

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr. Moulay Tahar -Saïda
Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme: master en biologie
Spécialité: biochimie et physiologie cellulaire

Thème

Évaluation de l'effet d'une exposition subchronique au 5-phenyl-1, 2,4-triazole-3-thiol (khacinothionyl) chez des jeunes rats wistar. Etude neurocomportementale et histologique

Présenter par :

Melle : Benbrahim Amel

Melle : Boukhecheba Amina

Soutenu le:15 /06/2015 devant la commission de jury composée Par:

Mr : Hachem. K	Maitre de conférences B. U. de Saïda	Président
Mr: Adli. D	Maitre Assistant A. U. de Saïda	Examineur
Mr : Halla .N	Maitre Assistant A. U. de Saïda	Examineur
Dr: Kahloula. K	Maitre de conférences A. U. de Saïda	Promoteur
Mme : Hadjadj .H	Maitre Assistante A. U. de Saïda	Co. Encadreur

Année Universitaire : 2014/2015

Résumé :

Notre travail a porté sur l'impact de l'exposition subchronique à un dérivé triazolique khacinothionyl

à une dose de 10 mg/kg sur les fonctions neurocomportementales et certains paramètres sériques chez des jeunes rats wistar .

L'exposition subchronique au khacinothionyl, a permis d'enregistrer une diminution significative du poids corporel ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) et une baisse significative ($p < 0,001$) du poids de cerveau des rats Traités comparés à rats témoins.

Par ailleurs, l'évaluation de l'anxiété par le test de labyrinthe en croix surélevé concernant le nombre des bras ouverts ainsi que le temps passé dans les bras ouverts indiquent une diminution significative, à déceler que l'exposition subchronique au khacinothionyl provoque un état anxieux ($p < 0,001$), chez les sujets exposés comparés aux sujets témoins.

Cependant, les analyses sériques des animaux exposés au khacinothionyl, montrent une diminution significative du taux de glucose sanguin ($p < 0,01$) .Comparés aux animaux témoins

Toutefois, les résultats enregistrés pour le test de l'open Field révèlent une diminution significative dans le nombre des carreaux traversés ($p < 0,001$), et le nombre de redressement ($p < 0,001$), pour le comportement stéréotypé ne présente aucune différence significative ($p > 0,05$).

Cependant l'exposition des rats à une dose de 10 mg/kg au khacinothionyl, a indiqué à travers le test de labyrinthe en Y, test relatif à la mémoire de travail un pourcentage d'alternance spontanée (SPA) est significativement élevé ($p < 0,01$) par rapport aux animaux témoins.

Afin de réaliser ces tests neurocomportementaux, nous avons fini notre travail par une étude histopathologique de cerveau ceci montre que l'exposition au khacinothionyl entraîne un Agencement palissadique périvasculaire des oligodendrocytes. Au fort grossissement on note la présence des cellules hyper chromatiques chez les sujets traités par rapport aux témoins.

En conclusion, l'exposition subchronique au khacinothionyl, entraîne des modifications d'ordre comportementales qui reflètent l'action délétère de ce composé sur le système nerveux.

Mots clés : 5(phenyl)-1, 2,4 triazole-3 thione, activité locomotrice, anxiété, système nerveux, tests neurocomportementaux ,histologie.

Remerciements

Avant tout propos, nous tenons a remercier le grand dieu le tout puissant ,de nous avoir donné la force et la patience pour la réalisation de ce travail .

*Et a travers ce modeste travail ,nous remercions notre très cher encadreur **Docteur Kahloula Khaled** ,et son coencadreur **hajdjaj hassina** ,pour l'intèressante documentation qu'ils ont mis a notre disposition ,pour les conseils précieux et pour toutes les commodités et aisances qu'ils nous ont apportés durant la préparation et la finalisation de ce projet .*

Nous tenons a remercier a monsieur Benali et monsieur Ouici pour la synthèse de la molécule.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mr hachem en étant président du jury et Mr Adli et Mr Halla d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciement s'adresse également a tout nos professeurs pour leurs gènèrosités et la grand patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges acadèdèmiques et professionnelles .

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

Mon très cher frère :Salah eddine .

Ma très chère sœur :Hanaa.

Mon binome :

amel et sa famille

Ainsi que pour tous mes amis et mes collègues :

*zakaria,mustapha,bouamama,houari,toufik,youcef,amina,
hanen,nacira,Cherine,cherifa,imen,wafaa,narimen,khadija,amel.*

A toute ma promotion

A tous ceux qui m'aiment

A tous que j'aime

AMINA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à : A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé Miloud et bien sur A mes frères Mohamed et Zakaria et Mustapha.

Et mes sœurs, ainsi que leurs enfants

A mon binôme Amina et toute la famille Boukhecheba

À tous mes amis et collègues

À tous les étudiants de la promotion 2014/2015

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

AMEL

Abstract:

Our work has focused on the impact of subchronic a triazole derivative khacinothionyl at a dose of 10 mg/kg on neurobehavioral function and some serum parameters in young wistar rats. the sub-chronic exposure khacinothionyl, allowed to record a significant decrease in body weight ($p < 0.001, p < 0.01, p < 0.05$) and a significant decrease ($p < 0.001$) the weight of rat brain treated compared to control rats. Furthermore, the assessment of anxiety through the elevated cross maze test on the number of open arms and the time spent in open arms indicate a significant decline, has unveiled that subchronic exposure to khacinothionyl causes an anxiety state ($p < 0.001$) among the subject exposed compared to controls. However, serum analyzes of animals exposed to khacinothionyl, show a significant decrease in blood glucose levels ($p < 0.01$). compared to control animals however, the results recorded for the open field test revealed a significant rating decrease in the number of squares crossed ($p < 0.001$), and number of recovery ($p < 0.001$), for the stereotyped behavior showed no significant difference ($p > 0.05$). however exposure of rats at a dose of 10mg/kg khacinothionyl, indicated through the Y-maze test, test for working memory a percentage of spontaneous alternation (SPA) was significantly higher ($p < 0.01$) compared to control animals. in order to achieved the neurobehavioral tests, we finished our work by histopathological study of brain this shows that exposure to khacinothionyl causes a palisade arrangement perivascular oligodendrocytes. at high magnification we note the presence of hyper chromatic cells treated subjects compared to controls. to conclude, subchronic to khacinothionyl to cause behavioral changes order that reflects the deleterious Action of this compound on the nervous system

keywords : 5(phenyl)-1,2,4triazole -3-thione, locomotor activity, anxiety, nervous system, neurocomportementaux testing histology.

الملخص:

الهدف من هذه الدراسة تقديم التغيرات السلوكية وبعض المعايير المصلية عند الجرذان بعد مرحلة البلوغ المعرضة للتريازول بجرعة 10مغ /كغ لمدة شهر .

التعرض للتريازول سمح بالملاحظة في اختبار (Open Field) ارتفاع ملحوظ في عدد المربعات المقطوعة وكذلك في عدد محاولة الوقوف والتي تدل على زيادة النشاط الحركي وزيادة على النتائج المتعلقة بحالة التأثير أظهرت انخفاض ملحوظ في عدد المربعات المركزية المقطوعة وأيضا ارتفاع ملحوظ في عدد التنظيف وعدد البراز.

من جانب آخر لوحظ لدى الجرذان انخفاض ملحوظ في وزن الجسم والنشاط الحركي (العرضي، الأفقي) بما يخص السلوك الظاهري النتائج المحصل عليها بينت تغيرات في عدد التنظيف والبراز.

استعمال مختلف التقنيات السلوكية بالخصوص المتعلقة بالقلق (labyrinthe en croix surélevé) والاكتئاب كشفت أن التعرض المزمن للتريازول أدى إلى حالة قلق مصحوبة بالاكتئاب عند الجرذان المعرضة مقارنة بالشواهد مع ذلك نتائج تركيز مصل الدم بينت أن هذا التعرض المزمن أدى إلى انخفاض نسبة السكر في الدم.

من جانب آخر لوحظ ان الجرذان المعرضة للتريازول المعرضة لاختبار (labyrinthe en y) ارتفاع في نسبة التناوب العفوي عند الجرذان المعرضة للتريازول مقارنة بالشواهد بما يخص الذاكرة العملية .

في الختام التعرض للتريازول أدخل تغيرات في النظام السلوكي وتحليل الدم الذي يعكس خطورة هذه المادة لمختلف الأعضاء من بينهم الدماغ.

وبعد الانتهاء من تحليل التقنيات السلوكية قمنا بتحليل النسيجي للدماغ و الذي بين ان التعرض للتريازول ادى الى وجود نواة ذات نشاط كروماتيني عالي .

الكلمات المفتاحية :

الدماغ ، النشاط الحركي، القلق ، التريازول , تقنيات سلوكية, تحليل الانسجة .

Table des matières

Liste des abréviations.	
Liste des figures.	
Liste des tableaux.	
Introduction.....	1
I. Généralités sur le triazole	2
I.1.. Les propriétés physico-chimiques de triazole	3
I.2.les propriétés biologique de triazole	3
I.3. Les domaines d'application de triazoles.....	4
I.3.1.application dans agriculture.....	4
I.3.2.application thérapeutique.....	5
I.3.3.Application industriel.....	6
I.3.4. application biologique.....	7
I.4. La toxico-cinétique du triazole.....	7
A. Absorption.....	7
B. Distribution.....	7
C. Métabolisme.....	8
D. Elimination.....	8
I.5. La toxicité du triazole.....	8
I.5.1. Effet sur la développement.....	8
I.5. 2. Effets sur le reproduction.....	9
I.5.3. Effets sur le système nerveux.....	9
a). Effets sur la neurotransmission.....	10
II. Matériels et Méthodes.....	11
II.1 L'objectif.....	11
II.2 protocole expérimental.....	11
II.2.1 Les animaux d'expérimentation.....	11
II.2.2 la synthèse de 5-phényl 1,2,4 triazole. 3-thiol.....	12
II.2.3 Répartition des lots des rats.....	13
II.2.4 Evolution du poids corporel et poids des organes	13
II.2.5 Sacrifices des rats.....	13
II.2.6 prélèvement des organe.....	14
II.3 Etude du comportement de l'animal.....	14

II.3 .1 Tests neurocomportementaux.....	14
A. Le Test d'open-field.....	14
B. Test de la planche à trous.....	15
C. test du labyrinthe en croix surélevé.....	16
D. test du labyrinthe en Y.....	17
II.4 Dosage biochimique.....	18
II.4.1 Dosage de glucose.....	18
II.5 Etude histologique des tissus prélevés.....	19
II.5.1 Etude macroscopique.....	19
II.5.2 Etude microscopique.....	19
A. Fixation.....	19
B. Déshydratation.....	19
C. Clarification.....	20
II.5.3 Imprégnation et inclusion à la paraffine.....	20
A. Réalisation des coupes.....	20
B. Coloration.....	20
C. Montage des coupes.....	21
II.6 Expression et analyse statistique des résultats.....	21
III. Résultats et interprétation.....	22
Discussion.....	31
Conclusion.....	34
Références bibliographiques	

Liste des abréviations :

ADN : acide ribonucléique.

ARN : acide désoxyribonucléique.

BF : bras fermé.

BO : bras ouvert.

C₂H₄N₄ : aminotriazole.

CYP : le cytochrome P.

DA : la dose administrée.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

GABA : acide gaminobutyrique.

Gr : grossissement.

H₂SO₄ : acide sulfurique.

LCS : labyrinthe en croix surélevé.

M : moyenne.

NaOH : d'hydroxyde de sodium.

P : probabilité.

p.c : poids corporelle.

pKa : potentiel constant d'acidité.

SEM : Moyenne standard d'erreur.

SNC : système nerveux central.

SPA : pourcentage d'alternance spontané.

T_{eb} : temps d'ébullition.

TDF : triadimefone.

T_f : temps de fusion.

VFEND : Voriconazole.

ΔH_f : Enthalpie.

