



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi-Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de : Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Science de la nature et de la vie

Filière: Sciences biologiques

Spécialité : Analyses Toxicologiques et Biochimiques

Thème :

*Etude Toxicologique des huiles
essentielles du fenouil*

Présenté Par :

Hamzi Souad

Hamla Soulef

Devant le jury :

Me Hammoum Zakia. M.A.A Université Larbi Tébessi-Tébessa-Présidente

Pr. Djabri Belgacem. Prof Université Larbi Tébessi-Tébessa-Rapporteur

Me Farhi Salma. M.A.A Université Larbi Tébessi-Tébessa-Examinatrice

Date de soutenance :

Note : 16/20

Mention : très bien

Remerciement

Nous exprimons nos profondes gratitudes avant tout à notre Dieu qui nous a donné l'énergie et la patience pour commencer et compléter ce travail.

Nous remercions du fond du cœur notre encadreur : Pr.Djabri Belgacem. Pour son aide et les précieux conseils qu'il nous a apportés.

Nous remercions grandement les membres de notre jury : A commencer par Me Hammoum Zakia, nous sommes très honorées de vous compter parmi les membres de notre jury et pour avoir bien voulu juger ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciement à Me Farhi Salma. D'avoir examiné notre travail et sa gentillesse.

Nous remercions tous les personnels de laboratoire et de la bibliothèque universitaire de Tébessa département de biologie.

*Aussi nous remercions doctorante **Loubna.M***

En fin, nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidé pré ou de loin à l'établissement de ce modeste mémoire de fin de cycle.

Merci

Dédicace

Au non du dieu le miéricoedieu par essence et par excellence.

Je dédie ce modeste travail, fruit de mes années à l'université atoute personne qui a été toujours là pour moi tout au long de mes études et qui ma donné un magnifique modèle de labeur et persévérance :

A ma cher mère Djem3aqui m'a coloeé ma vie et m'offert l'amour, le courage, la patience et qui n'avoire jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'étude ;

. Voici Abe Racine de la Terre à la sueur de son front afin de loger conducteur à la réussite de Cindy était mon soutien et ma force, a chère père Goudjile dieu

a mes deux chers frères halim et haithem.

*A mon chérie et bigeux de ma vie **mourad** et tous sa fammille Laouini.*

A tous mes oncles et mes tantes et à ancle lbahi. kourdass, lhemami, hamza,

A mes proches amis , Sana, Naima, lamia, yasmine, elarfa, Saida, , zakiya, nora, layla, karima, ... et tous qui connue souad de loin au broche. et ma binome et proche amie Soulef et tous les autres amis que je n'ai pas pu citer.

A toute les membres de ma famille Hamzi.

*Je n'oublierai as de dédier ce travail à tous mes camarades qui m'ont accompagnée durant tout mon parcours universitaire. surtout **2emme année master toxicologie.***

souad



Je dédie ce modeste travail, fruit de mes années à l'université à toute personne qui a été toujours là pour moi tout au long de mes études Je dédie ce mémoire

*A mon père **Abdrzak** et ma cher mère **Yamina** qui mon donné toujours le courage, la patience et qui n'avoire jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'étude.*

*A mes chères sœurs **Aida ,Samra,Nawel, Sihem** et mesfrères*

Issam,Boujo,Salim,kamel,Houssem** et tous mes amies qui connue **Soulef** de loin au broche et ma proche amie **souad

*A toute les membres de ma famille **HAMLA**.*

Soulef



ملخص.

تهدف دراستنا لتقييم السمية الناجمة عن الزيوت الأساسية لبذور البسباس على نموذج بيولوجي الحلزون اللولبي *Helix aspersa*. سعينا لتقييم التأثيرات السامة في الدماغ وعلى مستوى البكرياس الكبدي ، من خلال مراقبة نشاط بعض المؤشرات الحيوية الكيمياء والأنزيمية .كما تم تأكيد السمية على مستوى الدماغ من خلال قياس نشاط أستيلكولين استيراز (AChE).

تم تعريض الحلزونات لجرعات متزايدة (0 الشاهد ، 0.5 ، 01 ، 02،04 ، 1Kg/μl من الحلزون) من الزيوت الأساسية للبسباس معويا، وذلك خلال فترة العلاج شبه المزمدة 21 يوما. نلاحظ زيادة في نسبة البروتين والسكريات مع انخفاض ملاحظ في مستويات الدهون .بالإضافة إلى ذلك، زيادة نشاط GST ،CAT، وانخفاض في مستويات GSH تظهر بالمقارنة مع جرعات الزيوت الأساسية للبسباس. في النهاية، الزيوت الأساسية للبسباس تظهر سمية تؤدي الى اضطرابات المؤشرات الكيميائية والأنزيمية وعلى مستوى الدماغ .

كلمات مفتاحية : الزيوت الأساسية للبسباس، الحلزون اللولبي، *Helix aspersa*، المؤشرات البيوكيميائية، المؤشرات الأنزيمية، السمية العصبية، الاجهاد التاكسدي.

ABSTRACT

Our study aimed to evaluate the toxicity induced by essential oils of fennel on a biological model that is in this case *Helix aspera* in a general frame work of preservation of human health related to their use. We sought to evaluate the toxic effects at the cerebral and hepato-pancreatic levels by monitoring the activity of certain biochemical biomarkers (proteins, lipids and carbohydrates) and enzymes (GST, GSH, and CAT). On the other hand, the neurotoxicity of fennel has been confirmed by the measurement of acetylcholineesterase (ache) activity.

The snails were exposed to increasing doses (0 controls, 0.5, 01, 02, 04 μ l /1kgthe snails) of the hes of fennel by digestive tract, during a period of sub-chronic treatment of 21 days. an increase in the associated protein and carbohydrate rate and adecrease in lipid levels was observed in this study. In addition, an increase in the activities of the GST, CAT, and a decrease in GSH levelswereshownap pears in relation to the doses of theses fennel, which also induce oxidative stress by activating the detoxification system.

In the end, the hes of fennelalso show neurotoxicinducing biochemical and enzymatic disturbances at the cerebral level. The use of essential oils of fennel is not without risk. It must be done with caution.

Keywords: Essential oils of fennel, *helixaspera*, bio-chemical markers, organic markers, neurotoxicity, oxidative stress.

Résumé

Notre étude a pour objectif l'évaluation de la toxicité induit par les huiles essentielles de fenouil sur un modèle biologique *Helixaspersa*. Nous avons cherché à évaluer les effets toxiques au niveau cérébral et hépato-pancréatique, par le suivi de l'activité de certains bio-marqueurs biochimiques et enzymatique. Aussi la neurotoxicité d'HEs de fenouil a été confirmée a travers la mesure de l'activité d'Acétylcholine estérase (AChE).

Les escargots ont été exposés à des doses croissantes (0 témoin, 0.5, 01, 02, 04 µl/ 1 kg d'escargot) des HEs du fenouil par voie digestive, durant une période de traitement sub-chronique de 21 jours. En effet, une augmentation du taux des protéines et de glucides associée et une diminution du taux des lipides a été observée dans cette étude. En plus, une augmentation des activités de la GST, CAT, et une diminution du taux de GSH ont été apparais apparait par rapport les doses des HEs du fenouil.

Enfin, les HEs du fenouil montrent également une toxicité induisant des perturbations biochimiques et enzymatiques au niveau cérébral.

Mots clés : Huiles essentielles de Fenouil, *Helixaspersa*, bio marqueurs biochimiques, bio marqueurs enzymatique, neurotoxicité, stress oxydants.

Table des matières

Remerciements.

ملخص

Abstract.

Résumé.

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Liste des Photos.

Liste des abréviations.

Introduction.

Chapitre 01 : Présentation d'espèces de plante étudiée

I. Généralités sur le fenouil	4
I.1. Description morphologique.....	4
I.2. Classification botanique.....	5
I.3. Origine et répartition géographique	5
I.4. Compositions du fenouil	6
I.5. Utilisation des graines du fenouil.....	6

Chapitre 02 : Les huiles essentielles du fenouil

II. Les huiles essentielles du fenouil.....	9
II.1. Définition	9
II.2. Localisation	9
II.3.Extraction et rendement.....	9
II.4. Caractéristiques physico-chimiques	9
II.5. Composition chimique	10
II.6. Utilisation des huiles essentielles des graines du fenouil.....	11
II.7. Toxicité des huiles essentielles du Fenouil.....	12
II.7.1.Toxicité spécifique d'organe	12
II.7.1.1. Toxicité cutanée	12
II.7.1.1.1. Dermocausticité	12
II.7.1.1.2. Phototoxicité.....	13
II.7.1.1.3.Allergie de contact	13
II.7.1.2.Toxicité pulmonaire	13
II.7.1.3.Toxicité cardiovasculaire.....	14

Table des matières

II.7.1.4. Toxicité rénale	14
II.7.1.5. Toxicité digestive	14
II.7.1.6. Toxicité hépatique	14
II.7.1.7. Neurotoxicité	15
II.7.1.8. Toxicologie de la reproduction	15
II.7.1.8.1. Gestation	16
II.7.1.8.2. Embryotoxicité	16
II.7.1.8.3. Foetotoxicité	16
II.7.1.9. Cancérogénicité	16

Chapitre 03 : Modèle biologique (*Helix aspersa*)

III. Biologie et Physiologie d' <i>Helix aspersa</i>	19
III.1. Morphologie	19
III.2. Anatomie de l'escargot	20
III.3. L'espèce en milieu naturel	20
III.4. Rythme d'activité	21
III.5. Hibernation et estivation	21
III.6. Croissance	21
III.7. Reproduction	22

Chapitre 04 : Matériels et méthodes

I. Matériel et méthodes	24
I.1. Matériel	24
I.1.1. Matériel végétal	24
I.1.2. Matériel animal	24
I.2. Méthodes	25
I.2.1. Extraction des huiles essentielles	25
I.2.2. Rendement	26
I.2.3. Condition d'élevage	26
I.2.4. Mode de traitement	27
I.2.5. Sacrifice et dissection des escargots	27
I.2.6. Analyse des paramètres biochimiques	28
I.2.6.1. Dosage des métabolites contenus dans l'hépatopancréas (protéines, lipides et glucides)	28
I.2.6.1.1. Dosage des protéines	30

Table des matières

I.2.6.1.2. Dosage des lipides	30
I.2.6.1.3. Dosage des glucides	30
I.2.7. Analyse des paramètres enzymatiques.....	31
I.2.7.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	31
I.2.7.2. Dosage du glutathion (GSH).....	32
I.2.7.3. Dosage de l'activité acétylcholinestérase(AChE).....	32
I.2.7.4. Dosage de l'activité catalase(CAT)	33
I.2.7.5. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase(GST)	34
I.3. Analyse statistique des résultats.....	35

Résultats et Discussion

II. Résultats	37
II.1. Rendement du fenouil en huiles essentielles	37
II.2. Effets des huiles essentielles sur les paramètres biochimiques.....	37
II.2.1. Effet sur le taux des protéines	37
II.2.2. Effet sur le taux des lipides	38
II.2.3. Effet sur le taux des glucides.....	39
II.3. Analyse des paramètres enzymatiques	39
II.3.1. Évolution du taux de malondialdéhyde (MDA).....	39
II.3.2. Évolution du taux de glutathion(GSH).....	40
II.3.3. Évolution du taux d'Acétylcholinestérase (AChE)	41
II.3.4. Évolution d'activité de catalase (CAT).....	41
II.3.5. Évolution de l'activité de Glutathion -S- Transférase (GST).....	42
III. Discussion	43
III.1. Rendement du fenouil en huiles essentielles	43
III.2. Effets des huiles essentielles sur les paramètres biochimiques et enzymatiques	43
III.2.1. Analyse des paramètres biochimiques	44
III.2.1.1. Effet sur le taux des protéines.....	44
III.2.1.2. Effet sur le taux des lipides.....	44
III.2.1.3. Effet sur le taux des glucides.....	45
III.2.2. Analyse des paramètres enzymatiques	45
III.2.2.1. Évolution du taux de malondialdéhyde (MDA).....	46
III.2.2.2. Évolution du taux de glutathion(GSH).....	46
III.2.2.3.Évolution du taux d'Acétylcholine estérase (AChE)	47

Table des matières

III.2.2.4. Évolution du taux du catalase (CAT)	47
III.2.2.5. Évolution du taux de glutathion(GST)	48
Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	53
Annexes.....	65

Liste des Tableaux

N^odu Tableaux	Titre	Page
01	Composition moyenne pour 100 g pour Fenouil.	06
02	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Foeniculum vulgare</i> .	10
03	Liste de métabolites époxydes potentiellement toxiques.	17
04	Description des 4 phases de croissance d' <i>Hélix aspersa</i> .	22
05	Rendements obtenus en huile essentielle extraite des graines du fenouil dans différents pays.	43
06	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines aux niveaux d'hépatopancréas.	64
07	Dosage des protéines: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.	64
08	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides aux niveaux d'hépatopancréas.	65
09	Dosage des lipides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.	65
10	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides aux niveaux d'hépatopancréas.	67
11	Dosage des glucides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.	67

Liste des figures

N° de la figure	Titre	Page
01	<i>Foeniculum vulgare</i> ou fenouil.	04
02	Grains et feuilles du <i>Foeniculum vulgare</i> .	05
03	Structure chimique du trans-anethole (a), de l'estragole (b) et du fenchone(c).	11
04	Petit-gris (<i>Hélix aspersa</i>) vu de haut.	19
05	Anatomie de l'escargot.	20
06	Extraction des glucides, protéines et lipides totaux.	29
07	Variation de concentrations de protéines (mg/L) aux niveaux de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	37
08	Variation de concentrations de lipides (mg/L) aux niveaux de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	38
09	Variation de concentrations de glucides (mg/L) aux niveaux de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	39
10	Variation de concentrations de l'MDA (μM / mg de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	40
11	Variation de concentrations de GSH (μM /mn/mg de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	40
12	Variation de taux de l'activité spécifique de l'AChE (μM /mn/mg de protéines) au niveau de la tête chez <i>Helix aspirsa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	41

Liste des figures

13	Variation de concentrations de CAT ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	42
14	Variation de concentrations de GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Hélix aspersa</i> après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.	42
15	Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).	64
16	Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).	65
17	Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).	66

Liste des Photos

Nº de photo	Titre	Page
01	Les graines sèches du fenouil.	24
02	<i>Helix aspersa.</i>	25
03	Procédés d'hydro-distillation.	25
04	L'élevage des escargots dans le laboratoire.	26
05	Etapas de la dissection des escargots.	27
06	Prélèvement des organes (la tête et l'hépatopancréas).	28

Liste des abréviations

HE	Huiles Essentielles.
GST	Glutathion-S-transférase.
IFRA	International Fragrance Association.
COVs	Composés Organiques Volatiles.
G6PD	Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase.
prot	Protéines.
CAT	Catalase.
MDA	Malondialdehyde.
_NH₂	Goupements amines.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
NaCl	Chlorure de sodium.
PH	Potentiel hydrogène.
ROS	Espèces Réactives Oxygénées.
SOD	Superoxyde dismutase.
TBS	Tris-buffered saline.
TCA	Trichloroacétique.
TNB	Acide 5-thio-nitrobensoïque.
UV	Ultraviolet.
V_t	Volume totale.
V_h	Volume du l'homogénat.
µl	Microlitre.
AChE	Acétylcholinestérase.
DTNB	Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïde.
-SH	Groupements Thiols.
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique.
ASS	Acide sulfoosalicylique.
CDNB	1-chloro-2-4 dinitrobenzène.
TBA	l'acide thiobarbiturique.
GPx	GlutathionPeroxydase.
GSH	Glutathion réduit.

Introduction

INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, non seulement pour se nourrir, mais aussi pour soulager ses souffrances, guérir et soigner les maladies qui nuisent à la santé. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs : alcaloïdes, flavonoïdes, amines, ...et huiles essentielles **(Withil et Anton, 1999)**.

La famille d'*Apiaceae* appelés anciennement *Ombellifères*, comprend des plantes alimentaires telles que fenouil, dont ces graines ont plusieurs utilisations (culinaires, pharmaceutiques, etc...). Cette famille est caractérisée par une richesse particulière en huiles essentielles **(Lazouni et al.,2006)**.

