## I. Matériel

### 1. Matériel biologique

**Rat wistar**

Pour notre expérimentation, nous avons choisi de travailler sur les rats de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevages El Koubba, Alger). Les rats utilisée sont des rats males blanc Wistar âgés de six semaines et ayant un poids corporel entre 190 et 260 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans les recherches scientifiques.



**Figure 06 :** Rat Wistar (personnel).

### 2. Matériel chimique

Dans ce travail, nous avons utilisé : Exirel

L'exirel est un insecticide anthranilique à base de diamide, il doit être mélangé à l'eau. DuPont Exirel est particulièrement actif contre certains insectes nuisibles suceurs et chicateurs (lépidoptères) **(Álvarez & Juan, 2015).**

## II. Méthodes

### 1. Conditions d'élevage

Pour la réalisation de notre étude pratique, nous avons pris comme modèle biologique 25 rats (*Wistar)*, Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de 60 jours, aux conditions de l'animalerie; à une température de 25°C±2°C et une photopériode naturelle. Étaient mis dans des cages spéciales des rats, celles-ci sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation, et suivie l'alimentation spécifique et l'eau était remplie dans des biberons.

### 2. Mesure du poids

La mesure de poids est effectuée sur les rats tous les jours d'une façon régulière pendant la durée d'élevage, soit au cours d'adaptation ou traitement (avant le traitement) à l'aide de balance(Fig11).

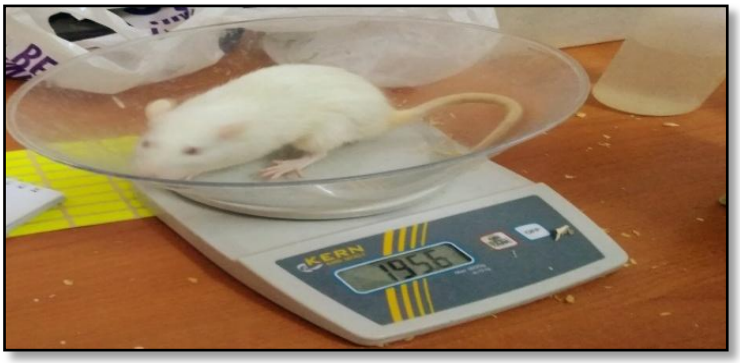



**Figure 07:** Mesure du poids des rats dans laboratoire (personnel).

### 3. Choix des doses

Dans cette étude, nous avons utilisé le pesticide (Exirel) à des doses consécutives de 0.025 mg/kg/j et 0.05 mg/kg /j, 0.075 mg/kg/j et 0.1 mg/kg/j administrées Subchroniquement par voie orale pendant 60 jours. Le choix de ces doses est basé sur des études réalisées sur l'exploration de ce pesticide **(European Food Safety Authority, 2016)** et du calcul par rapport à la DL50 (5000 mg/kg de poids corporelle) identifié selon **(Midori &Douglas, 2013).**

### 4. Traitement des rats

Nos rats sont divisés en 5 lots les suivants :

Lot n°1 : contient 5 rats comme témoin ne subit aucun traitement, gavage par l'eau distillée.

Lot n°2 : contient 5 rats traités par 0.025 mg/kg p.c. par jour d'exirel.

Lot n°3: contient 5 rats traités par 0.05 mg/kg p.c. par jour d'exirel.

Lot n°4 : contient 5 rats traités par 0.075 mg/kg p.c. par jour d'exirel.

Lot n°5 : contient 5 rats traités par 0.1 mg/kg p.c. par jour d'exirel.

Le traitement de nos rats se déroule comme suivante : Après la période d'adaptation nous avons commencé le traitement. Nous pesons les rats chaque jour car ils ont traité selon leurs poids par voie orale à l'aide d'une micropipette variable de 20 à 100µl.