Liste des figures :

Figure N°01 : les deux types de triazole.....	2
Figure N°02 : Les 2 formes tautomères du 1,2,4 triazoles.....	2
Figure N°03 : Formule développée de l'amitrole	4
Figure N°04 : Les 1,2,4-triazoles en chimie médicinale.....	5
Figure N°05 : Un groupe de jeunes rats dans une cage.....	11
Figure N°06 : la synthèse de 5-phényl 1,2,4 triazole. 3-thiol.....	12
Figure N°07 : le prélèvement du sang	13
Figure N°08 : le prélèvement et la conservation de cerveau	14
Figure N°09 : Test d'open Field	15
Figure N°10 : Test de planche à trous.....	16
Figure N°11 : Dispositif expérimental du LCS.....	17
Figure 12 : Dispositif expérimental du test du labyrinthe en Y avec la formule adaptée pour calculer le pourcentage d'alternance et un exemple de comptage d'alternance.....	18
Figure 11 : L'évolution du poids corporel des rats pendant l'expérimentation.....	22
Figure 12 : Comparaison du poids du cerveau des rats témoins et des rats exposés au khacinothionyl).....	23
Figure 13 : Comparaison entre le nombre d'entrées dans les bras ouverts chez les différents groupes traités et non traités (khacinothionyl vs témoin).....	24
Figure 14 : Comparaison entre le temps passé dans le bras ouvert chez les différents groupes exposés et non exposés (khacinothionyl vs témoin).....	25
Figure 15 : Comparaison entre le pourcentage d'alternance spontanée (SPA) chez les différents groupes exposés et non exposés (khacinothionyl vs témoins).....	26
Figure 16 : Comparaison entre le nombre de visites des trous chez les différents groupes traités et non traités (témoins vs khacinothionyl).....	27
Figure 17 : Comparaison entre le comportement stéréotypé chez les différents groupes traités et non traités (témoin vs khacinothionyl)	28

Figure 18 : Comparaison entre la glycémie chez les différents groupes traités et non traités (témoin vs khacinothionyl).....29

Figure 19 : coupe histologique de cortex cérébral de rat témoin30

Liste des tableaux :

Tableau 01: Quelques propriétés physico-chimiques des triazoles.....3

Les dérivées azolés sont des composés cycliques synthétiques dans lesquels un ou plusieurs atomes de carbone constituant le cycle sont remplacés par un hétéroatome, les plus communs sont l'azote, l'oxygène et le soufre (**Laib, 2009**).

Les hétérocycles jouent un rôle essentiel dans la chimie du vivant, en tant que constituants de l'ADN, ARN, des enzymes et coenzymes ; ils interviennent dans chacun des processus biologiques(**Cédric BRULE ;2004**),parmet ces hétérocycles le triazole.

Le mot triazole fut donné pour la première fois par Bladin en 1885 aux systèmes cyclique carbone-azote de formule $C_2H_3N_3$ (**Gadhavé et al ., 2010**). Certaines auteurs ont montrés des activités biologiques notamment anti-inflammatoire; antimicrobien; antimycotique activité tels que le fluconazole, itraconazole, voriconazole; et anticancéreux. Les triazoles substitués sont thione rapporté à une variété de facteurs biologiques des activités telles que antibactérien,antifongique ;antituberculeux, antiviral.

Notre étude repose sur l'exploration de la neurotoxicité du khacinothionyl durant l'exposition subchronique chez des jeunes rats wistar à travers une série des tests neurocomportementaux (l'anxiété, l'activité locomotrice, l'apprentissage et mémoire).

Revue Bibliographique

I-Généralités :

Tout les triazoles sont d'origine synthétique et n'existent pas à l'état naturel. Se sont des hétérocycles a cinq chaînons .il en existe deus types : (**bentiss ,2006**). (**figure 01**)

-le 1, 2,3 triazoles ou v-triazoles (1)

-le 1, 2,4 triazoles ou s-triazoles (2)

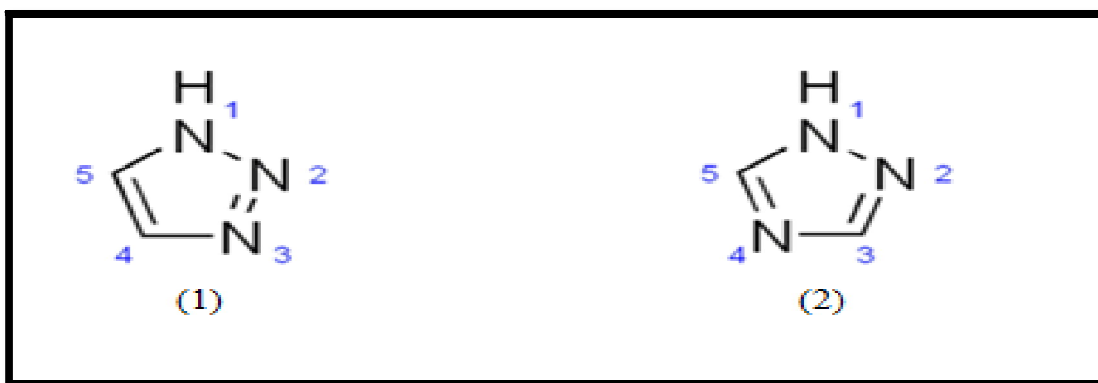


Figure 01 : les deux types de triazole (**Laib,2009**)

Les v-triazoles sont nommés 1, 2,3 triazole, la numérotation des atomes est telle que les numéros donne aux azotes soient les plus petits possibles.

Les s-triazoles existent sous 2 formes tautomères (**figure 02**), la dénomination adoptée dans les « chemical abstracts » reste néanmoins celle de 1, 2,4triazoles en précisant sur quel azote se trouve l'hydrogène. (**Bahnes ,2010**).

I.1 Les propriétés physicochimiques :

Les triazoles possèdent une structure aromatique, qui se traduit notamment par une interaction entre une liaison, dipolaire et une grande capacité à former des liaisons hydrogène. (Abboud et al., 2001). Les triazoles sont généralement stables dans les conditions standards (Li et Finn, 2006).

Tableau 01: Quelques propriétés physico-chimiques des triazoles (Oukessou, 2014)

Molécule	N %	T _f (c°)	T _{eb} (c°)	ΔH _f (KJ/Kg)	pK _a	Moment dipolaire(10 ⁻³⁰)cm
1, 2,3- triazole	61	23	203	2690	9,4	3,23
1, 2,4- triazole	61	121	260	2345	10,1	9,61

I.2 Propriétés biologiques des triazoles :

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

I.3 Application de triazole :

Depuis leur lancement le 1, 2,4-triazole et ses dérivés constituent une classe importante des composés qui possèdent différents secteurs agricole, industriel et biologiques (**Hanif, 2012**), chimie organique et pharmaceutique (**Laib, 2009**).

I.3.1 Application dans agriculture :

Dans la technologie de protection des végétaux, la recherche a été promue au découvrir les pesticides plus efficaces pour lutter contre de nouveaux problèmes difficiles pour contrôler sélectivement la croissance des mauvaises herbes, toute une gamme d'herbicides azolés a été développée présentant des niveaux élevés d'activités, la flexibilité d'application, tolérance des cultures et de faibles niveaux de toxicité pour les mammifères. Les Triazoles jouent un rôle important au sein de cette classe d'hétérocycle. Une série des dérivés de 1, 2,4-triazole ont été brevetées et largement employer (**Aubry, 2010**). Un exemple d'un herbicide et pesticide 1, 2,4-triazole est l'amitrole. L'amitrole (3-amino-1, 2,4-triazole) ($C_2H_4N_4$) (**Figure 3**) est un herbicide non sélectif, très soluble dans l'eau, il peut être décomposé par voie microbienne. Il est employé préférentiellement en traitement foliaire pour détruire les mauvaises herbes à enracinement profond (chiendent par exemple), soit dans des zones non cultivées d'une manière temporaire ou permanente, soit dans des cultures telles que les vignes ou les vergers. Il est souvent associé à d'autres herbicides tels que le glyphosate ou le parquat (**Flogeac, 2004**).

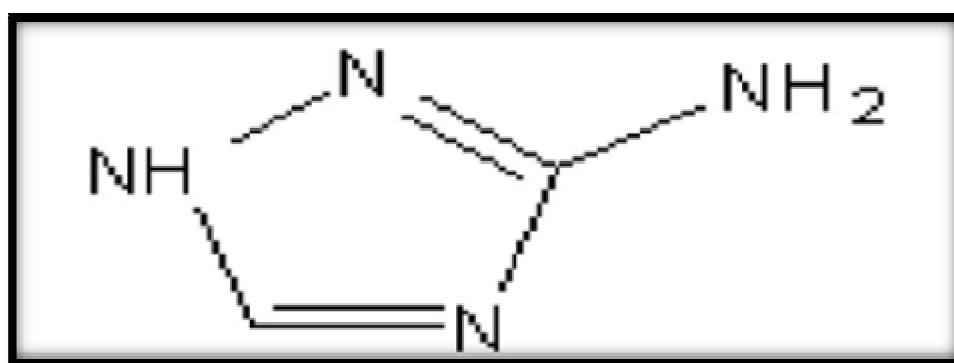


Figure 3 : Formule développée de l'amitrole (Bele et al., 2011).

I.3.2 Applications thérapeutiques :

La famille des 1,2,4-triazoles joue un rôle de premier plan en chimie médicinale. En effet, cette structure hétérocyclique est présente au sein de multiples composés ayant des applications thérapeutiques extrêmement diverses. (**Gizzi,2010**) . L'une des classes de médicaments qui comporte le plus de 1,2,4-triazoles est peut-être celle des antifongiques(**Yagisawa et al., 2004**). Ainsi, des molécules comme le Fluconazole et le Voriconazole (**figure 04**) sont actuellement commercialisées. Le Ribavarin, un ribose *N*-glycoside qui contient une entité 3-aminocarbonyl-triazole, est quant à lui un agent antiviral au champ d'action très large : il est actif contre les virus à ADN et ARN, et est en outre utilisé pour le traitement de la grippe, de la fièvre de Lassa, ou du virus Hantaan (**Hanna et al ., 1988**). Autres molécules que nous avons choisi de mettre en lumière, le Vorozole, et l'Anastrozole, qui préviennent le cancer du sein. (**Clemons et al ., 2004**).

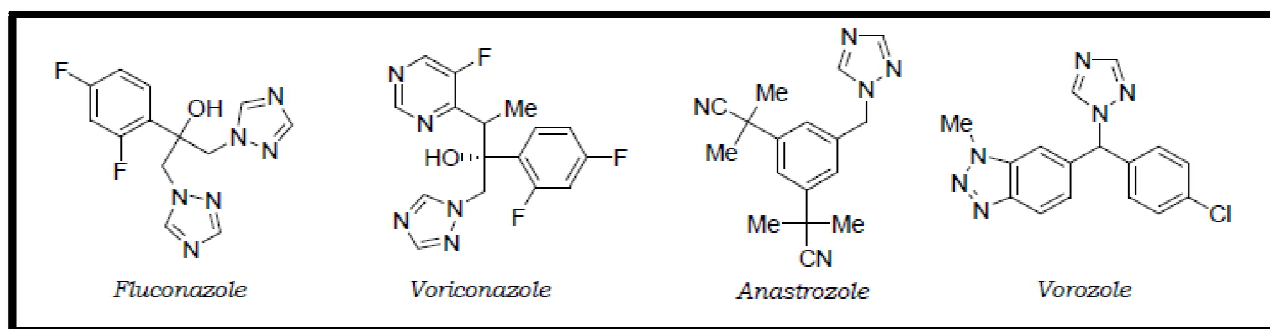


Figure 4 : Les 1,2,4-triazoles en chimie médicinale (**Gizzi ,2010)**

Le fluconazole est un agent oral et parentéral. Il pénètre immédiatement dans les tissus en raison de son caractère peu lipophile et de sa liaison protéique limitée. Il est assimilable à environ 90 %. Ses concentrations urinaires dépassent plusieurs fois (de dix à 20 fois) ses concentrations sanguines (**Debruyne,1997**). Dans des cas rares mais graves, il peut s'associer à une hépato toxicité. Les interactions médicamenteuses sont possibles, car le fluconazole est un inducteur de l'iso enzyme de cytochrome P450.