Les huiles essentielles, sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense. Aussi qu'ils sont un mélange de composés lipophiles, volatiles, et souvent liquides synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Elles contiennent en moyennes 02 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes (monoterpènes) et parfois plus complexes telles que les sesquiterpènes **(Hélène et Nadine, 2007)**.

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé. Ils ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque, comme tous les produits naturels. Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines) **(Yasmine et al., 2014)**.

Pour réaliser des études toxicologiques, il est nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent. L'escargot (*Helix aspersa*) constitue un modèle biologique largement utilisé dans les études toxicologiques **(Little et al., 1990)**.

Ce travail de recherche a pour objectif d'évaluer la toxicité induite par les huiles essentielles de fenouil en estimant leurs effets sur les paramètres, biochimiques et enzymatiques chez un gastéropode terrestre l'escargot *Helix aspersa*.

*Chapitre 01 :Présentation
d'espèces de plante étudiée*

I. Généralités sur le fenouil

Le fenouil (*Foeniculum vulgare*) est une herbe avec une grande histoire d'utilisations médicinales et culinaires (Hendawy *et al.*, 2010). Le nom de *Foeniculum* a été donné à cette plante par les Romains et est dérivé du mot latin *foenum*, c'est-à-dire herbe (Kaur et Arora, 2010). Il était bien connu aux anciens et a été cultivé par les Romains antiques pour ses graines aromatiques (Vienna *et al.*, 2005). Le fenouil est communément appelé "besbes" par les populations locales. Ses huiles essentielles sont très utilisées par les industries pharmaceutique, cosmétique et également alimentaire (Lazouni *et al.*, 2007).



Fenouil : le légume.



Fenouil : la plante en fleur.

Figure 01 : *Foeniculum vulgare* ou fenouil (www.wikipedia. Fichier: *Foeniculum_vulgare.com*).

I.1. Description morphologique

Le fenouil est une herbe aromatique semblable dans l'aspect à l'aneth (Murdock, 2002), bisannuelle. Les tiges sont droites, jaunâtre-vertes pâles, sillonnées et embranchées et s'élève jusqu'à 80 à 200 cm de longueur (Vienna *et al.*, 2005; Kaur et Arora, 2010). Les feuilles élèvent jusqu'à 40 cm de longueur. Elles sont finement disséquées, avec des segments finaux filiformes, environ 0,5 mm de largeur (Vienna *et al.*, 2005). Les fleurs sont produites dans les ombelles, composés terminaux de 5 à 15 cm de largeur. Chaque section d'une ombelle contient 20 à 50 fleurs jaunes claires minuscules sur des courts pédicules (Stefanini *et al.*, 2006).

Les graines de fenouil varient infiniment en longueur, largeur, goût et d'autres caractères. En général, ils ont une forme presque cylindrique avec une base arrondie et un sommet plus étroit couronnés avec un grand stylopode. Ce sont généralement de 3 à 12 mm

Chapitre 01 : Présentation d'espèces de plante étudiée

de longueur et de 3 à 4 mm de largeur (Vienna *et al.*,2005) avec une odeur forte et douce et sont vert bleu d'abord, puis, elles se transforment en brun verdâtre quand ils sont mûris (Kaur etArora, 2010).



Figure 02:Grains et feuilles du *Foeniculum vulgare*(Vienna *et al.*, 2005).

I.2. Classification botanique

Le fenouil appartient à la famille *Apiaceae* (ou *Ombellifères*), cette dernière est considérée l'une des familles riche en huiles essentielles.Son nom scientifique est *Foeniculum vulgare*(Vienna *et al.*,2005).

✓ Règne	Plantae
✓ Division	Magnoliophyta
✓ Classe	Magnoliopsida
✓ Sous-classe	Rosidae
✓ Ordre	Apiales
✓ Famille	Apiaceae
✓ Genre	Foeniculum

I.3. Origine et répartition géographique

Foeniculum vulgare, est une plante originaire de l'est du bassin méditerranéen, il est distribué en Europe Centrale et la région méditerranéenne (Vienna *et al.*, 2005). Il est largement cultivé dans toutes les régions tempérées et tropicales du monde, et est employé comme épice culinaire (Singh *et al.*, 2006).Le fenouil est également trouvé aujourd'hui en

Chapitre 01 : Présentation d'espèces de plante étudiée

Iran, Inde, Indonésie, Pakistan, Japon et en Chine. Il est cultivé à large échelle en Egypte, Inde, Chine, Australie et en Europe en France, l'Allemagne, la Hongrie et la Pologne (Garnéro, 1996; Vienna *et al.*, 2005).

I.4. Compositions du fenouil

Foeniculum vulgare contient 6,3% d'humidité, 9,5% de protéines, 10% de matières grasses, 13,4% de minéraux, de fibres et de 18,5% à 42,3% de glucides. Les minéraux et les vitamines présentes dans *Foeniculum vulgare* sont le calcium, le potassium, le sodium, le fer, le phosphore, l'athiamine, la riboflavine, la niacine et la vitamine C (Rather *et al.*, 2012). Le **tableau 01** présente la composition moyenne dans 100 gramme de fenouil.

Tableau 01 : Composition moyenne pour 100 g pour Fenouil (EFSA, 2009).

Eau	86 g
Valeur calorique	24 kcal
Protides/Glucides/Lipides	
Vitamines	
Vitamine C	93 mg
Sels minéraux	
Calcium	109 mg
Potassium	494 mg
Magnésium	49 mg
Acides gras	
Acides aminés essentiels	
Divers	

I.5. Utilisation des graines de fenouil

Les parties utilisées en phytothérapie sont les racines, les fruits ou les graines et les sommités florales.

Les graines sèches de fenouil ont un goût aromatique et sont utilisées pour assaisonnement des potages et des sauces (Hendawy *et al.*, 2010). Ils sont utilisés aussi pour

Chapitre 01 : Présentation d'espèces de plante étudiée

assaisonner des boissons alcoolisées, pain, poisson, salade, fromage et pour la fabrication des conserves au vinaigre (**Vienna et al., 2005; Zahid et al., 2009**).

Le fenouil est utilisé comme carminatif (**Kothe, 2008; Zahid et al., 2009**), stimulant l'appétit, stomachique et diurétique. Les propriétés analgésique, anti-diarrhéique, antispasmodique, antipyrétique et anti-inflammatoire ont été également rapportées par plusieurs auteurs (**Tanira et al., 1996; Pradhan et al., 2008**).

Les principes actifs contenus dans le fenouil sont : l'Anéthol (80% de la composition de l'huile essentielle) qui possède des caractéristiques antibactérienne et antimycosique. Le fenchone (antispasmodique), l'alpha-pinène, le camphène, le limonène, la phellandrène, la pectine, les sucres, l'oxalate de calcium et l'amidon. Le fenouil est caractérisé également par une haute teneur en fibres, en vitamine C, en provitamine A et en carotène (**Amimar et al., 2001**).

*Chapitre 02 : Les huiles
essentielles du fenouil*

II. Les huiles essentielles du fenouil

II.1. Définition

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatiles et odorants, appelées également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices, elles sont volatiles et sensibles à l'effet de la chaleur (Bakkali *et al.*, 2008).

II.2. Localisation

Les huiles essentielles du fenouil sont principalement concentrées dans les méricarpes des graines (Stefanini *et al.*, 2006a). Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des canaux sécréteurs (Bruneton, 1993), et sont présentes sous forme de vésicules minuscules localisées entre les cellules, où elles agissent en tant qu'hormones, régulateurs et catalyseurs dans le métabolisme végétal (Mohamed et Abdu, 2004).

II.3. Extraction et rendement

Les huiles essentielles des graines sèches et mûres du fenouil sont obtenues par hydrodistillation (Vienna *et al.*, 2005) et par entraînement à la vapeur (Clarke, 2008; Garnéro, 1996). L'huile essentielle obtenue par cette dernière méthode est référée en tant que « huile de fenouil », utilisée dans les pays occidentaux pour l'assaisonnement (Singh *et al.*, 2006). Selon le matériel, la variété, l'origine, le lieu de production et d'autres facteurs extrinsèques et intrinsèques, le rendement en huile essentielle des graines du fenouil varie de 2,5 à 6 % avec une moyenne de 3,5 % (Garnéro, 1996 ; Kaur et Arora, 2010).

Les huiles essentielles aident la plante à s'adapter à son environnement, par conséquent, les plantes les produisent en quantité plus élevée quand elles sont cultivées dans des conditions extrêmes (Olle et Bender, 2010).

II.4. Caractéristiques physico-chimiques

Le **tableau 02** récapitule les principales caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle des graines de *Foeniculum vulgare*. L'huile essentielle du fenouil obtenue par extraction est un liquide limpide, fluide et ayant une odeur particulièrement anisée et âcre, un goût amer et couleur jaune claire à jaune foncé, plus ou moins soutenu.

Chapitre 02. Les huiles essentielles du fenouil

A titre indicatif, la densité est de 0,879 et indice de réfraction est de 0,889 à 0,921, et le pouvoir rotatoire est de + 20° à + 68°. Ces trois indices physiques sont importants pour déceler les fraudes éventuelles pour l'expression du niveau de qualité de l'huile essentielle (**Lambert, 2010**).

Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* (**Garnéro, 1996**).

HES de fenouil	Caractères
Aspect	Liquide mobile, limpide. Couleur jaune pâle. Odeur aromatique anisée, épicée, légèrement camphrée.
Densité d	0,889 à 0,921
Indice de réfraction n_{20}	1,484 à 1,508
Pouvoir rotatoire α_{20}	+ 20° à + 68°

II.5. Composition chimique

Les proportions des constituants de l'huile essentielle des graines du fenouil dépendent des facteurs extrinsèque et intrinsèque comme : les conditions climatiques et environnementales, la saison de collection, l'étape de la maturation des fruits, les données génétiques... etc (**Özcan et Akgül, 2001** ; **Mimica-Dukic et al., 2003** ; **Singh et al., 2006**). Quelque soit la variété de fenouil, les principaux constituants de l'huile essentielle des graines du fenouil sont : **le Trans-anéthol, le Fenchone, l'Estragole et le Limonène**.

Le trans-anéthol compte pour le goût d'anis. L'estragole fournit la douceur, alors que le fenchone donne le goût amer (**Stefanini et al., 2006 a**; **Olle et Bender, 2010**). Le fenchone est un liquide sans couleur possédant une odeur et un goût piquants et camphrés, ce serait le constituant responsable des propriétés biologiques, par conséquent seulement les variétés de fenouil contenant une bonne proportion de fenchone convient pour exploiter leurs activités biologiques (**Vienna et al., 2005**).

D'autres hydrocarbures monoterpéniques sont également présents en proportions mineurs : l' α et le β fenchène, l' α -pinène, le camphène, le sabinène, le terpinolène, le δ -3-carène, les α et β phellandrène, le *cis* et le *trans* ocimène, le limonène ; le linalol ; le camphre ;

Chapitre 02. Les huiles essentielles du fenouil

le terpin-1-én-4-ol; le foeniculine ; l' α -terpinéol, l'aldéhyde anisique, etc... (Garnéro, 1996; Silano et Delbò , 2008;Clarke, 2008; Chowdhury *et al.*,2009; Ebeed *et al.*, 2010).

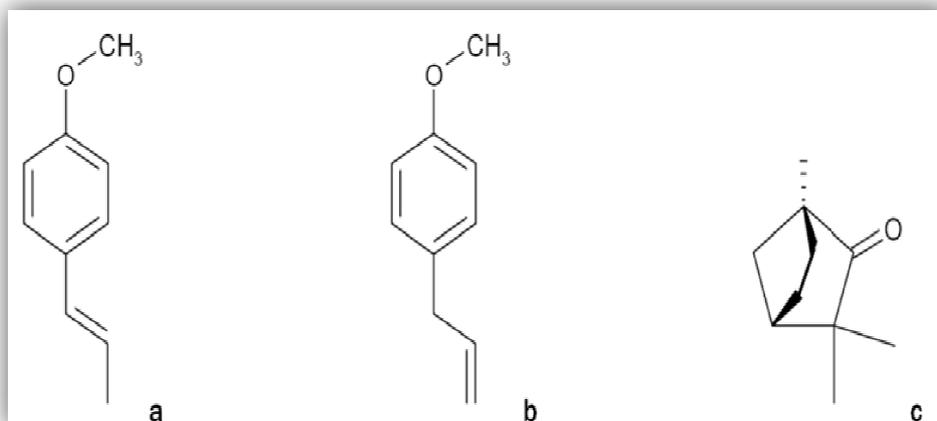


Figure 03 : Structure chimique du trans-anethole (a), de l'estragole (b) et du fenchone(c) (Vienna *et al.*, 2005).

II.6. Utilisation des huiles essentielles des graines du fenouil

Les huiles essentielles des graines du fenouil sont employées en tant qu'aromatisants dans des produits alimentaires comme constituants des produits pharmaceutiques et cosmétiques (Aprotosoiaie *et al.*, 2010). Elles sont également employées pour assaisonner les aliments préparés comprenant de la viande, de la crème glacée, de la sucrerie, des boissons non alcooliques, etc. Plusieurs composants de l'huile essentielle de cette plante ont des applications importantes, à savoir (Stefanini *et al.*, 2006b).

- **Le fenchone** est employé comme contre-irritant.
- **Le limonène** est employé comme agent de dissolvant, de résines, de mouillage et de dispersion.
- **Le trans-anéthol** est employé comme aromatisant en parfumerie, en produits de beauté, dans le savon.
- **L'estragole** (méthyle-chavicol) est employé en parfumeries et comme saveur dans les aliments et boissons alcoolisées.
- **L' α -pinène** est utilisé dans la fabrication du camphre, des insecticides, de dissolvants et comme bases des parfums.

II.7. Toxicité des huiles essentielles du Fenouil

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé. Il est ainsi important de connaître le produit, le choisir selon des critères qualitatifs rigoureux (produit de qualité non falsifié, non contaminé par des pesticides), de respecter scrupuleusement les doses et de choisir le mode d'administration adéquat, et ce afin d'éviter la survenue d'effets indésirables, voire même des interactions avec d'autres médicaments.

Ainsi, les huiles essentielles peuvent s'avérer allergisants, photosensibilisants, cytotoxiques, irritants, néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques... (Bruneton, 1999).

II.7.1. Toxicité spécifique d'organe

II.7.1.1. Toxicité cutanée

Les réactions cutanées sont les plus répandues compte tenu de l'emploi majoritaire de la voie cutanée en aromathérapie. Ces réactions de plusieurs types sont souvent difficiles à prévenir (Hélène et Nadine, 2007). La réaction cutanée dépend de nombreux facteurs :

- Le lieu d'exposition
- La surface exposée
- La fréquence et la durée d'exposition
- La quantité et la concentration
- L'intégrité de la peau (présence d'inflammation ou d'autre maladie)
- Les facteurs environnementaux comme la lumière (ultraviolets) la température et l'humidité.

II.7.1.1.1. Dermocausticité

La dermocausticité se définit comme une agression de la peau comparable à une brûlure pouvant aller jusqu'à la nécrose. La dermocausticité peut apparaître dès la première utilisation mais son intensité dépend de la concentration de l'HE utilisée. On observe principalement ses effets avec les HEs contenant des phénols comme le thymol, le carvacrol, l'eugénol, etc. Des irritations peuvent toutefois survenir avec les HEs à aldéhydes (citral, aldéhyde cinnamique, etc.) comme la cannelle, le lemongrass, la verveine citronnée (Yasmine *et al.*, 2014).

II.7.1.1.2. Phototoxicité

La phototoxicité est due aux furocoumarines et aux pyranocoumarines. Ce sont des molécules polycycliques qui, sous l'action des rayons ultraviolets forment des liaisons avec les bases pyrimidiques de l'ADN. Cette liaison entraîne la libération de médiateurs inflammatoires qui provoquent un érythème pouvant être assimilé à un coup de soleil. Cette réaction, principalement provoquée par les essences de citrus (bergamote, citron et pamplemousse), ainsi que par les HEs de cumin et de persil frisé, se manifeste plusieurs heures après l'exposition. C'est pourquoi en parfumerie, ces essences ne sont utilisées qu'à des concentrations faibles définies par l'International Fragrance Association (IFRA).