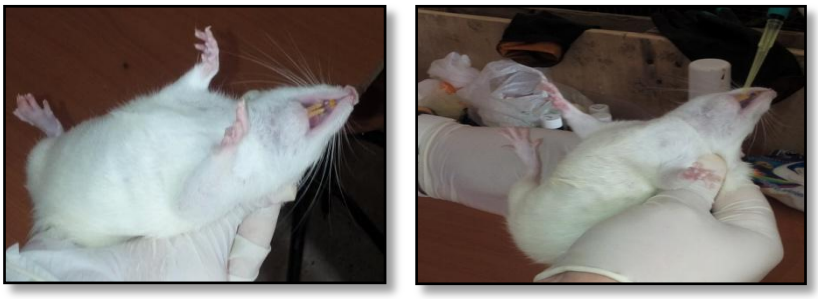


**Figure 08:** Mode de Traitement des rats (personnel).

### 5. Sacrifice et prélèvement du sang

Après 90 jours de traitement les rats 5lots ont été sacrifiés, le sang ont été rapidement collecté dans les tubes spéciaux (1 tube héparine, 1 tube EDTA, 1 tube sec) d'analyse et conservé pour les dosages des différents paramètres biochimiques et hématologiques.

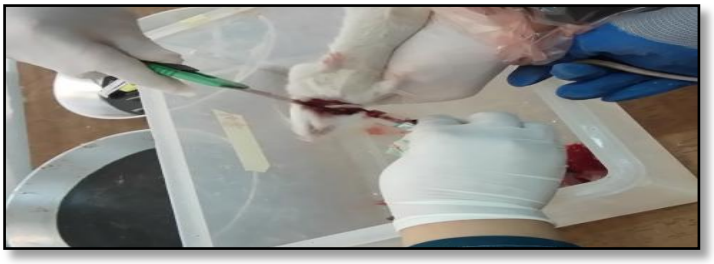


**Figure 09 :** Sacrifice et prélèvement du sang des rats (personnel).

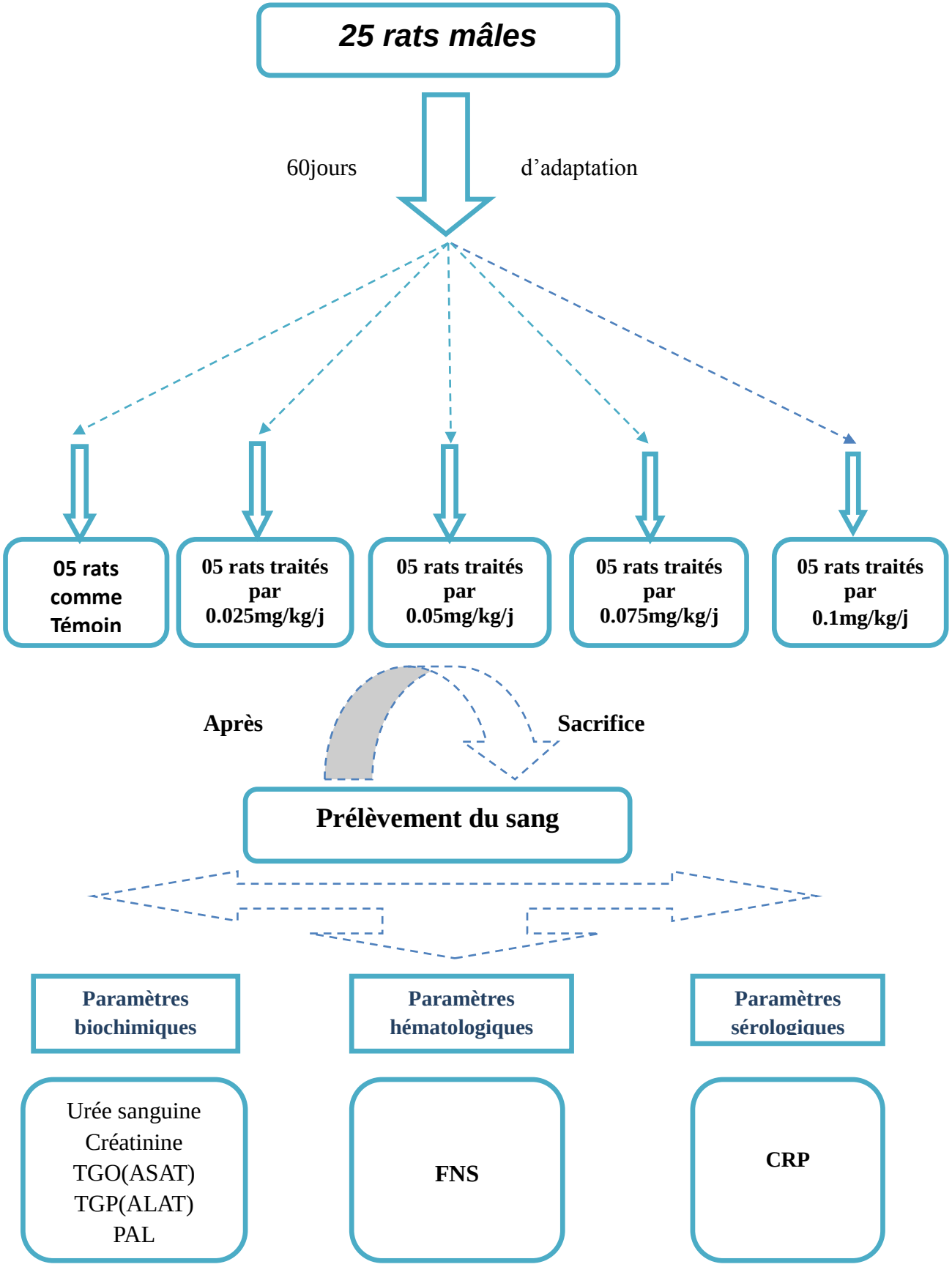



**Figure 10 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

## 6. Méthodes des études hématologiques et biochimiques et sérologiques

### 6.1. Méthodes des études hématologiques

Cette partie a pour objectif de préciser les valeurs des paramètres hématologiques (le nombre des globules rouges, globules blanc et hémoglobine…etc.). Les analyses du sang ont été faites au niveau du laboratoire de « Imadali Messaoudi, Alger ».

#### 6.1.1. Numération des formules sanguines (FNS)

La numération de la formule sanguine est aussi appelée hémogramme. Cet examen comprend le comptage de toutes les cellules ou éléments figurés du sang et étudie certains paramètres particuliers du sang. Il s'agit d'une étude tant quantitative que qualitative.

L'analyse hématologique (FNS) est effectuée par l'auto analyseur de marque mythic 18 Orphée