Utilisation clinique en pédiatrie :

On recourt souvent au fluconazole, l'azole le plus utilisé en pédiatrie, pour traiter le *Candida* et les infections cryptococciques. Il est plus actif contre le *Candida albicans* que contre d'autres souches (p. ex., *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* et *Candida tropicalis*). Il n'est pas actif contre les espèces d'*Aspergillus* ou d'autres

moisissures. En prophylaxie, le fluconazole est utilisé chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques allogènes (*Seidel et al., 2000*).

Le voriconazole est offert en formulation orale ou parentérale. Il faut éviter la formulation intraveineuse chez les patients ayant une insuffisance rénale modérée ou grave en raison du potentiel d'effets toxiques de l'accumulation du véhicule solvant. Les taux plasmatiques de voriconazole sont très variables selon les individus. Les enfants éliminent mieux le voriconazole que les adultes (*Jeu et al., 2003*). Les effets indésirables incluent les éruptions cutanées, des anomalies visuelles (photophobie et vision brouillée), des réactions de photosensibilité et des taux élevés de transaminase hépatique ou de bilirubine sérique (*Walsh et al., 2002*).

Utilisation clinique en pédiatrie :

Le principal rôle du voriconazole consiste à traiter l'aspergillose envahissante, car ce médicament a émergé comme traitement de choix de l'aspergillose pulmonaire envahissante chez les enfants plus âgés et les adultes (*Walsh et al., 2008*). Ce produit peut également être utilisé pour traiter les infections systémiques à *Candida*, mais en pratique clinique, il faut d'abord envisager d'utiliser le fluconazole.

Anastrozole et vorozole nouveaux inhibiteurs de l'aromatase sont une nouvelle classe d'agents qui sont d'un intérêt considérable dans le traitement du cancer du sein hormono dépendant chez les femmes ménopausées. L'aromatase est un complexe enzymatique catalyse la conversion des andogènes surréniaux androstènedione et testostérone en estrone. Chez les femmes mènopausées,le processus d'aromatisation périphérique représente la majorité des oestrogènes en circulation . L'inhibition sèlective de laproduction d'osestrogènes par les inhibiteurs de l'aromatase est une stratégie efficace pour traitement du cancer. **(Crémoux , 2000)**.

I.3.3 Application industriel :

Certains triazoles sélectionnés ont été utilisés comme des diodes électroluminescentes (Dispositifs électroluminescents). Certains systèmes triazole ont un usage intensif dans la séparation de l'argent à partir d'autres cations métalliques dans la membrane liquide système.

En outre, ces composés sont utilisés comme colorants synthétiques et agents de blanchiment. De plus, les encres ayant des propriétés d'écriture lisses contiennent également des dérivés triazoliques. Ces composés ont également été signalés comme inhibiteurs de corrosion du cuivre, laiton, l'aluminium et l'acier dans l'environnement marin (Mezhoud, 2011) et inhiber la formation de brouillard dans les émulsions photographiques la croissance des plantes (Moreno et al., 1992) et inhibiteurs herbicides (Liu et al., 1998).

I.3.4 Application biologique :

Un grand nombre de composés hétérocycliques contenant le noyau 1,2,4 triazole sont associés à des propriétés pharmacologiques diverses, telles que l'activité anti-inflammatoire, fongicide, antimicrobienne et antivirale, antitumorale, aussi bien que les anticonvulsants et les antidépresseurs. (Bouanane, 2007).

I.4 La toxico-cinétique du triazole :

Il est important de connaître le métabolisme du triazole pour mieux comprendre ses effets.

A. Absorption :

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

B. Distribution :

La majeure partie de triazole (l'itraconazole) dans le plasma est liée aux protéines (99,8%), avec l'albumine comme principal composant de liaison (99,6% pour le métabolite hydroxy). Il présente aussi une affinité marquée pour les lipides. Seul 0,2% de triazole est présent librement dans le plasma. Il présente un important volume de distribution apparent dans l'organisme, ce qui laisse suggérer une distribution étendue dans les tissus, les concentrations dans les poumons, les reins, le foie, les os, l'estomac, la rate et les muscles se sont avérées deux à trois fois plus élevées que les concentrations correspondantes dans le plasma, et l'assimilation dans les tissus kératinisés, la peau en particulier, est jusqu'à quatre fois plus élevée que dans le plasma. (Janssen, 2013) biodisponibilité atteint 100% en 96h chez les rats (Jargot et al., 2014).

C. Métabolisme :

L'itraconazole est intensivement métabolisé par le foie en un grand nombre de métabolites. Des études *in vitro* ont montré que le CYP3A4 est la principale enzyme impliquée dans le métabolisme de l'itraconazole. Le principal métabolite est l'hydroxy-itraconazole, qui a montré *in vitro* une activité antifongique analogue à celle de l'itraconazole. (Janssen, 2013).

D. Élimination :

La principale voie d'excrétion du triazole est urinaire. Les quantités excrétées dans l'urine environ 52 à 76 % de la dose administrée (DA) sont supérieures à celles éliminées dans les matières fécales (12-36 % de la DA). La demi-vie du triazole dépend de la dose administrée et environ 6 heures pour une dose de 200 mg (voie orale). Le profil pharmacocinétique étant non linéaire ne permet pas de prévoir l'accumulation ou l'élimination du triazole (PRD, 2012).

I.5 la Toxicité du triazole :

Un certain nombre d'effets indésirables communs à plusieurs triazoles a été observé chez des animaux de laboratoire, tel que les effets sur le développement, les effets sur la reproduction, l'hépatotoxicité, l'hépatocarcinogénicité chez les souris et la production d'autres types de tumeurs (thyroïde, testicules), par l'intermédiaire de mécanismes non génotoxiques (Efsa, 2009).

I.5.1 Effet sur le développement :

Sur le plan du développement chez le rat, il a été noté que le 1,2,4-triazole induit seulement un retard de développement mental (Menegola et al., 2005). Les études dans la période prénatale chez les rats exposés au dérivé de triazole révèlent divers effets (côtes surnuméraires, urétérohydrose et hydronéphrose). Chez les descendants, ils ont constaté une incidence accrue de taille du fœtus plus une diminution de la prise pondérale et la consommation alimentaire, ainsi qu'une augmentation de la consommation d'eau (PRD, 2012). Dans les études à court terme, les effets sur les os sont légèrement apparents chez le rat. Par contre, l'exposition à long terme a montré les effets suivants : incidence accrue d'incisives pâles et blanchies, hypertrophie osseuse et épaissement des os du crâne, une dépression dorsale ainsi qu'une dilatation des ventricules du cerveau attribuable à la croissance excessive des os du crâne (PRD, 2012).

I.5.2 Effets sur la reproduction :

Le pouvoir du triazole a été évalué dans une série d'études, les résultats montrent un retard dans les étapes du développement par exemple : la maturation sexuelle et une diminution du poids des portées. D'autres études notent aussi une diminution du poids corporel des foetus, une augmentation des malformations et des variations squelettiques, en plus une réduction du gain de poids corporel. L'observation au cours du développement montre des changements dans les organes reproducteurs (les testicules et les ovaires) (**EPA, 2006**) et une perturbation de l'homéostasie de testostérone comme un événement clé dans le mode d'action de toxicité (**Goetz et Dix, 2009**).

L'étude sur deux générations chez le rat montre des effets sur la fertilité (changements morphologiques du sperme, baisse des sites d'implantation et infertilité) avec une baisse de poids des testicules associée à des modifications histologiques et une augmentation des corps jaunes (**ANSES, 2011**).

I.5.3 Effets sur le système nerveux :

Le noyau de 1, 2, 4- triazole ont été incorporées dans une grande variété thérapeutiquement intéressante notamment stimulants le système nerveux central (SNC), et jouent le rôle d'anxiolytiques (**Harish et Neena, 2010**). Certain auteur observé, une baisse de poids du cerveau, des lésions cérébrales, convulsions, une dégénérescence des nerfs périphériques (**ANSES, 2011**). Cependant, une augmentation de l'incidence des signes cliniques (les tremblements et fasciculations musculaires, diminution de l'excitation, et une diminution de l'activité locomotrice). Alors, ce motif est considéré comme une substance neurotoxique qui cause des dommages au système nerveux (**Faro, 2010**). Certain travaux montrent que l'exposition aux triazoles, en général provoque une neurotoxicité, à la fois centrale et périphérique et des lésions neurologique chez le rat (**EPA, 2006**). Ainsi une augmentation de la sécrétion des facteurs qui sont connus pour affecter l'apprentissage et la mémoire spatiale (**Lathe, 2001**). Par exemple : l'exposition de tébuconazole produit déficits neurocomportementaux chez les rats (**Moser et al. , 2001**).

a) Effets sur la neurotransmission :

Il a été constaté à travers plusieurs études que les triazoles produisent des effets sur le système dopaminergique concernant surtout l'activité locomotrice. **(Walker et Mailman , 1996)**. L'exposition à des doses élevées de triadimefon provoque des comportements stéréotypés **(Crofton et al ., 1989; Walker et al., 1990 ; Perkins et al., 1991; Moser et al.,1995)**, plus des changements de l'activité locomotrice peut se produire à la suite des modifications neurochimiques, en particulier dans la neurotransmission dopaminergique de la voie nigro-striaté **(Crofton et al., 1989)** .Certains auteurs ont observés que la réserpine bloque l'augmentation de l'activité locomotrice produite par le triadimefon (TDF) qui agit sur les récepteurs dopaminergiques. Le TDF agit comme un agoniste de dopamine, avec un mécanisme d'action ressemblant à celui de la cocaïne **(Kalivas et al ., 1993)**. Les résultats indiquant que la stimulation de ces sous-types de récepteurs peut être nécessaire, et suffisante pour induire un changement comportemental **(Reeves et al ., 2004)**. Comme tous les composés chimiques le triazole sont utilisés dans certains médicaments neuroleptiques dans le traitement des psychoses autant qu'un antagoniste de la dopamine **(Mäkinen et al. ,2006)**. De nombreux composés biologiquement actifs possèdent le 1, 2,4- triazole reconnu pour ces propriétés cardiotonique, et anxiolytique, a la capacité de se lier aux récepteurs gabaergique du système nerveux central, modulant ainsi l'action du neurotransmetteur acide aminobutyrique (GABA). C'est un agent très actif dans le traitement de l'anxiété **(Cédric,2004)**.

Matériels et méthodes

II .1 l'objectif :

Le but de ce travail est d'évaluer le statut neuro comportementale suite a une exposition sub chronique(30 jours) au triazole khacinothionyl d'une dose de 10 mg/kg(EES ,2009) chez des jeunes rats.

II.2 Protocole expérimental :

II.2.1 Les animaux de laboratoire :

Nous avons utilisé des rats blancs «*Rattus norvegicus*» variété Wistar males, adultes, ayant un poids corporel compris entre 50et 55g ,après souvrage 55 jours. (**Figure 05**).