II.7.1.1.3. Allergie de contact

En Europe, 1 à 2 % de la population est concernée par les allergies de contact. Il faut donc faire très attention lors de l'utilisation d'HEs car beaucoup contiennent des molécules allergisantes. Il faut pour développer une allergie de contact, une première étape de sensibilisation. Elle n'est pas dose dépendante mais une fois sensibilisé le sujet réagira à de très faibles doses (**Lazouni et al., 2006**).

Lors de l'étape de sensibilisation, la molécule allergisante ou haptène, pénètre dans l'épiderme où il va se lier à des protéines présentes à la surface des cellules de Langerhans. Le complexe haptène-protéine migre de l'épiderme vers un ganglion lymphatique où il sera présenté aux lymphocytes T CD8+ pour être sensibilisé. Lors d'un contact ultérieur les lymphocytes T sensibilisés provoquent une réaction inflammatoire responsable de la réaction allergique (**Hartnoll et al., 1993**).

II.7.1.2. Toxicité pulmonaire

La toxicité pulmonaire est due aux Composés Organiques Volatiles (COVs), ils représentent tous les composés carbonés à l'exception des oxydes de carbone, des carbonates et bicarbonates. Les petits aldéhydes comme le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le propionaldéhyde, etc. sont des composés très actifs et irritants pour la muqueuse respiratoire. De par leur volatilité, ils sont très vite évaporés lors de la distillation, mais restent cependant présents sous forme de traces dans l'HE finale (**Hartnoll et al., 1993; Janes et al., 2005**).

II.7.1.3. Toxicité cardiovasculaire

Certaines molécules aromatiques agissent sur le système cardiovasculaire. Ainsi l'eugénol, le thymol et le carvacrol exercent un blocage au niveau des canaux calciques de cellules cardiaques humaines (Magyar *et al.*, 2004). Selon la même étude, la quantité de ces composés que l'on peut retrouver dans un unique flacon de divers bains de bouche, serait capable de provoquer une arythmie voire même un arrêt cardiaque. De plus, le thymol et le carvacrol ont montré une action hypotensive chez des rats normotendus (Aydin *et al.*, 2007).

Le menthol lui serait responsable de cas de fibrillations auriculaires et de bradycardies élevées chez des fumeurs de cigarettes mentholées. Il convient toutefois de noter que les sujets ayant souffert de fibrillation auriculaire étaient tous traités par quinidine (Luke, 1962; Thomas, 1962).

II.7.1.4. Toxicité rénale

Les cas de toxicité rénale sont rares, mais ils peuvent survenir lors de surdosages. L'autopsie d'un enfant de 22 mois ayant ingéré 5 ml d'HE de gaulthérie a ainsi mis en évidence des lésions au niveau des reins (Kloss et Boeckman, 1967). L'ingestion d'une quantité inconnue d'HE de fenouil chez une femme adulte provoqua des lésions au niveau des tubules rénaux (Vallance, 1955). Les terpènes présenteraient aussi une néphrotoxicité certaines, notamment avec l'HE de térébenthine (Jollois *et al.*, 2001).

II.7.1.5. Toxicité digestive

Le principal risque à l'utilisation des HEs par voie digestive est donc l'irritation ou l'inflammation de la muqueuse digestive, ce phénomène est dépendant de la concentration en HE utilisé, et de la fréquence de l'exposition, ainsi on évitera leur utilisation pure. Les huiles essentielles les plus susceptibles de provoquer une irritation sévère sont celles contenant eugénol, carvacrol ou thymol (Tisserand et Young, 2013).

II.7.1.6. Toxicité hépatique

Les molécules aromatiques peuvent être directement toxiques pour le foie ou alors indirectement via les métabolites produits (Lake, 1999). La plupart des phénols sont toxiques pour le foie à forte dose comme l'eugénol, le thymol ou le carvacrol. Notons le cas de deux enfants de 15 et 24 mois qui ont développé une défaillance hépatique aiguë après

Chapitre 02. Les huiles essentielles du fenouil

absorption d'environ 10 ml d'HE de clou de girofle (composée principalement d'eugénol)(**Hartnoll et al., 1993; Janes et al., 2005**).

Pour finir, il a été observé une hépatotoxicité induite par le menthol provoquant un ictère chez des enfants ayant une déficience en Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD). La G6PD est impliqué dans le métabolisme du menthol, il s'est alors accumulé dans le corps d'enfants auxquels on appliquait des pansements avec du menthol sur leur cordon ombilical (**Olowe et Ransome-Kuti, 1980**). Le menthol doit alors être évité chez les sujets atteints de déficit en G6PD.

II.7.1.7. Neurotoxicité

Certaines molécules ont tendance à s'accumuler au niveau cérébral, c'est le cas des cétones comme le camphre, la thuyone (Thuya, Absinthe, Sauge officinale) et la pinocamphone (Hysope) car elles possèdent une forte affinité pour les lipides cérébraux. Ces molécules sont responsables de troubles neurologiques telles que convulsions, agitations, somnolences, crises épileptiformes. Elles agissent en s'attaquant à la gaine de myéline des neurones par action lipolytique, provoquant une perturbation électrique des neurones.

La plupart des cas de convulsions induites par les HEs concernent des patients non épileptiques, la voie orale étant celle utilisée. Les enfants sont très sensibles aux HEs convulsivantes du fait de l'immaturation de leur système nerveux central et de la barrière hémato-encéphalique moins efficace que celle d'un adulte (**Saunders et al., 2000**).

II.7.1.8. Toxicologie de la reproduction

La toxicologie de la reproduction est l'étude des effets délétères que peuvent causer des xénobiotiques sur les fonctions reproductrices mâles et femelles et sur la progéniture. Cela englobe les problèmes de fertilité, la tératologie, l'embryotoxicité, la foetotoxicité, la toxicité périnatale. On peut déjà Des études sur le rat, ont montré que le citral provoque une réduction du nombre de follicules ovariens (**Toaff et al., 1979**). Cet effet n'a été observé qu'avec des injections intra-péritonéales mensuelles de 300 mg/kg pendant 6 mois, ce qui reviendrait à injecter environ 25 ml d'HE de Lemongrass dans l'abdomen d'une femme, évoquer l'existence d'HEs présentant des propriétés dites oestrogène-like. Ce sont notamment les HEs à anéthol (anis, badiane, fenouil, etc.) ainsi que celles à sesquiterpénols.

La plupart de ces molécules ont montré une activité oestrogénique relativement faible, nécessitant des doses 4 à 5 fois supérieures à celle du 17- β -estradiol pour obtenir le même

Chapitre 02. Les huiles essentielles du fenouil

effet. Cependant le transanéthol administré oralement à la dose de 80 mg/kg a montré un effet anti-nidatoire total (Dhar, 1995; Franchomme, 2015 ; Tisserand et Young, 2013).

II.7.1.8.1. Gestation

Comme expliqué plus haut, le trans-anéthol que l'on retrouve dans certaines HEs (fenouil, badiane de Chine, anis vert) a montré une activité oestrogénique en bloquant l'implantation chez le rat pour une dose de 80 mg/kg (Dhar, 1995).

II.7.1.8.2. Embryotoxicité

Le placenta permet les échanges entre la mère et l'enfant, mais il n'assure pas une fonction de barrière suffisamment efficace. En général, il permet le transport de toutes les molécules non chargées, non ionisées, lipophiles et avec un poids moléculaire inférieur à 1000 Da, ce qui est le cas de la plupart des molécules aromatiques.

Les huiles essentielles ont montré sur la souris une toxicité sur le jeune embryon (jour 4) et notamment sur la répartition des chromosomes dans le noyau des cellules en division. De plus, les HEs provoquent un taux de mort cellulaire (Tisserand et Young, 2013).

II.7.1.8.3. Foetotoxicité

Le camphre absorbé en grande quantité par des femmes enceintes est responsable dans certains cas de la mort du fœtus (Riggs *et al.*, 1965). Les données de neurotoxicité sur le camphre recommandent une dose orale maximum de 2 mg/kg/jour. Ainsi les produits contenant du camphre doivent être évités chez la femme enceinte (Tisserand et Young, 2013). L'HE de fenouil (*Foeniculum vulgare*) est rapporté dans certains cas comme ayant causé des avortements (Tisserand et Young, 2013).

Pour résumer, il faut savoir que dès qu'une molécule aromatique est présente dans le sang maternel elle atteindra très certainement le fœtus. On retient comme composants les plus dangereux pendant la grossesse, l'apiol, le camphre et l'acétate de sabinyl qui présentent un haut risque d'induire une interruption de grossesse.

II.7.1.9. Cancérogénicité

Les études ont montré l'apparition de tumeurs chez les rongeurs exposés à divers composés aromatiques. Notamment, les molécules de la famille des alkylbenzènes comme l' α -asarone, la β -asarone, le méthyleugénol, le safrole et l'estragol sont

Chapitre 02. Les huiles essentielles du fenouil

toutescarcinogènes chez les rongeurs. Cet effet est indirect, après la transformation enmétabolites toxiques(Tisserand et Young, 2013).

Les molécules alkylantes comme le groupe des époxydes sont les plus importantes dansles phénomènes mutagènes.Les époxydes ne sont pas fréquents dans les HEs, Cependant ils sont formés après métabolisation de certaines moléculesaromatiques plus courantes (tableau 03).Fort heureusement, ils sont aussi rapidementinactivés qu'ils sont formés, ils n'ont donc normalement pas le temps d'exercer leurmutagénicité. De plus ils sont encore plus rapidement inactivés chez l'homme que chezles rongeurs (Guenthner et Luo, 2001).

Tableau 03 : Liste de métabolites époxydes potentiellement toxiques (Tisserand et Young, 2013).

Composant de l'HE	Epoxyde formé	Action de l'époxyde
Anethole	Anethole 1',2'-oxide	Possible mutagènes, carcinogène chez le rat, formation moindre chez l'Homme, inactivé à faibles doses.
α -asarone	Asarone 1',2'-oxide	Mutagène, carcinogène.
Estragole	Estragole 2',3'-oxide	Mutagène, non carcinogène, rapidement détoxifié dans le foie chez l'Homme.
Eugenol	Eugenol 2',3'-oxide	Mutagène potentiellerapidement détoxifié.
Safrole	Safrole 2',3'-oxide	Mutagène potentielle, rapidement détoxifié.

*Chapitre 03 : Modèle
biologique (*Helix aspersa*)*

Chapitre 03. Modèle biologique (*Helix aspersa*)

III. Biologie et Physiologie d'*Helix aspersa*

L'escargot *Helix aspersa* appartient à l'embranchement des Mollusques, animaux à corps mou et dépourvus de squelette. Il fait partie de la classe des Gastéropodes. La forme de sa coquille enroulée caractérise la super famille des Helicacea. Il appartient à la famille des Hélicidés (Ansart et Vernon, 2003).

- ✓ Règne : Animalia
- ✓ Embranchement : Mollusca
- ✓ Classe : Gasteropoda
- ✓ Ordre : Stylommatophora
- ✓ Famille : Helicidae
- ✓ Genre : *Helix*
- ✓ Espèce : *aspersa*
- ✓ Sous-espèce : *aspersa*

III.1. Morphologie

L'escargot *Helix aspersa* possède une coquille spiralée pouvant contenir tout son corps (figure 04). Lorsqu'il est en extension, seul le pied apparaît, la masse viscérale étant retenue dans la coquille par le muscle columellaire (Adema, 1992).



Figure 04: Petit-gris (*Helix aspersa*) vu de haut (Charrier *et al.*, 2006).

Chapitre 03. Modèle biologique (*Helix aspersa*)

III.2. Anatomie de l'escargot

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée placée dans la coquille. Le mouvement a lieu grâce à l'expansion et l'extraction de muscles dans le pied, des glandes. De mucus sur le reste du corps protégeant l'escargot contre la perte d'eau. Deux paires de tentacules placées sur la tête. La paire supérieure porte les yeux. La coquille est sécrétée par un épais pli de peau, appelé le manteau, cette dernière est reliée au corps par un puissant muscle qui est attaché au columella.

Des "ramifications" à la tête et aux tentacules, la contraction de ce muscle permet à l'escargot de se retirer dans sa coquille. À l'intérieur de la coquille, se trouve la cavité du manteau, qui contient le cœur, le rein et le poumon. La **figure 05** montre l'anatomie d'*Helix Aspersa* (Chevallier, 1977).

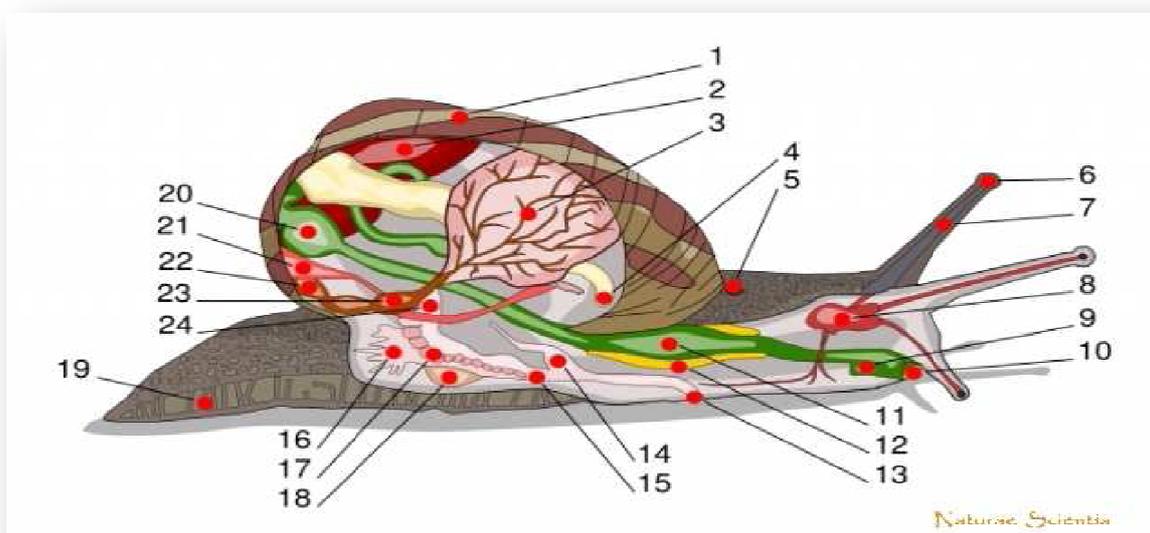


Figure 05 : Anatomie de l'escargot (www.naturae-scientia.com).

Légende : (1. Coquille - 2. Foie - 3. Poumon - 4. Anus - 5. Pore respiratoire - 6. œil - 7. Tentacule - 8. Cerveau - 9. Conduit salivaire - 10. Bouche - 11. Panse - 12. Glande salivaire 13. Orifice génital - 14. Pénis - 15. Vagin - 16. Glande muqueuse - 17. Oviducte - 18. Sac de dards - 19. Pied - 20. Estomac - 21. Rein - 22. Manteau - 23. Cœur - 24. Canal déférent).

III.3. L'espèce en milieu naturel

Cette espèce ubiquiste peut s'adapter à des biotopes, des sols et des climats variés. Elle a besoin d'abris pour repos mais semble préférer les milieux ouverts. Elle se nourrit

Chapitre 03. Modèle biologique (*Helix aspersa*)

principalement de plantes vivantes ou mortes (Iglesias et Castillejo, 1999),aux quelles s'ajoutent des quantités plus ou moins importantes de sol (Gomot *et al.*, 1989).

III.4. Rythme d'activité

L'activité des escargots petit-gris est préférentiellement nocturne .Elle se synchronise avec la photopériode naturelle et débute au coucher du soleil avec un maximum six après celui-ci (Chevallier, 1992).Les trois facteur qui influencent cette activité sont l'hygrométrie du milieu (air et sol) ; la température et l'intensité lumineuse. Les escargots sont actifs si l'humidité réactive de l'air est supérieure à80% et si la température minimale nocturne n'est pas inférieure à9C° (Chevallier, 1982).