**Echantillon :** Sang totale.

**Mode opératoire**

- On mélange un tube de prélèvement sanguin
- On ouvert le tube et l'appareil va absorbée une quantité.
- L'appareil d'FNS imprimer une feuille de l'FNS; qui contient tous les information

### 7) Automate Mindray BS-240

#### 7.1) Présentation de l'appareil

Ces automates réalisent des réactions chimiques, enzymatiques ou immunologiques (immunochimiques/enzymatiques) dans le but de doser un composé chimique dans un liquide biologique de l'organisme (sang, urine, liquide d'épanchement ou de ponction).




**Figure 11** : automate d'analyses médicales Mindray BS-240.

### 7.2) Principe

Ces automates réalisent des réactions chimiques, enzymatiques ou immunologiques dans le but de doser un composé chimique dans un liquide biologique de l'organisme

### 7.3) Notion des racks

Les racks sont des portoirs spécialisés à l'automate, chaque rack contient 25 puits capable de fixer 25 tubes pour les échantillons.




**Figure 12 :** exemple de rack (personnel)

Chaque rack est additionné d'un code-à-barre, et ce dernier contient un numéro pour le manipulateur et un autre numéro sous forme d'un code, les deux constituent le même numéro, mais le code est réservé à l'automate puisque ce dernier est doté de rayons laser qui lui permettent de reconnaître le nombre de rack, ainsi que les numéros des tubes fixés sur ce rack.