Les rats sont élevés au niveau de l'animalerie du "Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Molay Tahar Saida Algérie", dans des cages en plastique tapissées d'une litière renouvelable trois fois par semaine. Ils sont nourris d'un aliment complet sous forme des granules de types EL AALF et. Boivent l'eau de robinet. Les animaux ont été exposés à un cycle lumière obscurité, à une température ambiante était de 25 C°

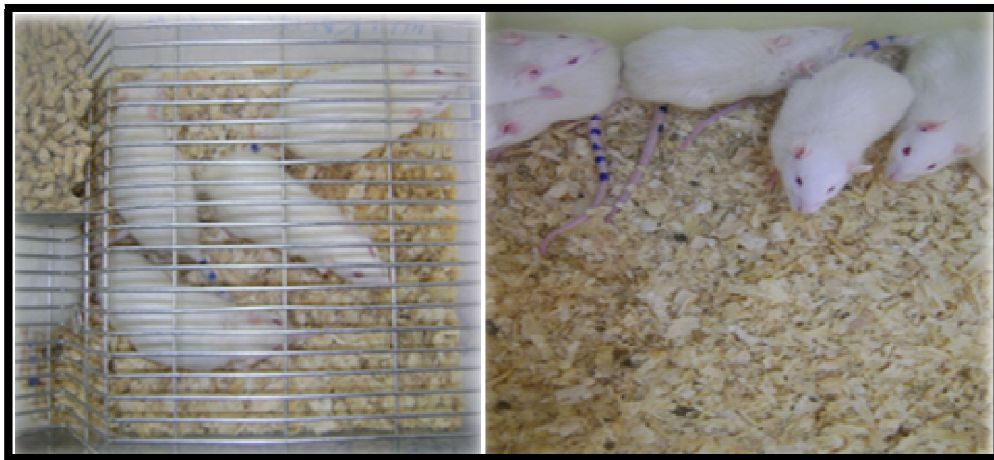


Figure 05 : Un groupe de jeunes rats dans une cage.

II.2.2 la synthèse de 5-phényl 1,2,4 triazole. 3-thiol :

Les hétérocycles 1, 2,4-triazoles 3-thiones ont été synthétisés au laboratoire PFE, par l'intermédiaire hydrazide de l'acide benzoïque [1-3]. L'acide benzoïque est subit une estérification par le méthanol absolu en présence d'une quantité catalytique de l'acide H_2SO_4 concentré. Le benzoate de méthyle (**Almasiradet al., 2004**) obtenu est ensuite traité avec de l'hydrazine hydratée dans l'éthanol absolu comme solvant ce qui a abouti à la formation de benzohydrazide correspondant (**Karthikeyan, 2009**) (figure 06).

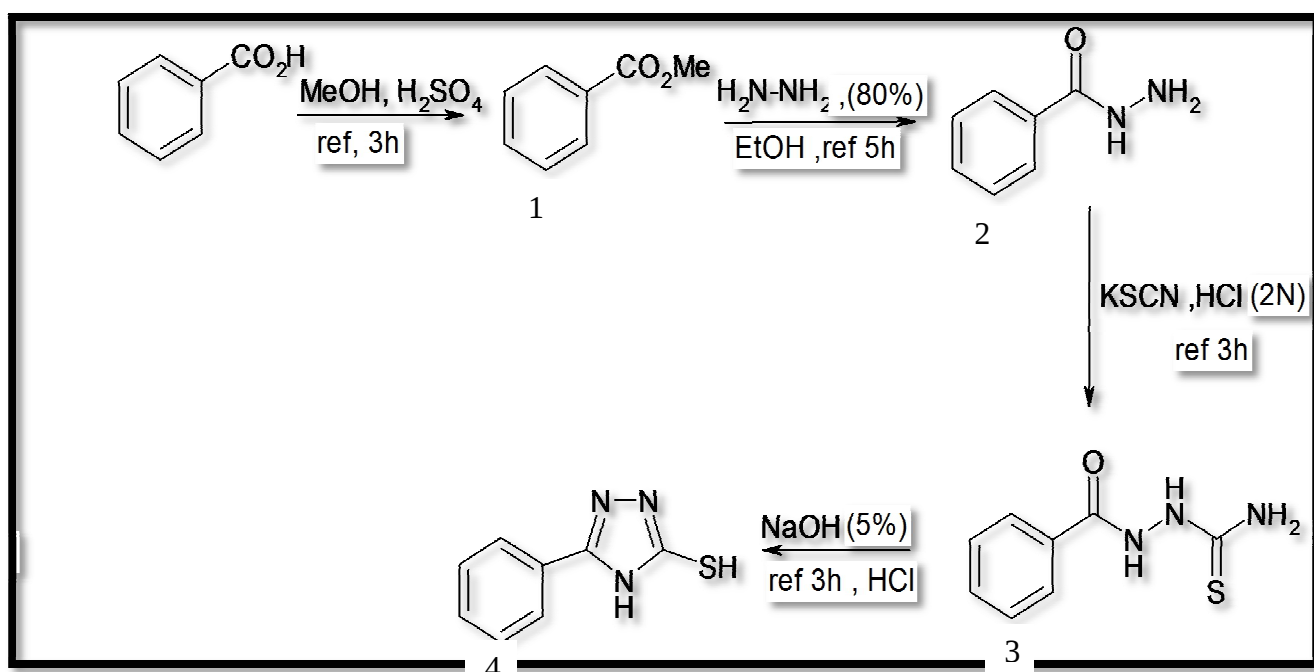


Figure 06 : la synthèse de 5-phényl 1,2,4 triazole. 3-thione .

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

II.2.3 Répartition des lots des rats :

Notre étude est réalisée sur 14 rats wistar (males) réparties en 2 lots.

- Groupes exposés (lot1) : ce groupe de rats reçoit une injection intrapéritonéale de triazole à une dose de 10 mg pendant une durée de 30 jours. (n=7).
- Groupes témoin (lot2) : des rats qui reçoivent une injection intrapéritonéale de l'eau physiologique (Na cl 0,9%) pendant une durée de 30 jours(n=7).

II.2.4 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). A la fin du traitement ces rats subissent une batterie de tests de comportement.

II.2.5 Sacrifices des rats et prélèvement des échantillons :

Les rats sont sacrifiés le matin après 12h de jeûne par décapitation. Le sang récupéré dans des tubes héparines pour les analyses biochimiques (glycémie) et le poids de cerveau ;des deux lots a été enregistré .

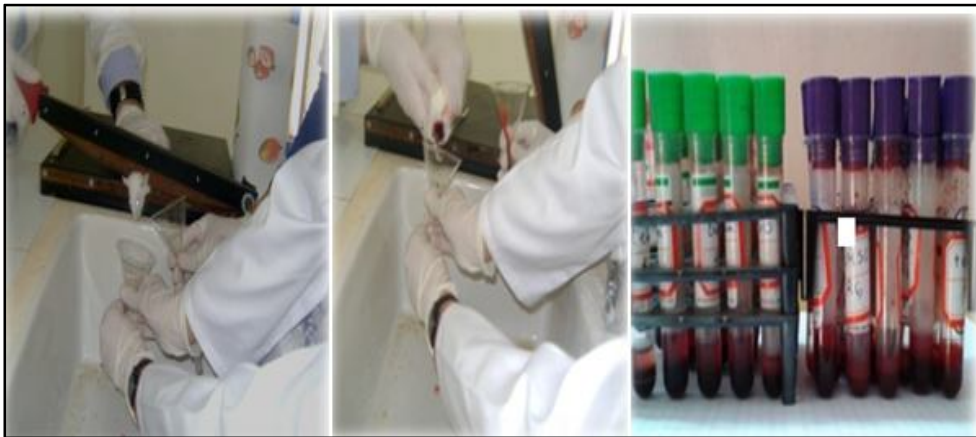


Figure 07: le prélèvement du sang

II.2.6 Prélèvement des organes :

Le crane des animaux sacrifiés ont ètè ouverts pour le prélèvement de cerveau ,a été rincé avec une solution Na Cl, séché, pesé sur une balance de précision de sensibilité puis conservé à 70c° afin de réaliser des coupes histologiques (**figure 08**).



Figure 08: le prélèvement et la conservation de cerveau .

II.3 Etude du comportement de l'animal :

II.3.1 Tests neurocomportementaux :

dans ce projet .nous avons utilisé de nombreux comportements permettant dévaluer une large majorité de fonctions ou troubles de fonctions sous tendues par les systèmes nerveux central et périphérique, pendant toute la durée de l'essai ,nous sommes tenus a conserver un silence absolu et rester rigoureusement immobile.

A/ Le Test d'open-field:

L'open Field utilisé était une large boîte rectangulaire ouverte (L=75 cm, l=75 cm, et h=35 cm), à fond noire, et fortement éclairée, des lignes blancs au sol délimitaient des carreaux (10 x 10 cm) (**figure 07**). Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'open Field, la tête orientée vers le coin. Son comportement était observé pendant 6 min. Six paramètres étaient mesurés par l'expérimentateur :

- le temps de latence (exprimé en secondes), qui correspond au temps mis par le rat pour sortir des quatre carreaux formant le coin.
- le nombre total de carreaux traversés par le rat pendant la durée du test (6 min), qui reflète l'activité locomotrice.
 - le nombre de visites dans les 9 carreaux du centre.
 - le nombre total de redressements (animal positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi).
 - le nombre total de toilettages.
 - le nombre total de défécations.

Ainsi, ce test évalue les capacités exploratoires du rat dans un contexte stressant. Le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressements reflètent son activité exploratoire et son état émotionnel. Les autres paramètres sont plutôt des indices de son état émotionnel. (Koutseff,2011).

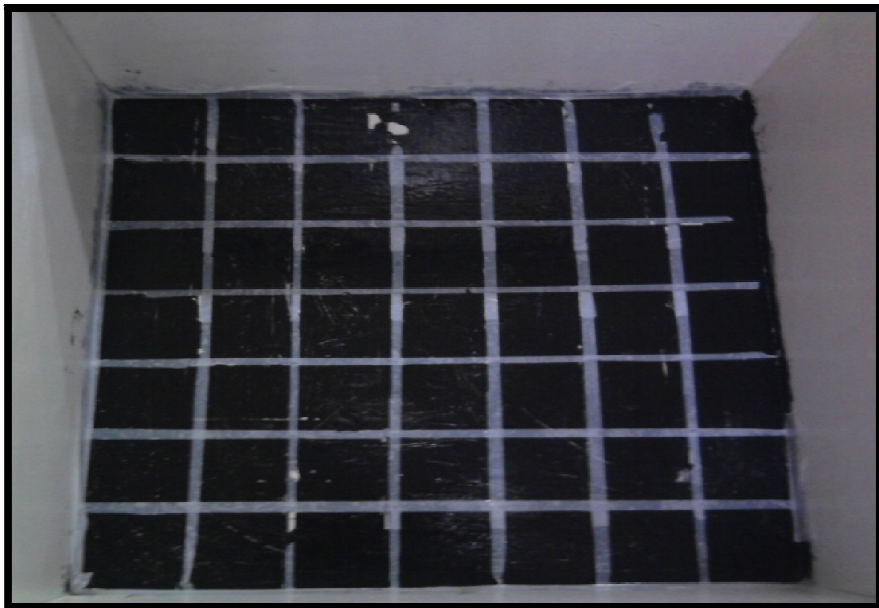


Figure 09: Test d'open Field

B/ Test de la planche à trous : (figure 10)

Cet essai permet de mettre la réaction d'exploration, réaction en rapport à la fois avec la curiosité et avec le désir de fuite de l'animal .Le matériel utilise est une planche en contreplaqué de 40x40 cm et de 1,8 cm d'épaisseur. Dans cette planche sont percés 16 trous de 3 cm de diamètre, régulièrement espacés. La planche est disposée sur un support .Les rats sont déposés une à une au centre de la planche et on compte le nombre de fois où le rat plonge

la tête dans un des trous .Le nombre de trous explorés est relevé au bout de 1, 2, 3, 4 et 5 minutes.(**Boissier et al . , 1962**).



Figure 10: Test de planche a trous

C/ test du labyrinthe en croix surélevé LCS :

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

Ce type de test permet de mesurer le degré d'anxiété d'un animal selon son aversion spontanée pour le vide. L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Les bras fermés (BF) représentent la sécurité, alors que les bras ouverts (BO) offrent une valeur exploratoire (**figure 11**).

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

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

BO et dans les BF; une visite était comptabilisée lorsque le rat avait les quatre pattes dans un bras. (Pellow et al ., 1985).