III.5. Hibernation et estivation

Helix aspersa, escargot terrestre, n'est actif que lorsque l'humidité est suffisamment élevée. Dans le cas contraire, l'animal se rétracte à l'intérieur de sa coquille qu'il obture par un voile muqueux (courte inactivité) ou par un epiphragme,ce qui lui évite la déshydratation. La photopériode et la température sont des variables saisonnières qui induisent les états d'inactivité(Buser et Combes, 2009).

Hibernation et estivation sont donc des réponses à des stress environnementaux prévisibles (Bailey, 1981).La photopériode est le principal facteur qui déclenche l'activité ou l'inactivité des escargots, selon qu'ils sont soumis à des régimes lumineux mimant des jours longs(plus de 15 h de lumière) ou courts. La connaissance de ce phénomène est primordiale pour une exploitation rationnelle de l'animal, permettant ainsi, en jouant sur les durées d'éclairage journalier, de stimuler la croissance et la reproduction ou, au contraire, l'entrée en hibernation (Le Guhenec, 1985).

III.6. Croissance

Leur croissance en milieu naturel (de l'éclosion jusqu'à la maturité sexuelle) s'effectue par paliers (en fonction des alternances de périodes d'activité et des estivations/hibernations),généralement en 2 ans. La longévité de cette espèce en milieu naturel est de 6 à 7 ans(Gomot et Enee, 1980). Le tableau 04 montre les phases de croissance d'*Helix aspersa*.

Chapitre 03. Modèle biologique (*Helix aspersa*)

Tableau 04 : Description des 4 phases de croissance d'*Helix aspersa*(Gomot et Enee, 1980).

Phase	Différenciation sexuelle	Masse(g)
Infantile	Tractus génital non différencié.	0,02 à 0,6
Juvenile	Organisation du tractus génital, gamétogenèse active.	0,6 à 6
Pré-adulte	Maturation sexuelle : développement des Glandes annexes femelles.	Plus non bordés) de 6 (individus
Adulte	Différenciation sexuelle terminée : aptitude des individus à la reproduction.	De 6 à 14 (individus bordés)

III.7. Reproduction

Les escargots sont hermaphrodites, mais doivent s'accoupler car ils ne peuvent pas s'autoféconder. Ils sont tous équipés d'un pénis et de l'organe réceptif correspondant. La fécondation est réciproque par échange de spermatophores entre les 2 partenaires, certains individus peuvent toutefois se comporter uniquement comme mâle ou comme femelle. L'autofécondation, qui existe chez les limaces et les achatines, est rarement observée chez les escargots du genre *Helix* et n'a jamais été rapportée pour *Helix aspersa*(Gomot, 1980).

La durée entre l'accouplement et la ponte est d'environ 10 jours en conditions optimales mais peut atteindre 1 voire 2 mois lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables (Daguzan, 1983). Les œufs (entre 80 et 130) sont déposés dans une cavité creusée à quelques cm sous la surface du sol, cavité qui est ensuite rebouchée. L'incubation dure de 12 jours à 20°C à environ 22 jours à 15°C. Le nombre moyen de ponte par reproducteur est de 1,3 et le nombre d'infantiles produits est de 75 à 85 (Madec, 1983).

Chapitre 04 : Matériels et méthodes

Chapitre 04. Matériels et méthodes

I .Matériels et méthodes

Les essais réalisés dans cette étude ont été accomplis dans le Laboratoire de recherche sur les molécules bioactives et applications est le laboratoire de toxicologie, du département de Biologie.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel ou l'organe végétal choisi dans la présente étude est représenté par les graines sèches du fenouil (*Foeniculum vulgare*). Les graines de fenouil ont été achetées, sous forme séchée, chez un arboriste. Elles sont originaires wilaya de Tébessa(**photo 01**).



Photo 01 : Les graines sèches du fenouil (*Foeniculum vulgare*) (**Photos personnelle**).

I.1.2. Matériel animal

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un organisme pluricellulaire un gastéropode pulmoné l'escargot *Helix aspersa*(**photo02**).Les escargots utilisesau cours des expérimentations ont le nombre de 50 escargots. Ils sont proviennent d'une population originaire d'une région nonpolluée a Bouchegoufe wilaya de Guelma (Nord-est de l'Algérie).Ces escargotscollectes sont maintenus pendant 05 jours pour l'acclimatation aux conditions dalaboratoire avant le traitement.



Photos 02: *Helix aspersa*(Photo personnelle).

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles du fenouil a été réalisée par le procédé d'hydrodistillation. Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée. L'appareil utilisé pour l'hydro-distillation est de type Clevenger(**photo03**). Il est constitué d'un chauffe-ballon, un ballon en verre pyrex, colonne et un collecteur. Chaque élément a un rôle précis. Le chauffe-ballon permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon. Le ballon en verre pyrex où l'on place les grains séchés et l'eau distillée. La colonne contenant le réfrigérant condense la vapeur qui vient de l'échauffement du ballon. Le collecteur en verre pyrex reçoit les extraits de la distillation(**Mohammedi, 2006**).



Photos 03 : Procédés d'hydro-distillation (Photo personnelle).

Chapitre 04. Matériels et méthodes

I.2.2. Rendement

Le rendement de l'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche de la plante.

$$R = P_{HE} \times 100 / P_{MS}$$

R: Rendement en HE (en %).

P_{HE}: Poids d'HE en g.

P_{MS} : Poids de matière sèche de la plante en g.

I.2.3. Condition d'élevage

Cinquante (50) escargots ont été utilisés dans notre expérimentation. Ils sont tous adultes avec un poids moyen de 12g ($\pm 0.35g$). Ils sont élevés dans les conditions d'environnement optimales suivantes : Photopériodes 18h de lumière / 24h, température 20 ± 20 C, humidité relative 70-80% conformément aux instructions trouvés dans (**Gomot et vaufléury, 2000**).

Ces escargots sont repartis dans des boîtes de plastique transparentes ayant un volume de $4071,37 \text{ cm}^3$ ($23,5 \times 16,5 \times 10,5$ Cm) avec un couvercle perforé. Chaque boîte contient une éponge humide pour maintenir le taux d'humidité. L'alimentation (Salade) est fournie dans des boîtes de pétrie (**photos 04**). Les boîtes de plastiques sont quotidiennement nettoyées l'après midi et l'alimentation a été renouvelée quotidiennement.



Photos 04 : L'élevage des escargots dans le laboratoire (**Photo personnelle**).

Chapitre 04. Matériels et méthodes

I.2.4. Mode de traitement

Le traitement des animaux a été effectué par l'addition de concentrations croissantes d'HE du Fenouil (0 (témoin), 0,5µl, 01µl, 02µl et 04µl) par contamination dans l'alimentation (salades). Les escargots ont été répartis de 05 lots de 10 escargot chacun. Le traitement s'est déroulé pendant 3 semaines pour les 06 lots.

Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les 3 jours au moment du nettoyage des boîtes d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible, à heure fixe. Il comprend un lavage des couvercles et des parois des boîtes à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond des boîtes ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur le substrat. Ensuite, l'ensemble des récipients d'essai est humidifié à l'eau distillée.

I.2.5. Sacrifice et dissection des escargots

A la fin de la 3^{ème} semaine de traitement, les escargots ont été mis à jeun pendant 48h pour vider leur tube digestif. Ceci évite d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants accumulées dans les tissus. Un lavage des boîtes a été réalisé pour éviter la réinjection des fèces. Les 50 escargots ont été ensuite congelés à -20°C. vingt quatre heures après, les escargots ont été disséqués (**Photo 05**).

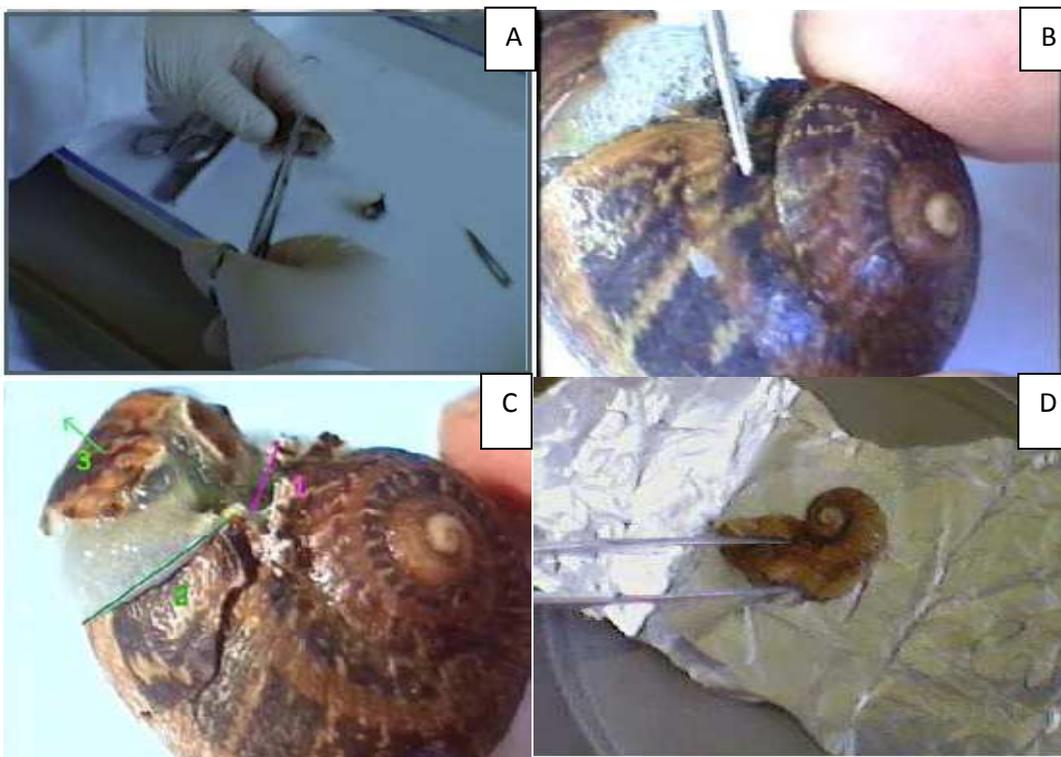


Photo 05 : Etapes de la dissection des escargots (**Photos personnelles**).

Chapitre 04. Matériels et méthodes

Les escargots sont décoquillés et les têtes sont récupérées dans un tampon adéquat pour les l'analyse d'AChE (**photo 06**).



Photos 06 : Prélèvement des organes (la tête et l'hépatopancréas) (**Photo personnelle**).

Après la dissection, l'hépatopancréas a été prélevé et divisé en 08 fragments pour chaque mesure des bios-marqueurs :

- Un échantillon pour le dosage de protéines.
- Un échantillon pour le dosage de glucides.
- Un échantillon pour le dosage de lipides.
- Un échantillon pour le dosage du glutathion (GSH).
- Un échantillon pour le dosage de la glutathion -s-transférase (GST).
- Un échantillon pour le dosage de la catalase (CAT).
- Un échantillon pour le dosage de la malondialdéhyde (MDA).

I.2.6. Analyse des paramètres biochimiques

I.2.6.1. Dosage des métabolites contenus dans l'hépatopancréas (protéines, lipides et glucides)

Le dosage des différents métabolites (protéines, lipides et glucides) contenus dans l'hépatopancréas des escargots a été réalisé selon le procédé de **Shibko et al, 1966**. Après un broyage et centrifugation (5000 tours/mn pendant 10mn), le surnageant I a été récupéré afin de dosage des lipides, aussi que le culot I a été récupéré. A ce dernier, 1 ml d'un mélange éther/chloroforme (V/V) a été ajouté et une deuxième centrifugation (5000 tours/mn pendant 10 mn) a été réalisée. Le surnageant II a été récupéré afin de doser dosage des lipides tandis que le culot II a été traité avec 1 ml de NAOH (0,1N) pour le dosage du taux des protéines totales (**figure 06**).

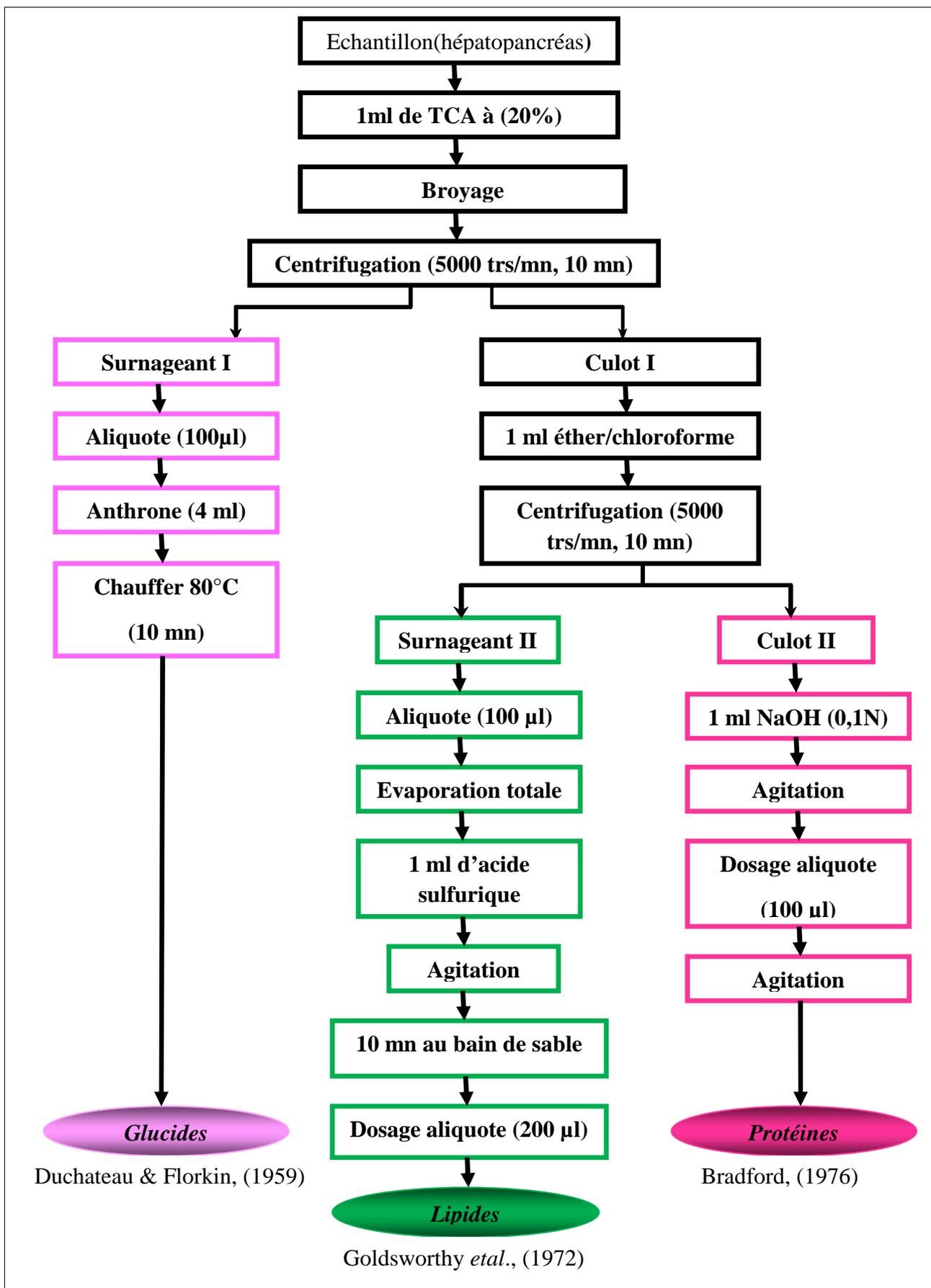


Figure 06 :Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko *et al.*, 1966).

I.2.6.1.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été déterminé selon la méthode de (**Bradford, 1976**) qui consiste à utiliser 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.

Pour accomplir cet essai, nous avons procédé comme suit :

- Prélever 0.1ml de l'homogénat.
- Ajouter 5ml de réactif de Bradford.
- Agiter et laisser 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 (**annexe 01**).

