PTT par rapport au rat témoin.
- Une augmentation significative du taux de glutathion réduit due à la disponibilité du groupement thiol dans la molécule de 5-PTT.
- Aucune variation significative des paramètres étudiés de stress n'est observée au niveau rénal.

En conclusion, Le 5-PTT a été défini comme substance toxique, qui peut causer des troubles pour la santé humaine par une large gamme de propriété toxicologique. Surtout au niveau hépatique, sa toxicité au niveau rénal est peu évidente chez le rat ne présente aucune altération tissulaire.

En termes de perspectives, il serait envisageable d'entreprendre un ensemble de protocole expérimentaux plus approfondi portant sur différents volets :

- Effectuer une étude immuno-histochimique des cellules hépatiques et rénales.
- Doser d'autres bio-marqueurs « comme superoxyde dismutase, le glutathion réductase... ».
- Etudier le mode d'action de 5-PTT.
- Chercher une thérapie naturelle contre l'effet toxique de 5-PTT.
- Doser des protéines sérique et urinaire par électrophorèse.

*Références  
bibliographique*

- 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.
- 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.
- 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.
- 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)
- 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.

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

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

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

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

**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.

**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.

**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.

**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.

**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.

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

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

**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

**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):336-53.

**I. Tumosiene, Z. J. Beresnevicus, Monatsh** (2009), *Chem.*, 140, 1523–1528.

**IB. 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.

**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

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

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

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

**J. Xi, Z. Yangc , C. Zenga , X. Hub and J. Wang** (2012), Suppressive effect of triadimefon, a triazole fungicide, on spatial learning and reference memory in rats, *Behavioural Pharmacology* , Vol 23 No 8, DOI: 10.1097/FBP.0b013e32835a7c63.

**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.

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

**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.

**Koechlin-Ramonatxo.C** (2006) Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants 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 pharmaceuticals 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. 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

**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.

**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.

**M. Morena, 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. Wujec, M. Pitucha, M. Dobosz, U. Kosikowska, A. Malm** (2004) *Acta Pharm* 54:251.

**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 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*.

**Mazat JP, Ransac S**(2010), Le complexe bc<sub>1</sub> 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.

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

**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.

**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.

**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. 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.

**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.

**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.

- 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. 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.
- 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.
- 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.
- Torres SJ, Nowson CA.** (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*. 23(11):887-94.
- 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. Macnee, I. Rahman** (1999), Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J RespirCrit 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.

**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.

**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.

**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.