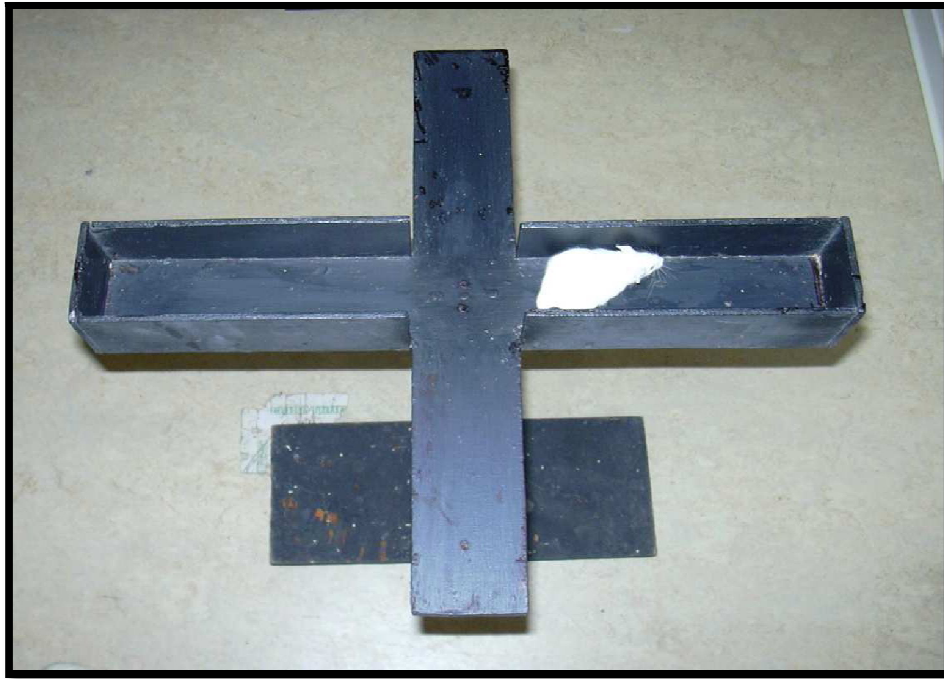


Figure 11: Dispositif expérimental du LCS

D/ test du labyrinthe en Y :

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

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

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

dans notre procédure , le rats est placée dans l'une des trois branches du labyrinthe, la tête dirigée vers le point d'intersection des 3 branches ,puis elle est laissée 5 minutes en libre exploration .on considère qu'elle a pénétré dans une branche si ses 4 pattes sont dedans .on comptabilise l'ordre des visites ,dont on extrait le nombre total de visites comme indice d'activité générale ,ainsi que la distribution des visites dans les trois branches .Les données présentées résultent d'une analyse de cette distribution pour compter les alternances et s'expriment en pourcentage d'alternance .Celui-ci est calculé selon la formule (nombre d'alternance /nombre de visites -2)x 100 voir l'exemple de comptage d'alternance et de pourcentage dans la figure 12 (**Nour ,2011**

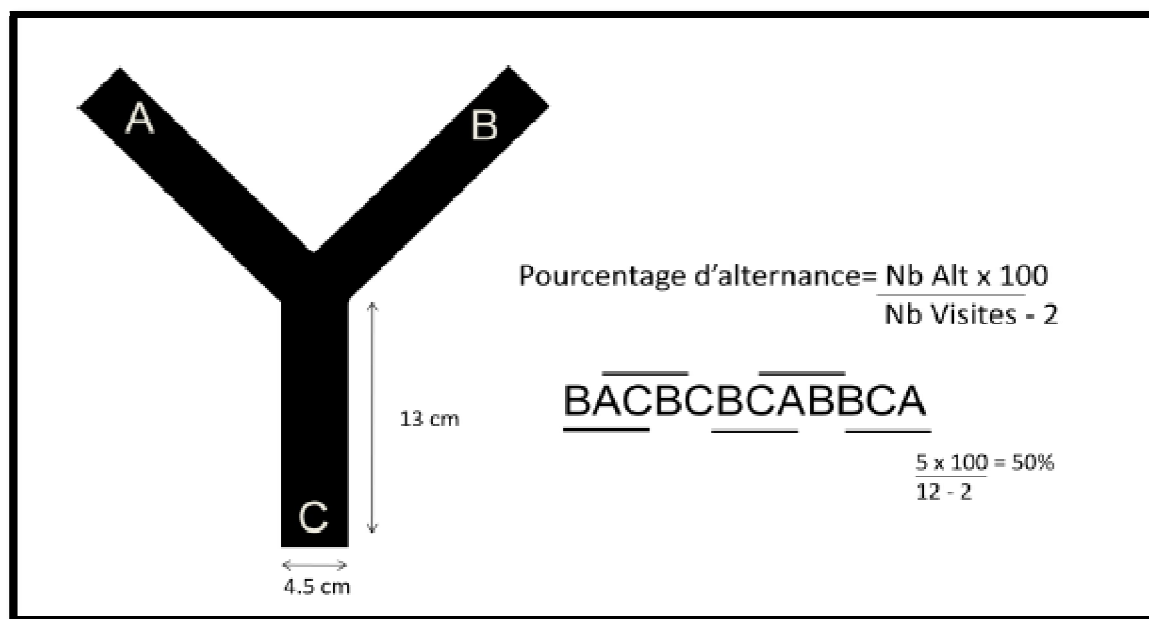
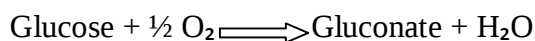


Figure 12 : Dispositif expérimental du test du labyrinthe en y avec la formule adaptée pour calculer le pourcentage d'alternance et un exemple de comptage d'alternance. (**Nour ,2011**).

II.4 Dosage biochimique :

II.4.1 Dosage de glucose : (Bio Systems)

Le dosage du glucose est effectué sur le sérum après séparation du sang. Le glucose sanguin est estimé selon les réactions couplées suivantes :



Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 500$ nm.

II.5 Etude histologique des tissus prélevés :

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

II.5.1 Etude macroscopique :

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude des échantillons prélevés.

Le tissu du foie est examiné, mesuré, pesé, palpés puis disséqué. Chaque lésion est repérée sur un schéma et éventuellement photographiée. L'examen macroscopique des prélèvements donne des indications sur la lésion.

- La taille et la localisation de la partie lésée au niveau du tissu.
- Il permet de sélectionner les territoires à prélever pour l'étude microscopique (Zones lésées).
- Après le choix des prélèvements destinés à l'analyse microscopique, les restes de la pièce analysée sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir en cas de nécessité effectuer des prélèvements complémentaires (Houlot, 1984).

II .5.2 Etude microscopique :

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

A. Fixation :

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

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

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

B. Déshydratation :

Après fixation, les tissus sont déshydratés dans 2bains de formol (1h30 pour chaque bain) ensuite tromper dans 4 bains successifs d'alcool chirurgicale (1h30 dans chaque bain) a la fin les tissus sont mis dans2 bains d'acétone (1h30 dans chaque bain).

C-La clarification :

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

II.5.3 Imprégnation et inclusion à la paraffine :

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

A/ Réalisation des coupes :

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

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

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

B/Coloration :

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

- la 1ere étape consiste à un déparaffinage des lames ou des coupes sur une plaque chauffante.
- la 2eme étape de déparaffinage consiste à faire passer ces coupes dans une solution de xylène.

- la 3eme étape est la dissolution de la paraffine par hydratation qui consiste à éliminer le milieu d'inclusion et la réhydratation des tissus dans 03 bains d'alcools (absolu à 100°, 95°, 75°) de 5 min chacun.
- Rinçage à l'eau pour éliminer l'alcool.

La coloration usuelle associe :

- un colorant basique nucléaire (Hématoxyline).
- un colorant acide cytoplasmique (Eosine, érythrosine, ou phloxine).

La phase de coloration des coupes déparaffinées à l'hématoxyline éosine nécessite le passage de ces coupes dans plusieurs bains d'alcool et de solvants organiques.

C/ Montage des coupes :

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

II.6 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.

Résultats et interprétation

III.1 La croissance pondérale et le poids de cerveau :

III.1.1 La croissance pondérale :

Les données statistiques révèlent que durant l'expérimentation, on a observé une diminution significative ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) du poids des rats exposés au khacinothionyl par rapport aux rats témoins.

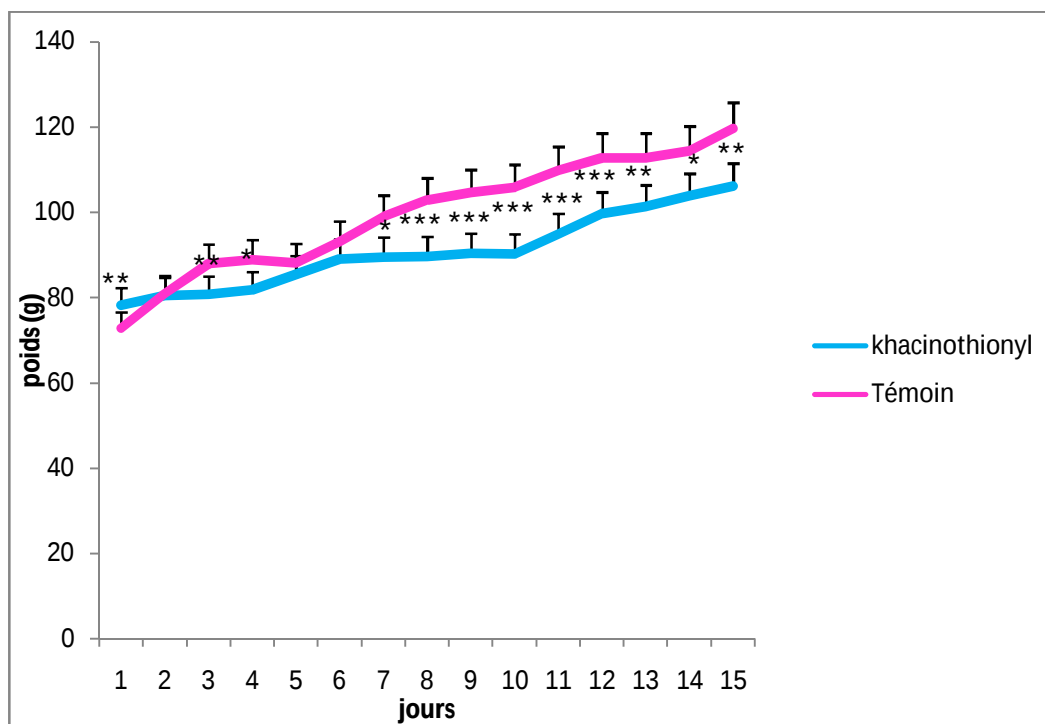


Figure 11 : L'évolution du poids corporel des rats pendant l'expérimentation.

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. (* : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

III.2 Les tests de comportement :

III.2.1 Le test du labyrinthe en croix surélevé :

L'analyse statistique révèle que durant le test du labyrinthe en croix surélevé, le nombre d'entrées dans les bras ouvert ainsi que le temps passé dans les bras ouvert (BO) sont significativement réduit ($p < 0,001$) chez les sujets traités au khacinothionyl par rapport aux sujets témoins.