I.2.6.1.2. Dosage des lipides

Le taux des lipides a été déterminé selon la méthode de (**Goldsworthy et al., 1972**). Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 195ml d'acide orthophosphorique à 85% et 55ml d'eau distillée) et solution mère de lipides (2,5mg/ml comme standard. Et additionné 1ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les chauffés un bain marie (100°C pendant 10min) ; de chaque tube 200µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5ml de réactif.

Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm (**annexe 02**).

I.2.6.1.3. Dosage des glucides

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de (**Duchateau et Florkin, 1959**). Elle consiste à additionner 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml de réactif d'Anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min. Une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présent dans l'échantillon. La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 620 nm.

La préparation du réactif d'Anthrone se fait comme suit : peser 150 mg d'Anthrone, ajoute 75 ml d'acide sulfurique concentré et 25 ml d'eau distillée. On obtient une solution

limpide de couleur verte qui est stockée à l'obscurité. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère du glucose (1 mg/ml)(annexe 03).

I.2.7. Analyse des paramètres enzymatiques

I.2.7.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) a été dosé selon la méthode de(Draper et Hadley,1990).basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et lemalondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration estmesurée a une longueur d'onde de 532 nm.

Les fragments d'hépatopancréas d'*helix aspersa* sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM et pH 7,5) (1,5137 g tris et 0,0730 g EDTA (acide éthylènediamine tétra-acétique), 42,78 g sucrose, 250 ml d'eau distillée). Une fois l'homogénéisationréalisée, une centrifugation est effectuée pendant 10 mn a 10000 tours/mn et le surnageantrecupère servira au dosage du MDA.

Le dosage est réalise avec 500 µl du surnagent additionnes de 2,5 ml de TCA (100 g TCA, 1000 ml d'eau distillée). Après chauffage au bain marie à 100°C pendant 15 mn etrefroidissement dans de la glace, une centrifugation est effectuée a 10000 tours/mn pendant10 mn. Une fraction aliquote de 2 ml du surnageant est alors prélevée a la quelle on ajoute 1 ml de TBA (6,7 g TBA et 1000 ml d'eau distille). Après un second chauffage (100°C pendant 15mn) ils ont refroidissés. Ensuit 1,5ml de butanol a été rajoutés. Après agitation, unedernière centrifugation (10000 tours/mn, 10 mn) est réalisée et le surnageant constitue de 1 ml debutanol renfermant les complexes TBA/MDA est récupère et une lecture des absorbancesest effectuée a 532 nm contre un blanc ou du tampon tris-HCl remplace le surnageant.

Le taux du MDA est détermine selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{156} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : (Taux du MDA): micromole de substrat hydrolyse par mg de protéines (µM/mg de protéines).

Δ Do : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

156 : coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt : volume total dans la cuve : 1ml (volume total du butanol récupère renfermant les Complexes TBA/MDA).

Vs : volume du surnageant utilise dans le dosage : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Chapitre 04. Matériels et méthodes

I.2.7.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux de GSH est quantifié selon la méthode de (Weckberker et Cori, 1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'- dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiols (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M (7,448 g EDTA + 1000 ml d'eau distillée). Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfoosalicylique (ASS) à 0,25% (0,25g d'ASS +100 ml d'eau distillée) où 0,2 ml d'ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Après agitation, le mélange est plongé dans un bain de glace pendant 15mn, puis centrifugé à 1000 tours/mn pendant 5mn.

Une aliquote de 500µl du surnageant récupéré est ajoutée à 1ml du tampon Tris/EDTA (0,02 M, PH 9,6)(63,04 g de Tris + 7,4448 g d'EDTA + 1000 ml l'eau distillée) et 0,025 ml de DTNB (0,01 M)(3,96 g DTNB + 1000 ml d'éthanol absolu). La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 mn de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée.

Le taux de GSH est calculé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO}{13,1} \times \frac{1}{0,8} \times \frac{1,525}{0,5} / \text{ mg de protéines}$$

X : Taux du GSH, micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM /mg de protéines).

DO : la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

1 : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1ml (0,2ml ASS+0,8ml homogénat).

1,525ml : volume total dans la cuve (0,5ml surnageant +1ml tris/EDTA+0,025ml DTNB).

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

0,8ml : volume du l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation.

0,5ml : volume du surnageant dans la cuve.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

I.2.7.3. Dosage de l'activité acétylcholinestérase(AChE)

Le dosage de l'activité AChE a été réalisé selon la méthode de (Ellman *et al* ; 1961) qui consiste à fournir à l'enzyme (AChE) un substrat artificiel analogue, l'acétylthiocholine, qui sera hydrolysé en acide acétique et thiocholine. Cette dernière, en présence de DTNB

Chapitre 04. Matériels et méthodes

(acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïde), donne un produit jaune le TNB (acide 5'-thio-2-nitrobenzoïde). La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 412 nm.

Les têtes des escargots témoins et traitées sont homogénéisées dans 1ml de solution détergente (38,03 mg d'éthylène glycol tris beta aminoéthyl étherNNN'N' tétra-acétique, +1ml de triton X 100% +5,845 g de NaCl + 80 ml de tampon Tris 10 mM, PH7). L'homogénat est centrifugé à une vitesse de 9000 tour pendant 15mn. Le surnageant est récupéré pour servir comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité AChE a été réalisé sur une fraction aliquote de 100µl auquel on ajoute 100 µL de DTNB (39,6 mg de DTNB +15 mg CO₃HNa dans 10 ml du tampon Tris (0,1 M et PH7)) et 1 ml de tampon Tris (0,1M et PH 7). Après 3 à 5 minutes, et afin d'épuiser la réaction spontanée, 100 µL de substrat acétylthiocholine (118 mg d'acétylcholine +5 ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des absorbances a lieu toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc, où 100 µL de solution détergente remplacent la source d'enzyme.

L'activité AChE est calculée selon la formule suivante :

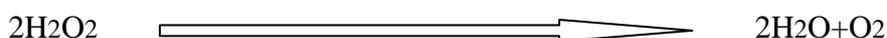
$$\text{AChE } (\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta D_0 / \text{mn} \times V_t}{1,36 \times 10^4 \times V_s} \text{ / mg de protéines}$$

X : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.
Δ Do : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat
1,36 x 10⁴: coefficient d'extinction molaire du DTNB (M-1cm-1).
Vt : volume totale de la cuve (1,3ml).
Vs : volume de l'homogénat (0,1ml).
mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

I.2.7.4. Dosage de l'activité catalase(CAT)

La catalase est enzyme antioxydant le plus couramment mesurées dans les recherches liées aux radicaux libres. La catalase est l'enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le protocole le plus couramment utilisé (**Goth, 1991**).

Cette enzyme intervient dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique en eau et en oxygène (**Regoli et Pricipato, 1995 ; Boucenna ,2010**).



Chapitre 04. Matériels et méthodes

L'activité catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (0,0040 M-1cm⁻¹) en faisant réagir dans 100 Mm de tampon phosphate pendant 1 mn à PH 7,5 et 100 µl de H₂O₂ (500 mM) sur 20 µl d'homogénat, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats sont exprimés en µmol d'H₂O₂ par minute et par mg de protéines (**Boucenna,2010**).

L'activité de la CAT est plus sensible décroît rapidement, après 15 secondes de délai durant 60 secondes de mesure. Le coefficient d'extinction est 0,0040 mM⁻¹ cm⁻¹.

L'activité CAT est calculée par la formule suivante :

$$X = \frac{(\Delta DO \times 10)}{(\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines})}$$

X: micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/mn /mg de protéines).

Δ DO : différences de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat pendant une minute.

ε : Le coefficient d'extinction est de 0,0040mM⁻¹ cm⁻¹.

L : longueur de la cuve utilisée (1cm).

Mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

I.2.7.5. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase(GST)

Le dosage de la GST est réalisé selon la méthode de (**Habig et al., 1974**) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat, le 1-chloro-2-4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur le glutathion(GSH). Les fragments de l'hépatopancréas sont homogénéisés dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1M et PH 6) et trois répétitions sont réalisées. L'homogénat est centrifugé à 14000g pendant 30mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. 200µl du surnageant a été additionné à 1,2ml de substrat CDNB (1mM) dans du tampon phosphate (0,1M et PH6). La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5mn à une longueur d'onde de 340 nm, contre un blanc contenant 200µl d'eau distillée à la place du surnageant.

L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do / mn}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

Δ Do : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB (M-1cm-1).

Vt : volume totale de la cuve (1400µl).

Vs : volume de l'homogénat (200µl).

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

I.3. Analyse statistique des résultats

Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage ont utilisant Excel.

L'analyse statistique des données est effectuée par le test ANOVA à un seul facteur suivi le test de Tukey pour la comparaison entre les échantillons traités et le témoin. Cette analyse a été faite grâce au logiciel Minitab (Version 16).

Les différences sont considérées comme :

- Significative lorsque ($P < 0,05$).
- Hautement significative lorsque ($P < 0,01$).
- Très hautement significative lorsque ($P < 0,001$).
- Avec p : seuil de signification.

Résultats et Discussion

II. Résultats

II.1. Rendement du fenouil en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles du fenouil utilisé dans cette étude est de 1,27%.

II.2. Effets des huiles essentielles sur les paramètres biochimiques

II.2.1. Effet sur le taux des protéines

Le taux des protéines a été déterminé sur la base de la courbe de référence présentée dans l'annexe 1. L'équation de la droite de régression a été déterminée comme suit :

$$Y = 0.014x + 0.657$$

Avec coefficient de détermination $R^2 = 0.965\%$.

La figure 07 illustre l'évolution du taux des protéines en présence d'HE du fenouil au niveau de l'hétopancréas. Nous constatons que le taux des protéines tend à augmenter chez les escargots traités par rapport aux témoins surtout pour les doses élevées. L'analyse statistique révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre le taux des protéines des témoins (57,57 mg/l) et celui des escargots traités par les doses de 0,5 et 01 μ l (57,55 et 58,20 respectivement). Cette différence devient hautement significative ($P \leq 0,01$) pour les doses 02 et 04 μ l (67,09 et 83,77 mg/l respectivement).

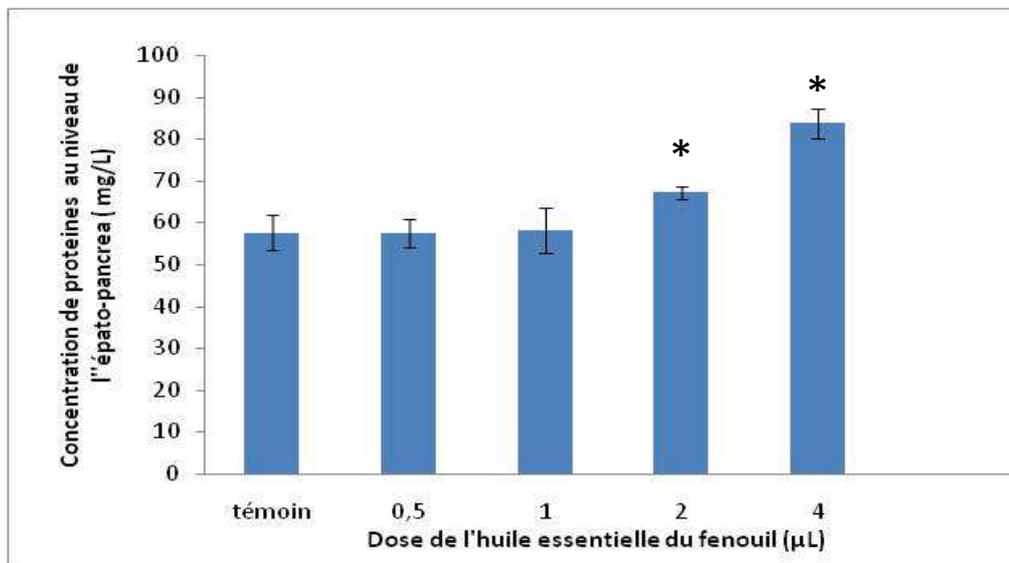


Figure 07 : Variation de concentrations de protéines (mg/L) aux niveaux de l'hétopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

II.2.2. Effet sur le taux des lipides

Le taux des lipides a été déterminé sur la base de la courbe de référence présentée dans l'annexe 2. L'équation de la droite de régression a été déterminée comme suit :

$$Y = 0.001x - 0.016$$

Avec un coefficient de détermination : $R^2 = 0.954\%$

La **figure 08** représente l'évolution du taux des lipides en présence des HEs du fenouil au niveau de l'hépatopancréas. D'une manière générale, le taux des lipides diminue chez les escargots traités en comparaison avec les témoins. La diminution du taux des lipides s'accroît avec l'augmentation de la dose ingérée d'HEs. En effet, avec les doses de 1 μ l, 2 μ l et 4 μ l, le taux des lipides enregistre des valeurs de 208,4 ; 86,26 et 71,6 mg/l respectivement. Ces valeurs sont significativement différentes ($p \leq 0,004$) de celles enregistrées chez les escargots témoins (420 mg/l). En revanche, la diminution du taux des lipides n'est pas significative avec la dose de 0,5 μ l (406,5 mg/L).

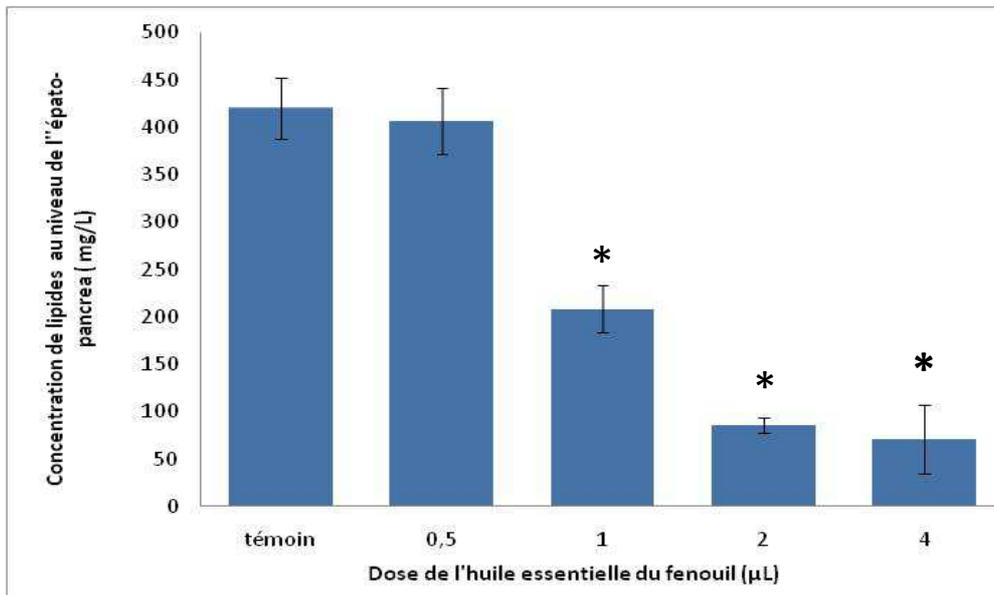


Figure 08 : Variation des concentrations de lipides (mg/L) au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

II.2.3. Effet sur le taux des glucides

Le taux glucides des a été déterminé grâce à l'équation de la droite de régression présentée dans l'**annexe 3** :

$$Y = 0.014x + 0.015$$

Avec un coefficient de détermination : $R^2 = 0.990\%$

La **figure09** montre l'évolution du taux des glucides en présence d'HEs du fenouil. Il paraît que ces dernières n'exercent pas un effet évident sur le taux des glucides. Cependant, l'allure générale en montre une légère augmentation. Cette augmentation devient significativement différente avec la dose de 4 μ l comparée aux témoins (57,82 vs 35,52).