## 8. Méthodes des études biochimiques et des activités enzymatiques

L'analyse biochimique a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse à 1480 tours/min, pendant10 minutes, pour obtenir le sérum. Celui-ci a été conservé à -20 ° C jusqu'à la détermination des paramètres biochimiques suivants: le glucose, l'urée, la créatinine, l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine aminotransférase (ALAT), la phosphatase alcaline (PAL). Les dosages ont été effectués avec un automate Mindray BS-240 au niveau de laboratoire de « l'établissement publique de la santé de proximité -Bir Alater »

Le kit de réactif de l'urée, le kit de réactif de la créatinine, le kit de réactif de TGO, le kit de réactif de TGP sont achetés du **Spinreact.**

**Bilan rénal**

### 8.1. Dosage de l'urée sanguine

L'urée est le résultat final du métabolisme des protéines; elle se forme dans le foie à partir de biodégradation des protéines. Il peut apparaître un taux d'urée élevé dans le sang (urémie) dans le cadre de régimes excessifs en protéines, de maladies d'insuffisances cardiaques, d'hémorragies, d'hypovolémie et d'obstructions rénales.

La diagnostique clinique doit tenir compte des données cliniques et des données de laboratoire .

- **Principe selon le Spinreact**

L'uréase catalyse l'hémolyse de l'urée, présente dans l'échantillon, en ammoniac (NH3) et en anhydride carbonique (CO2).

Les ions ammonie réagis avec salicylate et hypoclorithe (ClONa), en présence du catalyseur nitroprisuate, pour former un indophénol vert :

$$\text{Urée} + H_2O \xrightarrow[\text{Uréase}]{} 2\,(NH_3) + CO_2$$

$$NH_3 + \text{Salycilate} + NaClO \xrightarrow[\text{Nitroprisuate}]{} \text{Indophénol}$$

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon testé **(Young, 1995)**.

### 8.2. Dosage de la créatinine

La créatinine est le résultat de la dégradation de la créatine, composant des muscles, et peut être transformée en ATP, source d'énergie pour les cellules.

La production de créatinine dépend de la modification de la masse musculaire. Elle varie peu et les niveaux sont généralement très stables.

Elle est éliminée par le rein. Dans le cas d'une insuffisance rénale progressive, une rétention d'urée, de créatinine et d'acide urique se produit dans le sang.

Des niveaux élevés de créatinine indiquent une pathologie rénale.

Le diagnostic clinique doit être réalisé en fonction de l'ensemble des données cliniques et de laboratoire **(Burtis et *al.*, 1999).**

**●Principe selon le Spinreact**

Le test de la créatinine repose sur la réaction de la créatinine en contact avec le picrate de sodium, tel que décrit par Jaffé.

La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe rougeâtre. L'intervalle de temps choisi pour les lectures permet d'éliminer la plupart des interférences connues de la méthode.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans l'échantillon testé **(Murray et *al.*, 1984).**

**Bilan hépatique**

### 8.3. Dosage des transaminases

Les transaminases sont des enzymes contenues essentiellement dans le foie et les muscles, mais aussi les reins et le cœur.

- **Aspartate aminotransférase (TGO)**

L'ASAT est une enzyme intracellulaire, qui se trouve en grandes quantités dans les muscles du cœur, les cellules du foie, les cellules du muscle squelettique et en plus faibles quantités dans les autres tissus. Bien qu'un niveau élevé d'ASAT dans le sérum ne soit pas caractéristique d'une maladie hépatique, elle s'emploie principalement pour les diagnostics et le suivi, avec d'autres enzymes telles que l'ALAT et l'ALP. Elle s'utilise également dans le cadre du contrôle post-infarctus, chez les patients souffrant de troubles musculaires du squelette et dans certains autres cas.

**●Principe selon le Spinreact**

Aspartate aminotransférase (ASAT) initialement appelée transaminase glutamate oxaloacétate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminique de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malate en présence déshydrogénase (MDH) et NADH:

$$\text{Aspartate} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{ASAT}} \text{Glutamate} + \text{Oxalacetate}$$

$$\text{Oxalacetate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malate} + NAD^+$$

La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photo numériquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ASAT dans l'échantillon **(Murray et *al*., 1984).**

- **L'alanine aminotransférase(TGP)**

L'ALAT est une enzyme intracellulaire, qui se trouve principalement dans les cellules du foie et des reins.