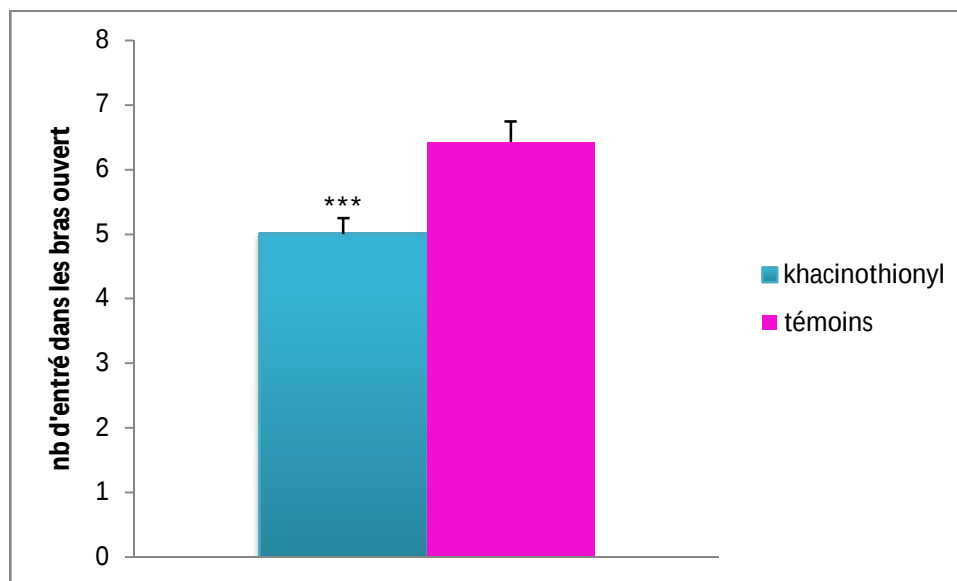


Figure 13 : Comparaison entre le nombre d'entrées dans les bras ouvert chez les différents groupes traités et non traités (khacinothionyl vs témoin). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. (***: $p < 0.001$)

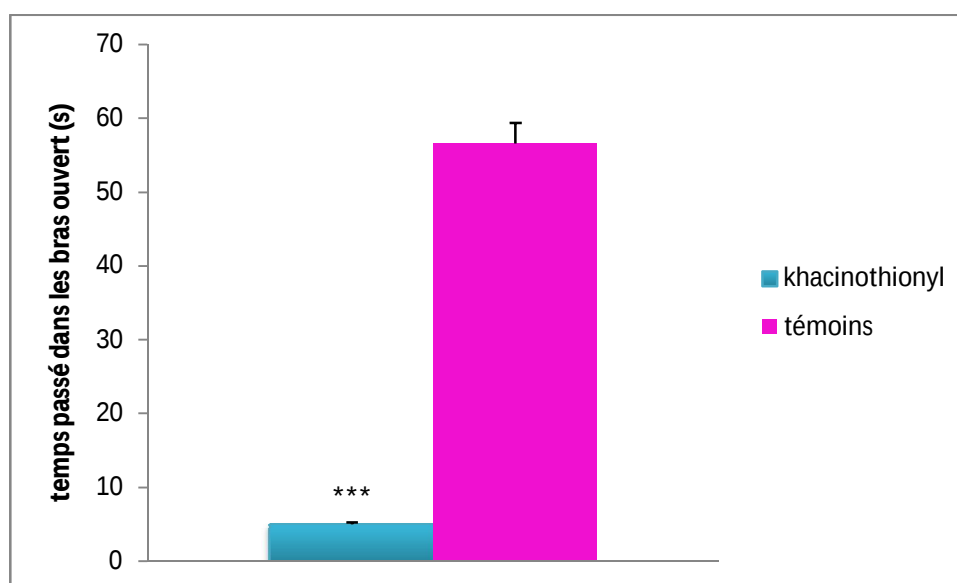


Figure 14 : Comparaison entre le temps passé dans le bras ouvert chez les différents groupes exposé et non exposés (khacinothionyl vs témoin). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. (***: $p < 0.001$)

III.2.2 Le test de labyrinthe en Y :

Les données relatif au test de labyrinthe en Y montrent que, le pourcentage d'alternance spontanée (SPA) est significativement élevé ($p < 0,01$) chez les animaux exposé au khacinothionyl par rapport aux animaux témoins.

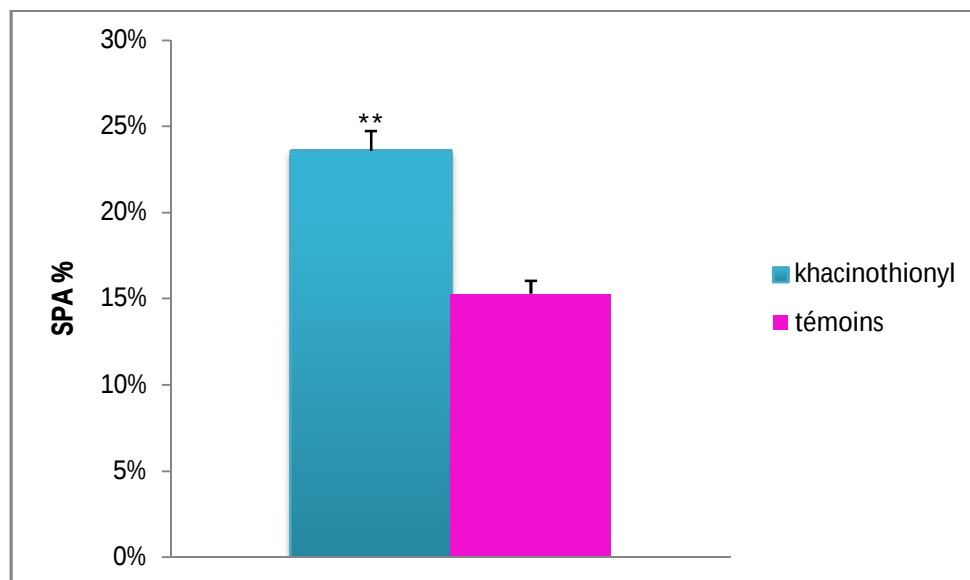


Figure 15 : Comparaison entre le pourcentage d'alternance spontanée (SPA) chez les différents groupes exposés et non exposés (khacinothionyl vs témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. (**: $p < 0.01$)

III.2.3 Test de planche à trous :

Anova de ce test présente une augmentation significative ($p < 0,05$) en terme de visite de trous chez les individus exposé au khacinothionyl comparé aux individus témoins.

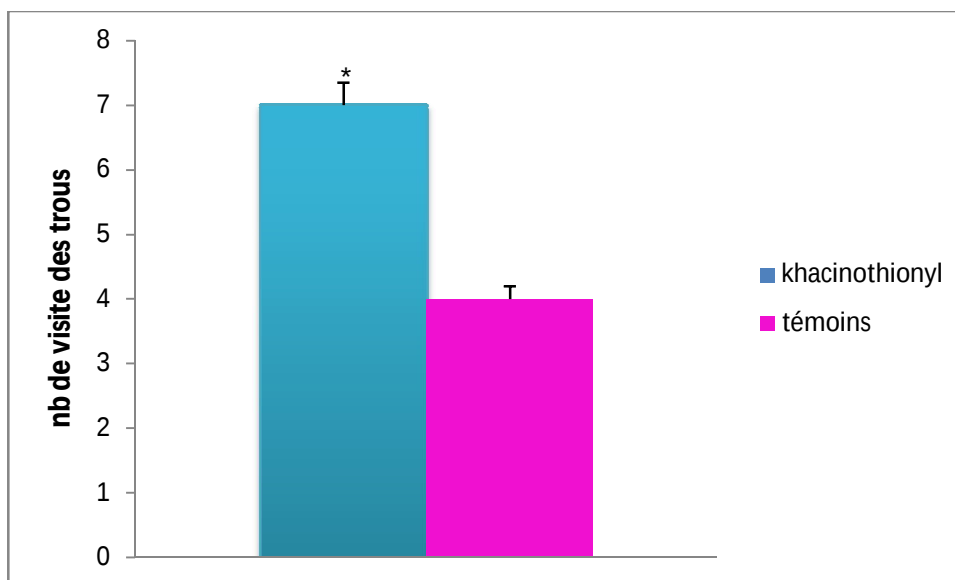


Figure 16 : Comparaison entre le nombre de visite des trous chez les différents groupes traités et non traités (témoins vs khacinothionyl). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. (*: $p < 0,05$)

III.2.4 Test de l'open field:

Les résultats obtenus montrent que l'administration par voie intra-péritonéale du khacinothionyl à 10mg/kg entraîne une diminution significative du nombre de carreaux traversés et du nombre de redressement ($p < 0,001$), par rapport aux rats témoins, on observe aussi une réduction du nombre de visite au centre ($p < 0,01$) de lot traité par rapport au lot témoin. Les résultats enregistrés concernant le temps de latence, nombre de toilettage et le nombre de défécation ne présentent aucune différence significative ($p > 0,05$).

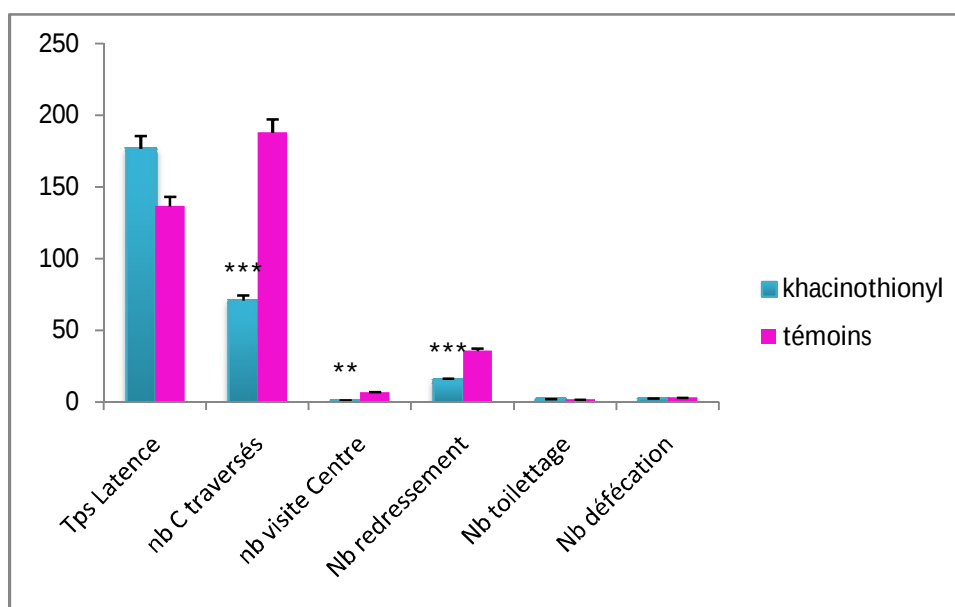


Figure 17 : Comparaison entre le comportement stéréotypé chez les différents groupes traités et non traités (témoin vs khacinothionyl) Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

III.3 Résultats biochimiques :

III.3.1 Dosage de glucose :

Afin de justifier ces données expérimentales nous avons procédé à la détermination de la glycémie chez les rats des deux lots sachant que le glucose est un bon marqueur de stress. Les résultats montrent une diminution significative du taux de glucose sanguin ($p < 0.001$) chez les rats exposés au khacinothionyl par rapport à celle de lot témoins.