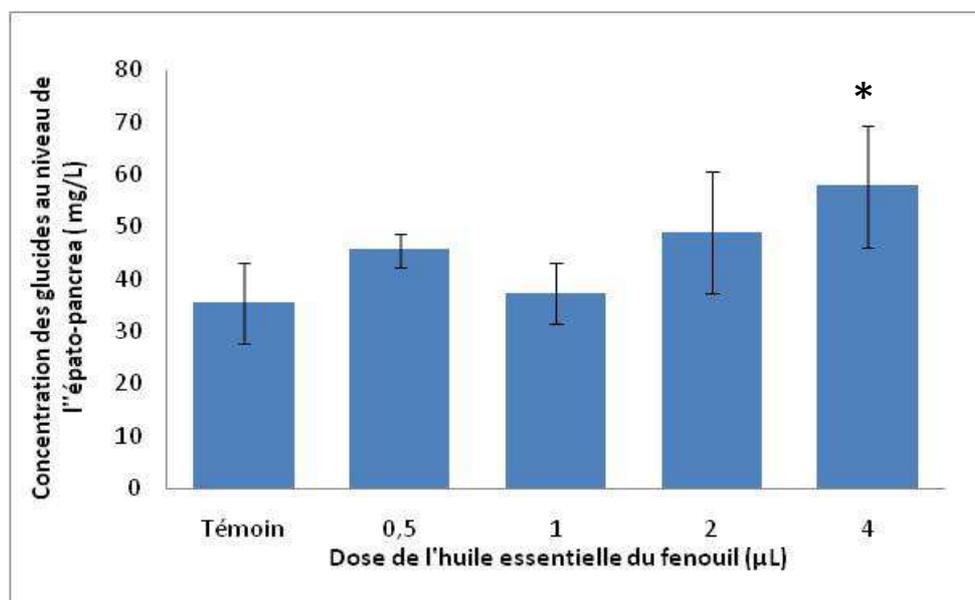


Figure 09: Variation de concentrations de glucides (mg/L) au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

II.3. Analyse des paramètres enzymatiques

II.3.1. Évolution du taux de malondialdéhyde (MDA)

L'évolution du taux de MDA en présence d'HE du fenouil au niveau de l'hépatopancréas des escargots est présentée dans la **figure 10**. Nous constatons que le taux de MDA tend à augmenter significativement ($p < 0,004$) pour les petites doses (0,5 et 1 μ l) alors qu'il reste non différent pour les doses forte (2 et 4 μ l). En effet, avec 0,5 et 01 μ l d'HEs, nous avons enregistré des taux de MDA de $7,55 \cdot 10^{-5}$ et $9,40 \cdot 10^{-5}$ μ M/mg respectivement alors que chez les témoins, ce taux n'était que de $5,067 \cdot 10^{-5}$ μ M/mg. Avec les doses de 02 et 04 μ l, les taux de MDA enregistrés étaient de ($6,35 \cdot 10^{-5}$ et $3,99 \cdot 10^{-5}$ μ M/mg).

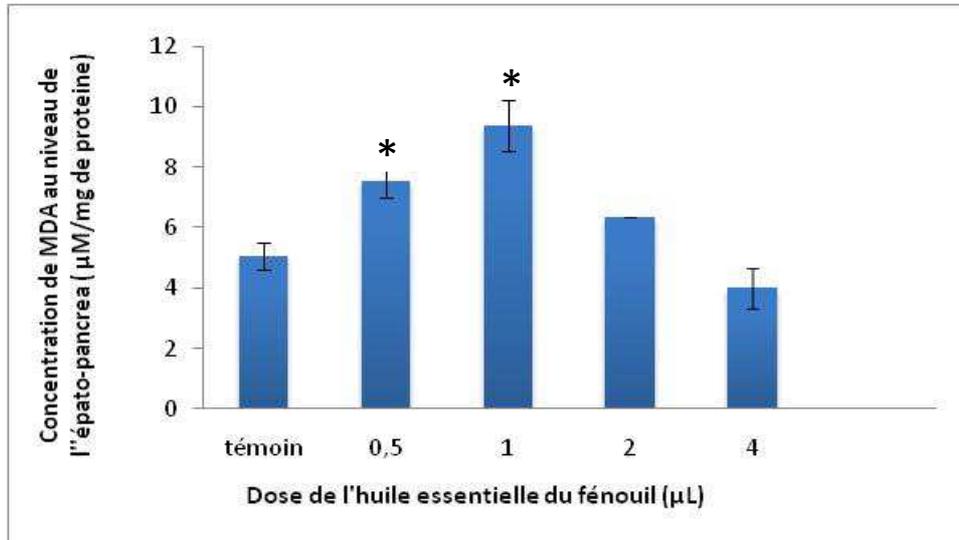


Figure10 : Variation de concentrations de l'MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

III.3.2. Évolution du taux de glutathion(GSH)

La **figure 11** illustre l'évolution du taux des GSH en présence d'HE du fenouil au niveau de l'hépatopancréas. Nous observons que le taux de GSH tend à diminuer significativement ($p < 0,001$) chez les escargots traités par les doses élevées. Les HEs du fenouil n'ont pas d'effet sur le taux de GSH avec les faibles doses. Le taux de GSH enregistré chez les témoins était de $0,0024 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot alors que celui enregistré chez les escargots traités par les doses de $0,5$ et $01 \mu\text{l}$ était de $0,0025$ et $0,0026 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot respectivement. Avec les doses de $02 \mu\text{l}$ et $04 \mu\text{l}$, les taux de GSH observés étaient de $0,0022$ et $0,0016 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot respectivement.

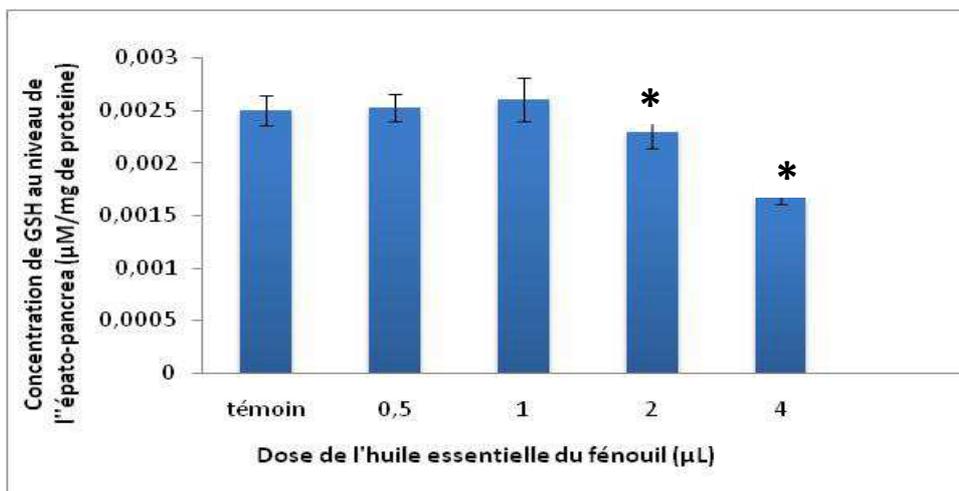


Figure 11: Variation de concentrations de GSH ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

III.3.3. Évolution du taux d'Acétylcholineestérase (AChE)

L'évolution de l'activité spécifique d'AChE des en présence d'HEs du fenouil au niveau de têtes des escargots est montrée dans la **figure 12**. Globalement, nous constatons que le taux d'AChE tend à diminuer chez les escargots traités par rapport aux témoins excepté pour la dose de 0,5 μl . L'analyse statistique révèle qu'il n'ya pas de différence significative entre le taux des protéines des témoins ($5,94 \cdot 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot) et celui des escargots traités par ladose de 0,5 μl ($6,33 \cdot 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot). Cette différence devient hautement significative ($P \leq 0,004$) pour les doses 01 ; 02 et 04 μl ($2,31 \cdot 10^{-7}$; $9,63 \cdot 10^{-8}$ et $4,29 \cdot 10^{-8} \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot respectivement).

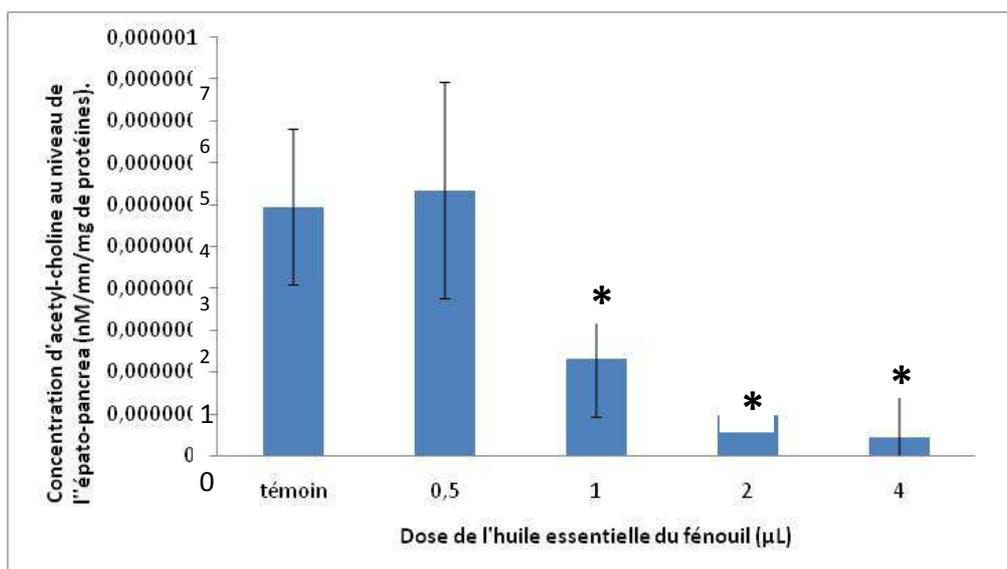


Figure 12: Variation de taux de l'activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

II.3.4. Évolution d'activité de catalase (CAT)

La **figure 13** représente l'évolution de l'activité de CAT en présence d'HE du fenouil au niveau de l'hépatopancréas. D'une façon générale, le taux de CAT tend à diminuer chez les escargots traités par rapport aux témoins surtout pour les doses élevés. Cependant, cette diminution n'apparaît pas dose-dépendante. L'analyse statistique révèle qu'il n'ya pas de différence significative entre le taux de CAT des témoins ($14,63 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot) et celui des escargots traités par les doses de 0,5 μl ($13,30 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot). Cette différence devient hautement significative ($P \leq 0,004$) pour les doses 01 ; 02 et 04 μl ($2,19$; $3,69$ et $4,33 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot respectivement).

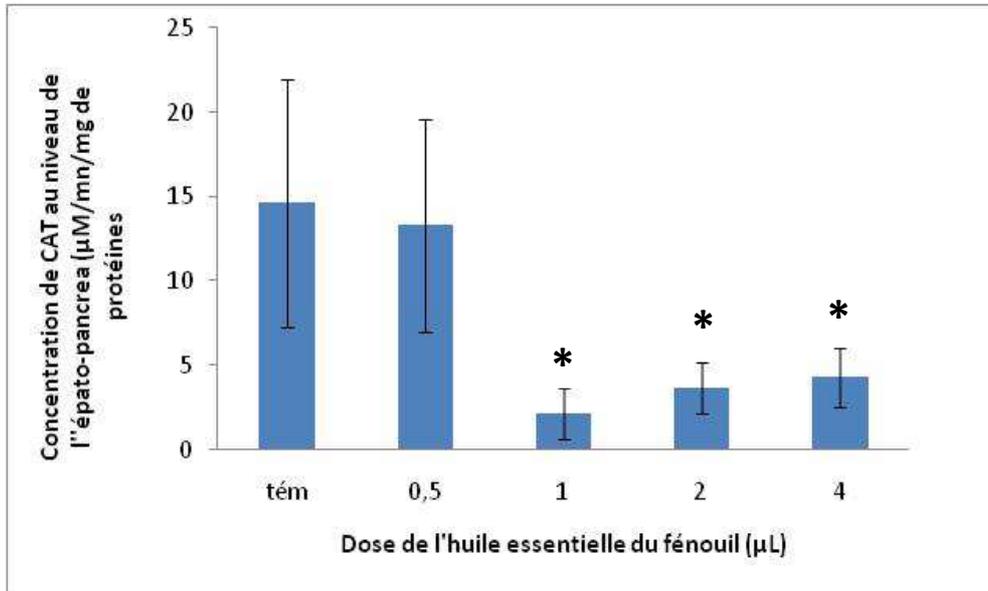


Figure 13: Variation de concentration de CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

II.3.5. Évolution de l'activité de Glutathion -S- Transférase (GST)

La **figure 14** représente l'évolution de l'activité de GST en présence d'HEs du fenouil. Nous observons, que le taux de l'activité de GST est significativement plus élevé que chez les témoins quelle que soit d'HEs utilisée avec un effet dose-dépendant assez visible. L'analyse statistique révèle qu'il y a une différence hautement significative ($P \leq 0,004$) pour les doses 0,5 ; 01 ; 02 et 04 μl ($3,7 \cdot 10^{-4}$; $4,0 \cdot 10^{-4}$; $4,7 \cdot 10^{-4}$ et $3,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot respectivement) par rapport aux témoins ($6,35 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de prot).

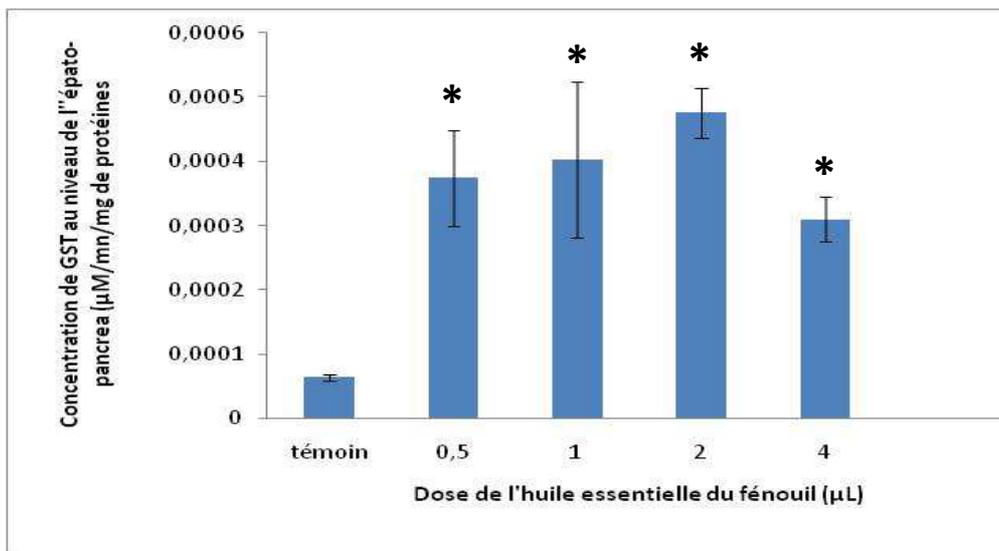


Figure 14: Variation de concentrations de GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après 21j de traitement aux huiles essentielles du fenouil.

III. Discussion

III.1. Rendement du fenouil en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielle du fenouil mesuré dans le fenouil utilisé dans cette étude était de 1.27%. Ce rendement paraît moins important que celui rapporté dans la littérature. En générale, le rendement en huile essentielle des graines du fenouil varie de 2,5 à 6 % avec une moyenne de 3,5 % (**tableaux 05**). En effet, (**Lazouni et al.,2007**)rapportent un rendement de 2,7 % pour la même espèce mais d'origine déférent. La différence peut être liée à beaucoup de facteurs tels que l'origine de la plante, la saison de récolte, le procédés d'extraction...etc.

Tableau 05 : Rendements en huile essentielle extraite des graines du fenouil dans différents pays.

Origine	Algérie	Pakistan	Brasille	Turquie	Inde
Méthode d'extraction	Entrainement à la vapeur	Hydro-distillateur de type Clevenger (1928)	Hydro-distillateur	Hydro-distillateur de type Clevenger (1928)	Hydro-distillateur de type Clevenger (1928)
Rendement	2,7%	3,8 %	2,4%	6,01%	1,2%
Référence	(Lazouni et al., 2007)	(Gulfraz et al., 2008)	(Moura et al., 2003)	(Ozcan et Chalchat., 2004)	(Singh et al., 2006)

III.2. Effets des huiles essentielles sur les paramètres biochimiques et enzymatiques

Dans notre travail nous avons choisi comme modèle biologique *Helix aspersa* qui joue un rôle majeur dans de nombreux écosystèmes (**Gomotet al.,1989**). C'est pourquoi, il est de plus en plus utilisé pour l'étude toxicologique des huiles essentielles de fenouil. Au terme de ce travail, nous avons pu confirmer la qualité exceptionnelle *d'Helix aspersa* en tant qu'organisme bio accumulateur/ bio indicateur et ce a travers, toutes les modifications, semble d'adapter aux conditions défavorables du milieu, qui se manifeste à la perturbation métaboliques(**Coeurdassier,2001**).