Son meilleur avantage est le diagnostic de maladies du foie. On l'observe en grandes quantités dans le cadre de maladies hépatiques, telles que l'hépatite, les maladies du muscles et des infarctus du cœur, étant donné que la valeur de l'ALAT reste dans les limites standards et augmente dans les niveaux de ASAT.

**●Principe selon le Spinreact**

L'alanine aminotransférase (ALAT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique d'alanine vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et NADH:

$$\text{Alanine} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{ALAT}} \text{glutamate} + \text{Pyruvate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactate} + NAD^+$$

La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALAT dans l'échantillon **(Murray et *al*., 1984 ).**

### 8.4. Dosage de phosphatase alcaline

Les phosphatases alcalines sont des enzymes qui sont présentes dans presque tous les tissus de l'organisme, en étant particulièrement élevées dans les os, le foie, le placenta, les intestins et les reins.

**●Principe selon le Spinreact**

La phosphatase alcaline (PAL) catalysé le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1- propanol en libérant du p-nitrophénol et du phosphate, selon la réaction suivante:

$$\text{p-Nitrophénylphosphate} + \text{AMP} \xrightarrow{\text{PAL}} \text{p-Nitrophénol} + \text{Phosphate}$$

La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé **(Young, 1995)**.

**Bilan diabétique**

### 8.5. Dosage de la glycémie

Le glucose est la plus grande source d'énergie pour les cellules de l'organisme ; l'insuline facilite l'entrée de glucose dans les cellules.

Le diabète est une maladie qui se manifeste par une hyperglycémie, causée par un déficit d'insuline.

**●Principe selon le Spinreact**

La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation de glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) produit se détecte avec un accepteur chromogène d'oxygène, phénol, 4–aminophénazone (4- AF), en présence de la peroxydase (POD):

$$\text{§-D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Phénol} + \text{4-AF} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Quinone} + H_2O$$

L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans l'échantillon testé **(Trinder, 1969).**

### 9. Méthodes des études Sérologiques

La sérologie est l'étude du sérum, c'est-à-dire le sang débarrassé de ses cellules et de certains constituants. La plupart du temps, il a l'aspect d'un liquide transparent et jaunâtre.

- **CRP (Protéine c-réactif)**

CRP est une protéine en phase aigüe présente dans le sérum normal et qui s'accroît sensiblement dans: les bactéries (p.ex. pneumocoques) et les infections fongiques, l'inflammation; les blessures du tissu et le néoplasie maligne. Au cours de la nécrose du tissu et des inflammations qui résultent des infections microbiennes, la concentration en CRP peut s'élever à 300 mg/L en 12-24 heures

- **Principe**

Le CRP LATEX est un test rapide au latex pour la recherche de la Protéine C Réactive (CRP). Les particules de latex, sensibilisées avec des anticorps spécifiques de la CRP humaine, sont agglutinées en présence de sérum de patient contenant la CRP.

**Mode opératoire**

- on pose sur la bloque CRP 5µl de sérum,
- on ajout une goutte de réactif et on mélange immédiatement pendant 2 min,
- on obtient le résultat.

- **Lecture**

**Réaction négative :** La suspension reste homogène,

**Réaction positive :** agglutination nette en 2 minutes. La sensibilité du test CRP LATEX étant de 6 mg/l. Les sérums donnant une réaction positive ont une concentration supérieure à 6mg/l de CRP **(Young, 1995)**.

### III. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard. Après analyse de la variance « ANOVA » la comparaison des moyennes est réalisée par le test de « Dunnett » entre lot témoin et les groupes traités. Cette analyse est réalisée grâce au logiciel Minitab, version 17. Les différences sont considérées significatives à $P < 0,05$.