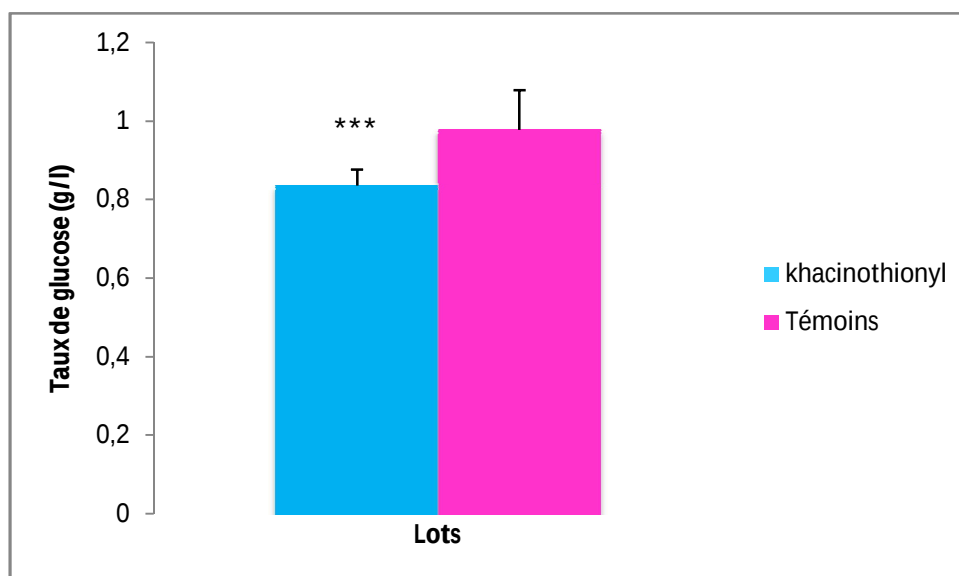
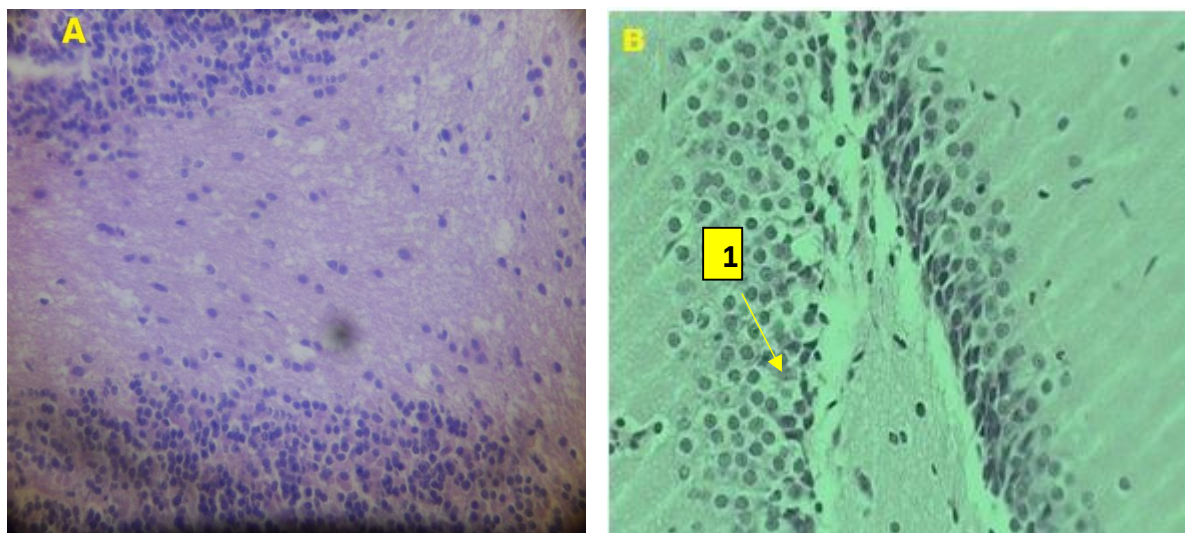


Figure 18 : Comparaison entre la glycémie chez les différents groupes traités et non traités (témoin vs khacinothionyl) (** : $p < 0,001$). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

III.4 Etude histologique de tissus prélevé :

Les résultats obtenus montrent que l'administration par voie intra-péritonéale du khacinothionyl à 10mg/kg entraîne un agencement palissadique perivascularaire des oligodendrocytes. A fort grossissement on note la présence des cellules hyper chromatique chez les rats traité par rapport aux rats témoins.



A : cortex de rat témoin Gr 10 X (40).

B : cortex de rat traité par le triazole Gr 10 X(40).

Figure 19 : coupe histologique de cortex cérébral de rat témoin

1 : hyperchromatique.

Discussion

Les dérivés azolés sont la famille la plus grande du marché actuel et les plus utilisés en clinique et pour cette raison, ce sont aussi les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leur propriétés pharmacologiques que toxicologiques (**Shawali et al ., 2004**).

L'intérêt de cette étude est basé sur l'impact d'une exposition subchronique de 5 phenyl,1,2,4 triazole 3- thione sur les fonctions neurocomportementales chez les jeunes rats wistar .

Après un mois d'exposition au khacinothionyl une dose de 10 mg/kg les résultats enregistrés montrent clairement que le poids corporel des animaux exposés est significativement inférieur à celui des animaux témoins. Qui est probablement due à la réduction de la consommation de la nourriture qui la conséquence de l'effet anoréxigène du khacinothionyl .Ces résultats son en accord avec ceux (**Bonnard et al ., 2010**) qui ont indiqués une diminution significative en terme de poids corporel chez les rats wistar exposé au prothioconazole par gavage du 6^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation aux doses de 0,80 ; 500 ou 1000 mg/kg/j . Ce composé pourrait particulièrement affecter les neurones dopaminergiques, sérotoninergiques et glutaminergique sachant que, la dopamine sont impliqués dans la physiologie de la faim. (**Reeves et al ., 2004**). De plus, nous avons observés une réduction significative du poids cérébral chez les sujets ayant subi une administration subchronique au khacinothionyl qui peut être expliqué selon les études de **EPA, 2009 ; PRD, 2012.** par une diminution du poids des structures cérébrales.

Dans la même série expérimentale, on a choisi une batterie des tests d'ordre neurocomportementales pour évaluer l'état de l'anxiété, l'exploration l'activité locomotrice, et la mémoire accompagner d'un dosage du glucose sanguin pour estimer l'état de stress chez des rats exposés au khacinothionyl.

Concernent le test de labyrinthe en croix surélevé Qui est couramment utilisé pour l'étude des comportements liés à l'anxiété. Les désordres comportementaux observés chez l'animal anxieux orientent la réflexion vers l'existence d'un dysfonctionnement dans la circulation ou le traitement de l'information au sein du système nerveux central (**Fairon, 2006**). Les résultats trouvés révèlent une diminution significative dans le nombre d'entrées dans les bras ouverts (BO) ainsi que le temps passé dans (BO) chez les sujets exposés au khacinothionylce qui reflète un niveau d'anxiété significativement important comparé aux sujets témoins. Ce comportement anxieux des rats pourrait être traduit par une interaction du khacinothionyl avec les neurones sérotoninergiques et dopaminergiques du l'hippocampe. De plus, le système sérotoninergique a un rôle central dans la modulation d'anxiété (**kahloula, 2010**), une

augmentation de l'activité sérotoninergique va entraîner un comportement anxieux de manière directe, mais également indirecte en diminuant l'activité inhibitrice du système GABAergique. (**Prime, 2013**).

En effet, A travers les tests de l'open field et la planche à trous nous n'avons enregistré que l'administration de khacinothionyl induit chez les rats une hypoactivité locomotrice pendant les 06 minutes d'expérience, ainsi Qu'une augmentation dans le nombre de visite des trous respectivement. Ce changement dans l'exploration d'environnement peut être expliqué par la peur de l'environnement nouveau (**Jones, 1986**). Ou l'action de ce produit sur le système de transmission dopaminergique qui se traduit soit par une baisse de la synthèse et de la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique, soit par inhibition des récepteurs post synaptique D2 ce qui explique la diminution de l'activité exploratrice et dans le comportement. Ces résultats trouvés sont en accord avec les travaux entrepris par (**WHO, 2004**).qui rapport que le triadimefone diminué l'activité locomotrice par inhibition de la synthèse et la libération de dopamine dans la synapse. (**Walker et Mailman, 1996 ; Ikaidi et al., 1997**).

Par ailleurs, Les capacités d'apprentissage et de mémorisation des animaux ont été évalués à travers le test du labyrinthe en Y. Après 30 jours d'administration intrapirétonial au khacinothionyl. Nos résultats ont révèlés que le pourcentage d'alternance spontané est significativement élevé. Ces résultats corroborent avec ceux de (**Lathe, 2001**) qui indiquent que l'exposition au tébuconazole produit des déficits neurocomportementaux chez les rats. Ce déficit d'apprentissage est bien corrélé avec les résultats neuropathologiques (la perte de cellules pyramidales dans l'hippocampe). (**Moser et al., 2001**). les résultat trouvé par (**Isseroff, 1979 ; Nour,2011**) que le déficit d'alternance pour ce test observé chez des rats dont l'hippocampe est lésé, serait dû à des perturbation de la mémoire et plutôt de la mémoire a court terme. Les études montrent que l'exposition au Propiconazole, Triadimefon et Myclobutanil affect le système glutamatergique, spécifiquement le complexe du récepteur NMDA qui entraine une grande variété des changements de la signalisation intracellulaire et de la plasticité synaptique dans l'hippocampe qui sont connus pour interférer lors de l'apprentissage et la mémorisation (**Reeves et al., 2003**).

Toutefois, nous avons déterminé le taux du glucose sanguin qui est un bon marquage de stress, entre les deux lots étudiés. Les résultats notés montrent un taux de glycémie est significativement diminuée chez les rats exposé au khacinothionyl comparé aux rats témoins. Ces travaux sont en accord avec ceux (**Nesnow et al., 2009 ; PRVD, 2010**) confirment que

l'exposition au myclobutanil à une dose de 442mg/kg p.c/j durant 3 mois provoque une hypoglycémie, due à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique.

Dans le but de voir si l'administration de la triazole s'accompagne ou non d'une altération de l'architecture tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau de cerveau chez les rats témoins et traités par le triazole, l'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents. Les résultats notés montrent un Agencement palissadique perivascularaire des oligodendrocytes, A fort grossissement on note la présence des cellules hyper chromatique chez les rats traité par rapport aux rats témoins. Les études de **Lilian,2010**. montrent que l'exposition au triazoles en générale provoque des lésions neuropathologiques dans le cerveau du rat. D'autre études de neurotoxicité subchronique avec du prothioconazole a une dose de (43,3 mg /kg/p.c/j) induit une augmentation des lésion aux nerfs périphériques. (**REG ,2007**).

Conclusion

Les résultats montrent que l'administration au khacinothionyl par voie intra péritonéale à une dose de 10mg/kg a provoqué une diminution significative du poids corporel et du poids cérébral. Les résultats relatifs aux tests de labyrinthe en croix dévoilent clairement que l'exposition au khacinothionyl entraîne un état anxieux. Cet état a été confirmé par le dosage de glucose indiquant ainsi une hypoglycémie chez les animaux exposés comparés aux animaux témoins.

Toutefois, nous avons également observés une augmentation de pourcentage d'alternance spontanée chez le lot exposé comparés au lot témoin ceci montre que l'exposition subchronique au khacinothionyl entraîne des troubles d'apprentissage et mémorisation.

Cependant, l'exposition de khacinothionyl à une dose de 10mg/kg a provoqué une diminution de l'activité locomotrice chez le lot exposé comparés au lot témoin. Par contre, les observations enregistrées pour le test de planche à trous présent une augmentation de l'activité exploratrice chez le groupe khacinothionyl par rapport au groupe témoin entre les deux groupes.

L'étude histologique réalisée au niveau de cerveau a permis de confirmer la toxicité de khacinothionyl sur l'architecteur tissulaire. En effet, la présence d'un Agencement palissadique perivascularaire des oligodendrocytes. Au fort grossissement on note la présence des cellules hyper chromatique chez les sujets traités par rapport aux témoins.

Ceci montre que l'exposition subchronique au khacinothionyl est neurotoxique, affectant le système nerveux central et périphérique.

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

- Elargir la batterie de test comportemental afin de mieux estimer l'effet neurotoxique du khacinothionyl et son impact sur les performances mémoire spatiale à travers des tests du labyrinthe aquatique.
- Explorer les activités de certaines enzymes impliquées dans le développement cérébral à savoir phosphatase alcaline en particulier durant la gestation et lactation.
- Effectuer une thérapie de l'intoxication chronique au triazole par des plantes médicinales.