Nous avons cherché à évaluer les effets toxiques au niveau cérébral et hépatopancréatique par le suivi de l'activité de certains bio-marqueurs biochimiques (protéines, lipides et glucides) et enzymatique (GST, GSH et CAT). D'un autre coté la neurotoxicité

d'HEs de fenouil a été confirmée a travers la mesure de l'activité d'Acétylcholine estérase (AChE).

III.2.1. Analyse des paramètres biochimiques

Partant du principe que tout type des contraintes environnementales (stress chimique, stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution), provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002). Une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (Halliwell et Chirico, 1993), glucides et ADN (Jaeschke, 1995 ; Meneghini, 1997). Les teneurs en protéines totales est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un organisme bio indicateur (Benbouzib, 2012).

III.2.1.1. Effet sur le taux des protéines

Concernant le taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas. Dans la présente étude, nous avons constaté que le taux des protéines tend à augmenter chez les escargots traités par rapport aux témoins surtout pour les doses élevées. Cette augmentation pourrait être due à l'induction de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation sous l'effet du stress oxydative produit à la présence de différents composés bioactifs (Nahid *et al.*, 2015), lors des doses des HEs du fenouil qui ont été utilisés. De nombreuses études ont évalué l'augmentation au taux des protéines. Ces derniers vont dans le même sens que ceux qui mettent en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet des HEs du fenouil, et de persil chez des modèles biologiques différents sur certains pathogènes (*Escherichia coli*, et *Staphylococcus*) (Naouel, 2015).

III.2.1.2. Effet sur le taux des lipides

Les résultats concernant l'évolution du taux de lipides dans l'hépatopancréas mettent en évidence une diminution du taux des lipides chez les escargots traités par HEs du fenouil comparativement aux témoins. Cette diminution s'accroît avec l'augmentation de la dose ingérée.

Selon (Aurousseau, 2002) les radicaux oxygénés libres sont toxiques via la dégradation des lipides. Ces résultats vont dans le même sens que ceux rapportés dans (Hélène et Nadine, 2007) qui ont montré une diminution du taux des lipides chez les ravageurs traités par

les HES de thym de sauge. Le taux de lipides peut être également affecté par le mode de nutrition de l'escargot qui est semis herbivore dans les écosystèmes terrestres (Beeby, 1985).

III.2.1.3. Effet sur le taux des glucides

L'allure générale des résultats obtenus dans cette étude montrent une légère augmentation du taux des glucides dans l'hépatopancréas des escargots. Cette augmentation devient significative à forte dose. Ces résultats suggèrent un épuisement du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot traité par HES de fenouil. Cet effet, serait dû à l'utilisation directe du glycogène pour la régénération d'énergie ou suite à une hypoxie. Les glucides sont les sources d'énergie primaires et immédiates, en état d'effort des réserves glucidiques sont épuisées pour satisfaire des demandes énergétiques accrues. Supposer que le groupe traité pourrait affecter directement la synthèse, le stockage et la décomposition du glycogène dans le foie (Massin et Erginay, 2010).

(El-Soud *et al.*, 2011) ont réalisé une étude sur l'effet des HES sur le taux des glucides chez les rats. Ils ont trouvé que les petites doses HES exercent un équilibre du taux du glucose. A forte dose, il se manifeste des irritations surtout oculaires et une hyperglycémie.

III.2.2. Analyse des paramètres enzymatiques

Lorsque les capacités des protéines de stress permettant la détoxification cellulaire sont dépassées, les xénobiotiques vont s'accumuler dans les cellules et leurs effets toxiques deviennent alors apparents. Les mécanismes cellulaires qui entrent alors en jeu permettent de limiter ces effets en facilitant l'excrétion des contaminants et en prenant en charge les produits réactifs qu'ils génèrent. Pour limiter les attaques oxydatives sur les biomolécules, liées à la génération de ROS inhérente à la vie aérobie, une batterie d'acteurs antioxydants permet de dégrader ou prendre en charge la catalase qui réduit le peroxyde d'hydrogène, les glutathion peroxydases qui réduisent les peroxydes grâce à l'oxydation du GSH. La glutathion réductase qui régénère le glutathion oxydé grâce au NADPH et participe donc indirectement aux défenses anti-oxydantes (Nahidet *et al.*, 2015).

III.2.2.1. Évolution du taux de Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde c'est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation de l'acide gras polyinsaturé des membranes. Il est également un sous-produit de la biosynthèse de la prostaglandine (Coeurdassier, 2001). Les ERO peuvent oxyder les lipides (Ercalet *al.*, 2001 ; Tweeddale *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous avons constaté que le taux du MDA tend à augmenter significativement au niveau d'hépatopancréas des escargots traité par les HES du fenouil.

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Bebianno *et al.*, 2005) ou d'autres éléments contenant des lipides (Al-Mutairi *et al.*, 2007). Il s'ensuit une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane, une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Pampanin *et al.*, 1957). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules, l'augmentation des teneurs en MDA puisque celui-ci est un produit de la peroxydation lipidique. Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Malini *et al.*, 1985) qui ont mis en évidence une augmentation d'MDA chez un autre modèle biologique qui est le rat.

III.2.2.2. Évolution du taux de glutathion (GSH)

Le glutathion (GSH) est un composé thiol constitué d'une succession de trois acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine, présente. Il joue un rôle de détoxification des substances endogènes ou xénobiotiques et protège les cellules contre un stress oxydant.

Nos résultats mettent en évidence une diminution du taux des GSH en présence d'HES du fenouil au niveau de l'hépatopancréas du taux de la GSH. Cette diminution est une réponse au stress oxydatif provoqué par la présence de HES (Farombi *et al.*, 2007). La forte diminution du taux de la GSH pourrait s'expliquer par une réaction/liaison directe du biopesticide avec le glutathion, en effet les groupements carboxyles du glutathion (groupe amine, groupe sulfhydryle (-SH) ainsi que deux peptides) se conjuguent avec le le groupement active d'HES (Galaris *et al.*, 2002). Cette interaction glutathion-biopesticide a lieu grâce à l'intervention de la GST qui permet la conjugaison du xénobiotique ou ses métabolites avec le GSH durant la phase II de la métabolisation. Cette conjugaison au GSH (cofacteur) par une liaison covalente impliquant le soufre du résidu cystéyl avec production de (GSSG).

III.2.2.3. Évolution du taux d'acétylcholine estérase (AChE)

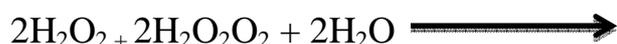
L'évolution de l'activité spécifique d'AChE en présence d'HEs du fenouil au niveau de des têtes des escargots montre une diminution progressive suite à l'exposition aux différentes concentrations. Le mode d'action de ses HEs se caractérise par une excitation du système nerveux avec l'activation des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR), accompagnés d'effets sur (GABA) la fonction des récepteurs et canaux chlorure GABA-dépendants (**Salgado, 1998**).

L'inhibition de l'acétylcholinestérase conduit à l'accumulation d'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques à des niveaux toxiques conduisant à une sur-stimulation des récepteurs muscariniques et nicotiques. Ce "syndrome cholinergique" comprend les signes et symptômes tels que des troubles du comportement des escargots accompagné d'une inhibition de leurs croissance (**Bouaricha, 2013**). Nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Enan, 2002**) chez les insectes traités par des HEs de *C. maculatus* qui bloque le site actifs de fixation de l'AChE par inhibition de synthèses de neurotransmetteur. Plusieurs rapports indiquent que les monoterpénoïdes causent l'inhibition (AChE) et aboutissent à la mort (**Houghton et al., 2006 ; López et Pascual-Villalobos, 2010**).

III.2.2.4. Évolution du taux de catalase (CAT)

Les résultats concernant la catalase indiquent une diminution de l'activité spécifique de cette enzyme chez les escargots traités par HEs du fenouil par rapport aux témoins surtout pour la dose élevée.

La catalase est une enzyme antioxydante tétramérique, localisée aux niveaux de cytoplasme et peroxysomes dont le rôle est de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ selon l'équation suivante (**Boon et al., 2007**):



Les HE du fenouil en excès exercent un effet inhibiteur sur l'activité de la catalase. L'origine de cette inhibition reste inexpliquée à notre connaissance. Il se peut que l'explication soit liée à l'espèce animale utilisée (l'escargot) ou à la nature de son alimentation (salade) ou par le fait que l'un des composants de cette HEs inhibent l'activité de la catalase. Pour l'instant, nous n'avons pas pu expliquer exactement ce résultat à la lumière de la bibliographie. En revanche, ce résultat est différent de ceux rapportés dans la

littérature. En effet, (Sadeghpour *et al.*, 2015) pour ces auteurs l'induction de l'activité de la CAT pourrait être expliquée par la production des ROS, de l'anion superoxyde. Ce dernier stimule l'activité de la SOD, laquelle produit de H₂O₂, qui stimule l'activité de la catalase. qui témoigne d'une production exagérée des radicaux libre suite à la formation de l'homocysteine et le blocage la voie de (Woo, 2006).

III.2.2.5. Évolution du taux de glutathion(GST)

Le taux de l'activité de GST est significativement plus élevé que chez les témoins quelle que soit d'HEs du fenouil utilisée avec un effet dose-dépendant assez visible.

La glutathion S-transférase est un principal acteur du métabolisme des composées électrophiles. Elles catalysent souvent la conjugaison des molécules électrophiles avec le glutathion réduit (GSH). Les résultats concernant l'activité du glutathion S-transférase (GST) observés dans cette étude indiquent une augmentation de l'activité spécifique de cette enzyme chez les escargots traité par les HEs du fenouil. L'étude de (Nahid *et al.*, 2015) sur l'effets des HE du fenouil sur la souris montre une également une augmentation significative du taux de GST. Cette augmentation se traduit par une forte capacité de détoxification du foie en réponse à l'élévation des concentrations des radicaux libres issue de la supplémentation de ces HEs.

Conclusion

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude était de d'évaluer la toxicité induite par les huiles essentielles du fenouil en estimant leurs effets sur les paramètres, biochimiques et enzymatiques chez un gastéropode terrestres l'escargot *Helix aspersa*.

A la lumière des résultats de ce travail, on peut conclure que l'espèce *Helix aspersa* est particulièrement sensible aux huiles essentielles du fenouil. Cette sensibilité se manifeste par une perturbation des biomarqueurs du stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas et une neurotoxicité au niveau du cerveau. En effet, une augmentation du taux des protéines et de glucides associée et une diminution du taux des lipides a été observée dans cette étude.

En plus, il apparait que les doses des HE du fenouil induisent également un stress oxydative en activant le système de détoxification, par le biais d'une augmentation des activités de la GST, CAT, et une diminution du taux de GSH. Ses modifications sont probablement liées à une augmentation de libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des HEs du Fenouil. En fin, les HEs du fenouil montrent également neurotoxiques induisant des perturbations biochimiques et enzymatiques au niveau cérébral.

Les résultats cette étude montrent que l'utilisation des huiles essentielles du fenouil dans la médecine traditionnelle. Elle doit être faite avec prudence. En effet, au-dessus de certaines doses, des propriétés toxiques peuvent apparaître notamment sur les systèmes hépatique, pancréatique et cérébral.

Dans ce modeste travail, nous n'avons pas accomplir tous les aspects de recherche envisagées à cause des difficultés liées à la disponibilité en temps et en moyens d'expérimentation. Néanmoins, et vue l'importance des résultats de cette étude, il serait intéressant de la faire poursuivre, en prenant en considération les recommandations suivantes :

- Utilisé la méthode d'injection au lieu de la contamination qui peut donner des résultats plus précis.
- Doser d'autres paramètres du stress oxydant (SOD, GPx...).
- Réaliser une étude histologique des organes d'*Helix aspersa* (hépatopancréas, rein...).
- Etudier la toxicité d'huiles essentielles de fenouil sur les escargots juvéniles.
- Approfondir les essais au niveau de reins des escargots.

*Références
bibliographiques*

A

Abdul W., 2004. Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and economic yield of sugarcane. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 133-141.

Abrahamsson, K., Choo, K.-S., Pedersén, M., Johansson, G., Snoeijs, P. (2003). *Ann. Bot.* 89: 887- 894.

ARDAM, 2007. L'épuration des eaux usées : le langage naturel-Cas de la station de Mèze Loupian/ Ecosite du Pays de Thau. Pagesperso-organe.Fr/ardam/ images/pdf/DL angunage % 20(ad).Pdf.

Arnon D.I., 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-25.

Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Cur. Sci.* 82, 1227-1238.

Attionu RH, 1976. Some effects of water lettuce (*Pistia stratiotes, L.*) On its habitat. *Hydrobiologia* 50(3), 245-254.

Aymenryc., guillaume L, 2011. Plante aquatique, eau pure. Edition Sang de la Terre, paris. 55.

Aydin S., Başaran A.A., Başaran N. 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research*, 581(12) : 43-53pp.

Aydin Y., Kutlay O., Ari S., Duman S., Uzuner K., Aydin S. 2007. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Medica*. 73(13) : 1365-1371pp.

B

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol* 46 : 446-475pp.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie. Phytochimie plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3^{ème} édition. Paris. 345pp.

Bruneton J. 1993. Pharmacognosie. Phytochimie plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier, 2^{ème} édition, Paris. 915 pp.

Barrie S.A., Wright J.V., Pizzorno J. E. 1987. Effects of Garlic Oil on Platelet.

Buser P., Combes C. 2009. Obtention du cycle de vie complet d'*Helix aspersa*

Born de sites tunisiens en conditions contrôlée : influence de la photopériode. *Comptes Rendus de Biologie* .332: 795-805pp.

Bailey S.E.R. 1981. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Journal of Comparative Physiology* .142: 89-94pp.

Bradford M. M. A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254pp.

Boucenna M. 2010. Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. *Mémoire de magister. Université Badji Mokhtar. Annaba.* 74 pp.

Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Medoni A. 2005.

Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75 : 354–373 pp.

Benbouzib H. 2012. Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat de l'université d'Annaba. 87 pp.

B. Badgajar., Vainav V., P. Atmaram H. Bandivdekar.

2014. Phytochemistry. Pharmacology. Contemporary Application and Toxicology Shamkant. *Foeniculum vulgare* Mill. A Review of Its Botany BioMed Research International. Volume Article ID 842674 : 32 pp.

B. Dominique. 1991. Etude pharmacologique - des propriétés diurétiques d'extraits

d'*Orthosiphon*. de piloselle. de 'Sureau noir. de Fenouil doux et de Busserole chez le rat .thèse présentée pour obtenir le diplôme de doctoratd .

C

Chowdhury J.U., Mobarok H. Bhuiyan N.I., Nandi N.C. 2009. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated. *Bangladesh J. Bot* 38(2):181-183pp.

- Clarke S. 2008.** Chemistry of essential oil. *1st Edition* ELSEVIER. British. 302 pp.
- Chevallier H. 1977.** La variabilité de l'escargot Petit-Gris (*Helix aspersa* Müller). Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle. *3ème série N° 448. Zoologie.* 311 pp.
- Chevallier H. 1992.** L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. *2ème édition.* Edition du point vétérinaire. *Maison-Alfort.*
- Chevallier H. 1982.** Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis.* 12 : 29-46pp.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. Vasseur P. 1997.** Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux.* Masson. Paris .149-163pp.
- Coeurdassier M., 2001.** Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat. université de Franche Comté. France : 281pp.
- Coeurdassier M. 2001.** Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat. université de Franche Comté. France. 281pp.
- Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001.** The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 20 : 1951-1957 pp.

D

- Dhar S.K. 1995.** Anti-fertility activity and hormonal profile of trans-anethole in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39 : 63-67pp.
- Daguzan J. 1983.** Principales caractéristiques biologiques et ecophysiologiques de l'escargot. In: Daguzan. J. Ed. *L'escargot et l'Heliciculture.* Informations techniques des services vétérinaires. Paris. 207pp.
- Duchateau G., Florkin. 1959.** For trehalose in insects and its significance. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.* 67:306-314pp.