Références bibliographique

A

Abboud J.L.M.,Foces-foces.C.,Notario. R.,Trifonou .R.E.,Volovodenko A.p.,Ostrovskii .V .A.,Alkorta. I.,Elguero .J.2001,Basicity of N-H-and N-Metthyl-1,2,3- Triazoles in the Gas Phase,in Solution and in the Solide State- an Experimental and Theoretical Study,European Journal of Organic Chemistry: p3013-3024.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). **2011**, 27-31 av. du Général Leclerc, 94701 Maisons-Alfor

Almasirad.A., Tabatabai.S.A., Faizi.M., Kebriaeezadeh.A., Mehrabi.N., Dalvandi .A., Shafiee.A . 2004. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 6057–60591.

AUBRY.P.2010. La salmonellose chez les bovins laitiers Présentation clinique et culture bactériologique. Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc): p21.

Agrawal.R., Pancholi.S. 2011 . *Der Pharma Chemica* :32-40.

REG (agence de réglementation de la lutte antiparasitaire).2007.prothioconazole :96.

B

BAHNES. Z. 2010. synthèse,études antibacterinne de dérivés 1,2,4 triazole ;4-amino-1,2,4triazole ,1,3,4 ozadizole –S-et N-nucléosides dès l'acide valérique :39.

BELE.D.S., SINGHVI.I. 2011.A review on 1, 2, 4-TRIAZOLES. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research Issue 2 (Vol. 1).ISSN: 2231- 2560.

Bentiss.f .2006. Hétérocycles pentaatomique : synthèses organiques études des propriétés inhibitrices de la corrosion et des propriétés complexantes :39.

BOISSIER. T, SIMON .1962. Thérapie. Arch . Int . pharmacodynamy.

Bonnard.N., Jargot. D., Falcy.M., Fastier. A., Oudar.S., Rambourg.M.O. 2010 , prothioconazole ,INRS ; Edition 2010 :1-8.

Bouanane. Z. 2007.Synthèse de nouveaux dérivés quinoxaline à activité biologique, diplôme de magister en chimie organique : 49.

C

Cédric.B .2004.Dithioacétals de perfluorocétènes. Applications à la synthèse d'hétérocycles trifluorométhylés.

Clemons. M., Coleman. R. E., Verma. S.2004.Aromatase inhibitors in the adjuvant setting,*Cancer Treat. Rev*;**30**: 325-332.

Cremoux .P. 2000. les inhibiteurs de l'aromatase : pharmacologie et activité clinique .

Crofton, K.M., Boncek, V.M., Macphail, R.C. (1989). Evidence for monoaminergic involvement in triadimefon-induced hyperactivity. *Psychopharmacology* 97, 326–330.

Crofton K.M., Boncek. V.M., Macphail.R.C.1990. Evidence for monoaminergic involvement in triadimefon-induced hyperactivity. *Psychopharmacology* ; **97** : 326–330.

D

Debruyne. D. 1997.Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. *Clin Pharmacokinet*; **33**:52–77

E

EES Evaluation of the effects and mechanisms of action of flutriafo1,2009.

EFSA European Food Safety Authority.2009. Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health.

EPA.2009. HPV Challenge Program Test plan submission 1-H-1, 2,4-Triazole (TA) CAS, U.S. Environmental Protection Agency. No. 2888-88-0.

EPA U.S. Environmental Protection Agency. 2006,1, 2,4-Triazole, triazole Alanine.

Triazole Acetic Acid: Human Health Aggregate Risk Assessment in Support of Reregistration and Registration Actions for Triazole-derivative Fungicide Compounds.

f

FAIRON.M.2006.L'ANXIETE CHEZ LES ANIMAUX DE COMPAGNIE :APPROCHES CONCEPTUELLE, CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE.

Faro Rosana. 2010. Neurotoxic Effects of Triazole Fungicides on Nigrostriatal Dopaminergic Neurotransmission, Fungicides, Odile Carisse (Ed.), ISBN: 978-953-307-266

FLOGEAC. K. 2004. Etude de la capacité de rétention de produits phytosanitaires par deux solides modèles des sols. Influence de la présence des cations Métalliques. Thèse de doctorat en vue d'obtenir le grade de docteur en sciences de l'Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE. Spécialité : chimie.

G

Gizzi. M.2010. Réactions multicomposant, couplages catalysés au palladium, et synthèses d'hétérocycles. Organic chemistry.

. Goetz A.K, Dix. D.J. (2009) .Toxicogenomic effects common to triazole antifungals and conserved between rats and humans Toxicology and Applied Pharmacology 238 80–89.

H

HANIF. M., SALEEM.M., TAHIR. HUSSAIN.,M. RAMA.,N-H. ZAIB.,S. ADIL.M., ASLAM.M., PETER. G.,JONESD ., JAMSHED. IQBAL . 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, Vol. 00, No. 00, 1-7.

Hanna.N. B., Dimitrijevič. S., Larson, S. B., Robins.R. K., Ravankar.1988. G. R. J *Heterocycl. Chem*; 25: 1857-1862.

Harish Kumar And Neena.(2010). Synthesis and Characterization of 1, 2, 4-triazole and their diazotized compound as Bio-active agents.

Holcomb.LA.,Gordon.MN.,Jantzen. P., Hsiao .K.,Duff .K.,Morgan. D. 1999 Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin - 1 mutations :lack of association with amyloid deposits ,*Behavior genetics*, 29:177-185 .

Houlot. R. 1984. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie ; *Ed. Maloine* : 19-21, 225-227.

I

Ikaidi.Mu., Akunne.HC., Soliman.KF, 1997. Behavioral and neurochemical affects of acute and repeated administration of triadimefone in the male rat.*neurotoxicology* ;**18** :771-780.

Isseroff A. 1979.Limited recovery of spontaneous alternation after extensive hippocampal damage: evidence for memory impairment. *Exp. Neuro.* **64** : 284-294.

J

Jargot. D., Falcy. M., Robert. S. (2014), miclobutanil, fiche toxicologique FT ; **302** : 1-2

Janssen. C. (2013), résumé des caractéristiques pharmaceutiques du produit ; BE 190294

Jeu. L., Piacenti. FJ., Lyakhovetskiy AG., Fung .HB. 2003. Voriconazole. *Clin Ther*;**25**:1321–81.

Jones R.B.1986. The Tonic Immobility Reaction of the Domestic Fowl - a Review. *Worlds Poultry, Science Journal* ,**42**:82-96.

k

Kahloula .K. 2010.Effets de l'exposition chronique au plomb pendant la période de la Gestation et lactation sur les fonctions neurocomportementales chez les jeunes rats Wistar. Impact sur les récepteurs glutaminergiques.

Kalivas, P. W., Sorg, B. A., and Hooks, M. S. 1993. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants.*Behav. Pharmacol*;**4** : 315–334.

Karthikeyan.M.S .2009. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 827-833.

Koutseff.A.2011. Etude de l'interaction entre stress chronique et polymorphisme de l'apolipoprotéine E dans les processus émotionnels et cognitifs chez la souris : implications dans la maladie d'Alzheimer ?

L

- LAIB. H, 2009.** Application des hétérocycles azotés à cinq chaînons comme additifs aux polymères. mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en chimie : 22,32.
- Lathe, R. 2001.** Hormones and the hippocampus. *J Endocrinol*; **169**: 205–231.
- Li. C., Finn .M.G. 2006.** click chemistry in materials synthesis .ii. Acid-swelling crosslinked polymers made by copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition, *journal of polymer science part A :polymer chemistry*; **44**:p:5513-5518.
- Lilian. R, 2010.** Neurotoxic Effects of Triazole Fungicides on Nigrostriatal Dopaminergic Neurotransmission : 406 ; 978-953-307-266-1.
- LIU. M-Y, GUI .G. WEI., B. PRESTON., J- F. 3RD, OAKFORD., L. YUKSEL., U. GIEDROC., D-P.,ROMEO, T.1997.** The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**,17502-17510.

M

- Mäkinen Milja., Tervo Leo., Tuomainen Anneli .,Kangas Juhani,2006.** Triadimefon in Forestry Nurseries: Operator Exposure and the Effectiveness of Spraying Methods .*Baltic Forestry* ; **12 (1)**: 46–50.
- Menegola E., Broccia ML., Di Renzo F., Massa V., Giavini E. Craniofacial ., Axial skeletal. 2005.** defects induced by the fungicide triadimefon in the mouse. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*; **74**:185–95.
- Messier. C., wall. Pm, 2002.** infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory *psychopharmacology* ; **160**:233-244.
- MEZHOUD. B. 2011.** Synthèse Des Inhibiteurs Contre La Corrosion Des Aciers. Thèse présente dans le cadre de l'obtention du diplôme de magister. Université MENTOURI CONSTANTINE. Faculté des sciences exactes. Département de chimie .en chimie analytique et physique. Option : électrochimie.
- Moser. V.C., Barone Jr., S. Smialowicz, R.J., Harris., M.W., Davis, B.J., Overstreet. D., Mauney.M., Chapin. R.E, 2001.** The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. *Toxicol. Sci.* ; **62** : 339–352.
- Moser., V.C., Cheek. B.M., Macphail, R.C, 1995.** A multidisciplinary approach to

toxicological screening. III. Neurobehavioral toxicity. J Toxicol. Environ. Health ;**45** :173210.

N

Nagahara. AH.,McGaugh .JL. 1992. Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance ,water maze place learning and rewarded alternation tasks .Brain Res; **591**:54-61..

Nesnow. S., Ward. W., Moore. T., Ren. H., and Hester, S. D. 2009. Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital bytranscriptional analyses of mouse liver gene expression. Toxicol. Sci ; **110** : 68–83.

Nour. y .2011. Lèsions sèlectives de deux populations de neurones affectées dans la maladie d'alzheimer :impact sur les performanc es cognitives et l'histopathologie des souris tg 2576.

O

OUKESSOU. M .2014., Synthèse, Dérivation et Evaluation de Pharmacophores Hybrides Alcynyl-TriAzolylCarbinols N-glycosylés :44-45.

P

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

Perkins. A.N., Eckerman. D.A ., Macphail, R.C. (1991). Discriminative stimulus properties of triadimefom: comparison with methylphenidate. Pharmacology Biochemistry and Behavior; **40**: 757–761, 0091-3057.

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

Prim.G.2013.neurobiologie de la peur et de la colère chez l'humain similitudes :06.13.22.84.65.p :14.

R

Reeves. R., Thiruchelvam. M., Cory-Slechta. D.A. 2004. Development of behavioural sensitisation to the cocaine-like fungicide triadimefon is prevented by AMPA, NMDA, DA D1 but not DA D2 receptor antagonists. Toxicol. Sci; **79**: 123–136.

Rostom.A., Shalaby.A.,A. El-Demellawy. 2003. *European Journal of Medicinal Chemistry* ; **38** :959-974.

S

Seidel. K., Marr. KA., Slavin. MA, 2000. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant patients: Long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial *Blood* ;**96**:2055–61.

SHAWALI,A.S.,ABDALLAH.,M-A.,ABBAS.I-M.,EID.G.M .2004.New Regioselective Synthesis and Biological Activity of Substituted 1H-[1,2,4]Triazolo[3,4 c][1,2,4]triazoles .Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Cairo, Giza, Egypt.

W

Walker.Q.D.,Mailman.R.B.1996. Triadimefom and triadimenol: Effects onMonoamine uptake and release. *Toxicology and Applied Pharmacology*; **139**: 227 – 233,

Walker. Q.D., Lewis.M.H., Crofton. K.M. ., Mailman. R.B. 1990. Triadimefom, a triazole fungicide, induces stereotyped behavior and alters monoamine metabolism in rats *Toxicology and Applied Pharmacology*;**102**: 474 – 485

Walsh. TJ., Lutsar. I., Driscoll. T. 2002. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*; **21**:240–8.

Walsh. TJ., Anaissie. EJ., Denning .DW. 2008. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*; **46**:327–60.

WHO (world health organization).2004, Pesticide residues in food – : 358.

Y

Yagisawa. M., Jpn. Med. 2004. Drug discovery in the new era: exploratory research on novel antifungal agents, *Japanese Journal of Medical Mycology* ; **145**:77-81.