E

- EFSA. 2009.** EFSA Scientific cooperation (ESCO) working group on botanicals and botanical preparations, Advice on the EFSA guidance document for the safety assessment of

botanicals and botanical preparations intended for use as food supplements, based on real case studies on request of EFSA. *EFSA Journal*.7(9):280-104pp.

Ebeed N.M., Abdou H.S., Booles H.F., Salah S.H., Ahmed E. S., Fahmy K. 2010.Antimutagenic and chemoprevention potentialities of sweet fennel *Foeniculum vulgare* Mill, hot water crude extract. *Journal of American Science* 6 (9):831-822pp.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Featherstone R.M. 1961.A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*7 : 88-95pp.

Enan E. 2002.Insecticidal activity of essential oils : octopaminergic site of action comparative biochemistry and physiology and pharmacology part c 130.vol(3) :325-333 pp.

Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. 2001.Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* : 529-39 pp.

Extract Effects on Serum Level of Oxidative Stress. *Journal of Medical and Biological Sciences* Vol. 2. No 2 : 59-63pp.

F

Franchomme P.2015.La science des huiles essentielles médicinales.Guy Trédaniel. Paris.

F. M. Birdane M., Cemek Y., O. Birdane,I. Gulcin., E. B'uyukokuro'glu. 2007.“Beneficial effects of vulgare ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rat.”*World Journal of Gastroenterology*,vol. 13. No 4.607-611 pp.

G

Garnéro J.1996.Huiles essentielles. Techniques del'Ingénieur.traité Constantes physicochimiques : K 345-1 : 39pp.

Guenther T.M., Luo G.2001.Investigation of the role of the 2',3'-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. *Toxicology* 160 : 47-58pp.

Guhennec M.F.1985.Etude de l'influence de la lumière sur la croissance et la reproduction de l'escargot « petits-gris » *Helix aspersa* Müller (Gastéropode.Pulmoné. Stylommatophore). *Doctorat de l'Université de Rennes I.* 309 pp.

Gomot L.,EneeJ. 1980.Biologie de la reproduction de l'escargot *Helix aspersa* Muller :Les phases de la croissance et de la différenciation sexuelle. *Atti. Accad. Fisiocrit.* Siena.37 : 73-85pp.

Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruckert S. 1989.Influence of soil on the growth on the land snail *Helix aspersa*.An experimental study of absorption route for the stimulating factors. J. Moll. Stud 55 : 1-7pp.

Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J.1972. Studies on insect adipokinetic hormones. Gen. Comp. Endocrinol 18 (3): 545pp.

Goth L.1991 a.Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. Clin Chem.37(12): 2043-2047pp.

Gomot-de Vaufleury A., Kerhoas I. 2000.Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 64 :434-442pp.

Gulfraz M., Mehmood S ., Minhas N., Jabeen N., Kausar R., Jabeen K. Arshad G., 2008.Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *African Journal of Biotechnology* .Vol. 7 (24) : 4364-4368 pp

Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruckert S. 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies* 55 : 1-7 pp.

H

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.1974.Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249 : 7130-7139pp.

Halliwel Chirico S. 1993.Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 57 : 715-724 pp.

Hartnoll G., Moore D., Douek D.1993.Near fatal ingestion of oil of cloves. *Arch Dis Child* 69 : 392-393pp

Hendawy S.F.,Ezz El-Din A.A.2010.Growth and yield of *Foeniculum vulgare* var *azoricum* as influenced by some vitamins and amino acids. *Ozean Journal of Applied Sciences*3(1) :113-122pp.

Hélène C.,Nadine B.2007. Les huiles essentielles des biopesticides ce nouveau Genre. *Revue de littérature*. *Buélletin de la société d'entomologie du Qubec* .vol (14). No1.33pp.

Horváthová E., Sramková M., Lábaj J., Slamenová D.2006.Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured *in vitro*. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27 Suppl . 2 : 44-47pp.

Houghton P.J., Ren Y., Howes M.J. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports*. 23. 181-199 pp.

I

Iglesias J., Castillejo J.1999.Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa*Müller. *J. Moll. Stud.*65 : 411-423pp.

J

Jaeschke H. 1995.Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209 : 104-111 pp.

Janes S.E.J.,Price C.S.G., Thomas D.2005.Essential oil poisoning:N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. *European Journal of Pediatrics*164(8) :520-522pp.

JolloisR., PénoëlD.,FranchommeP., MarsJ.2001.L'aromathérapie exactement:encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles :fondements.démonstration.illustration et applications d'une science médicale naturelle. 1ère édition Springer Verlag France.

J.R. Skrobonja.,D.N.Delić., M. A.Karaman., M.N.Matavulj., M. A. Bogavac. 2013.“Antifungal properties of *Foeniculum vulgare*.Carum carvi and *Eucalyptus* sp. essential oils against *Candida albicans* strains.” *Journal of Natural Science*.vol. 124 : 195- 202 pp.

K

Kaur G.J.,Arora D.S.2010. Bioactive potential of *Anethum graveolens*,*Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae,Current status. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol 4(2):87-094pp.

Kothe H.W.2008.1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre éditions. Toulouse, 328pp.

Klobucar G.I.V., Lajtner J.Erben R.1997.Lipid peroxidation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater Planorbis corneus L. (Gastropoda:Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 : 128-134pp.

Kloss J.L., Boeckman C.R.196.Methyl salicylate poisoning.Case report and discussion of treatment by peritoneal dialysis. *Ohio State Med J.* 63. 1064-1065pp.

L

Lake B.G. 1999. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity, relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol* 37: 423-453pp.

Lambert P. 2010. Huiles essentielles POUR l'aromathérapie. Laboratoire Florilab. toulouse (France). 53-55 pp.

Lazouni H.A., Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A., Chabane Sari D. 2007. Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie C- N°25*, 7-12pp.

Lazouni A., Benmansour A., Chabane Sari D., Smahi E. 2006. Valeurs nutritives et toxicité du foeniculum vulgare miller. *Afrique SCIENCE* .02(1).95pp.

Lazouni H.A., Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A., Chabane Sari D. 2007. Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie C - N25* .7-12 pp.

López M.D., Pascual-Villalobos M.J. 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*. 31. 284-288 pp.

Luke E. 1962. Addiction to mentholated cigarettes. *The Lancet* .110-111pp.

M

Madec L. 1983. Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI, Rennes. France.

Magyar J., Szentandrassy N., Bányász T., Fülöp, L., Varró A., Nánási P.P. 2004. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*. 487(13) : 29-36pp.

Marchese J.A., Sousa L.A. 2006b. Essential oil constituents of different organs of *Foeniculum vulgare* . *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu* .Vol8 :193-198pp.

Massin P., Erginay A. 2010. Rétinopathie diabétique. Ed : 2SAS. Italie. 111pp.

Meneghini R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 23 : 783-792 pp.

Mohammedi Z. 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère. Département de biologie. Faculté des sciences. UABB de Tlemcen.

Mohammadkhani N., Heidari, R. 2008. Water stress induced by polyethylene glycol 6000 and sodium chloride in two corn cultivars. *Pak. J. Biol. Sci.* 11(1): 92-97 pp.

Mohamed M.,Abdu M.2004.Growth and oil production of fennel *Foeniculum vulgare* Mill. effect of irrigation and organic fertilization. *Biol. A. Hort.*31-39pp.

Moura L.S., Carvalho Junior R.N., Quispe-Condori S., Rosa P.T.V., Ming L.C. Meireles M.A.A. 2003.Determination of the global yields for the system fennel (*Foeniculum vulgare*) + CO₂. University of the State of São Paulo, Botucatu, São Paulo . Brazil.6 pp

Mishra U., Kamalakannan K., Saravanankumar A., Sivakumar T.2008. In-vitro Cytoprotection activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in cultured human blood Lymphocytes and antitumour activity against B16F10 melanoma cell line. *Research J. Pharm. and Tech.*1(4):450-454pp.

Mimica-Dukic N.,KujundzicS.,Sokovic M., Couladis M.2003.Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res*17 (4) : 368-371pp.

Murdock D.H.2002.The Encyclopedia of Foods A Guide to Healthy Nutrition.Elsevier's Science & Technology.OxfordUK .529pp.

N

Naouel ouis. 2015.Etude chimique et biologique de huiles essentielles de coriandre de fenouil. et de persil.Thèse de doctora .(université oran).

N. A. El-Soud., N. El-Laithy., G. El-Saeed .2011.“Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* mill. Essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats,” *Macedonian Journal of Medical Sciences.* vol 4. No 2 : 139–146pp.

Nahid S, Azadeh Montaseri², Alireza Najafpour³, Homayun Dolatkah⁴, Asghar Rajabzadeh¹,Amir Afshin Khaki . 2015.Study of*Foeniculum vulgare*Fennel.Seed
Sadeghpour N., Montaseri A., Najafpour A., Dolatkah H., Rajabzadeh A., Khaki AA.2015.Study of*Foeniculum Vulgare* (Fennel) Seed Extract Effects on Serum Level of Oxidative Stress. *Crescent J Med & Biol Sci* 2(2): 59-63 pp.

O

Olle Mand BenderI.2010.The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8(3) :687-696pp.

Özcan M., Akgül A.2001.Chemical composition of the essential oil of bitter fennel *Foeniculum vulgare* sub,piperitum .J. Spices Arom Crops 10:49-50pp.

Özcan M.M., Chalchat J.C. 2004.Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (3-4).68-73 pp.

P

Pradhan M., Sribhuwaneswari S., Karthikeyan D., Minz S., Sure P., Chandu A.N., Singh G., Maurya S., de Lampasona M.P., Catalan C.2006.Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. Food Control Vol(17):745–752pp.

Padrini F., Lucheroni M.T. 1996.le grande livre des huiles essentielles .Ed de Vecchi. Page 115pp.

Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C.2005.Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). Mar. Pollut. Bull .50 : 1548–1557 pp.

R

Regoli F., Pricipato G. 1995.Glutathione-glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. Aquatic Toxicology . 31: 143-164pp.

Ribera D., Narbonne J.F., Michel X., Livingstone D.R., O'hara S.1991.Responses of antioxidant and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. Comp. Biochem. Physiol. C100 : 178-181pp.

Rather M. 2012.*Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phyto-pharmacology and safety. *Arabian Journal of Chemistry*.3-4 : 56pp.

S

Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J. A.2006a.Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var *variculis* in the season of the year. Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu Vol8 :86-90pp.

Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Moura L.S., Silano V., Delbò M.2008.Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. EMEA, European Medicines Agency. London. 23pp.

Saunders N.R., Knott G.W., Dziegielewska K.M.2000. Barriers in the immature brain. Cell.Mol. Neurobiol.20 : 29-40pp.

Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., Newhall A., Freidman L.1966.A method

for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem* 19 : 415-428pp.

Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneck C., Newhall A., Freidman L. 1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem.* 19 : 415-428pp.

Singh G., Maurya S., de Lampasona M.P. Catalan C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control.* Vol 17 : 745–752 pp.

T

Tanira M.M., Shah A.H., Mohsin A., Ageel A.M., Qureshi S.1996. Pharmacological and toxicological investigations on *Foeniculum vulgare* dried fruit extract in experimental animals. *Phytotherapy Research* .Vol(10).33-36pp.

Thomas J.G.1962. Peppermint fibrillation. *The Lancet* 279-222pp.

Tisserand R., Young R.2013. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals, 2^{ème} édition. Churchill Livingstone.

Toaff M.E., Abramovici, A., Sporn J., Liban, E.1979. Selective oocyte degeneration and impaired fertility in rats treated with the aliphatic monoterpene. *Citral. J. Reprod. Fertil.* 55 : 347-352pp.

Tweeddale H.J., Kondo M., Gebicki J.M. 2007. Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Archives of biochemistry and biophysics* : 151-459 pp.

T. Malini G., Vanithakumari., N. Megala., S. Anusya K Devi., V. Elango. Effect of *Foeniculum vulgare*. Mill seed extract on the genital organs of male and female rats.” *Indian Journal of Physiology and Pharmacology.* vol. 29. No1.21–26 : 1985 pp.

V

Vienna C.F., Bauer R., Carle R., Tedesco D., Tubaro A., Zitterl-Eglseer K.2005. Assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in animal production. *FEEDAP.* 297pp.

Vallance W.B.1955. Pennyroyal poisoning: a fatal case. *Lancet* 269. 850-851pp.

W

Weckberker G., Cory G . 1988.Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. Cancer letters 40: 257-264pp.

Υ

Yasmine G., Mohammed O., Ali A., Said C., Abdessalam T., Touriya B. 2014. Antimicrobial property of the essential oil from the Moroccan fennel fruits . Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research . Vol(1). No.1. 25-33 pp.

Z

Zahid N.Y., Abbasi N.A., Hafiz I.A., Ahmad Z. 2009. Genetic diversity of indigenous fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). Germplasm in Pakistan assessed by RAPD markers. Pak. J. Bot 41(4) : 1759-1767pp.

Les sites d'internet :

http://fr.wikipedia.org/wiki/Helix_aspersa_naturae_scientia_aspersa#mediaviewer/Fichier:Caracol_snail_Galicia.jpg.

http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title:Fichier:Foeniculum_vulgare_Köhlers_Medizinal-Pflanzen-148.jp : Licence Public Domain
Contributeurs: Franz Eugen Köhler. Köhler's Medizinal-Pflanzen.

Les annexes

Annexe 01 : Dosage des protéines.

Tableau 06 : La réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines au niveau d'hépatopancréas.

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (μ l)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	00
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau 07 : Dosage des protéines: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de BSA	20	40	60	80	100
Absorbance(DO)	0,868	1,243	1,553	1,871	1,954

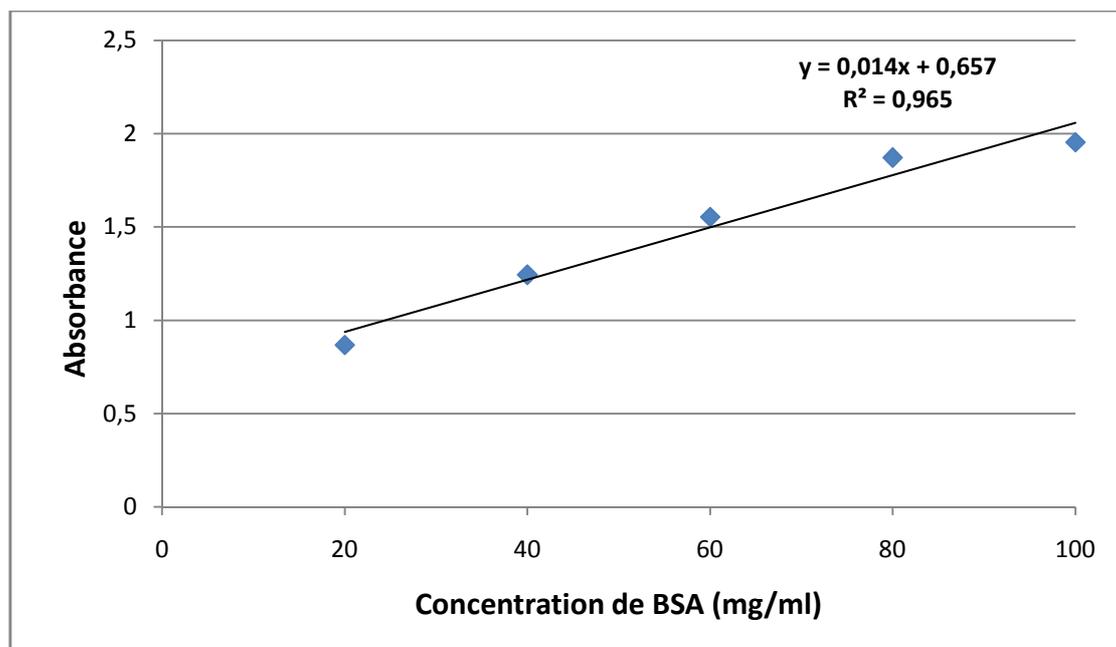


Figure15 : Droite de régression expérimentant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).

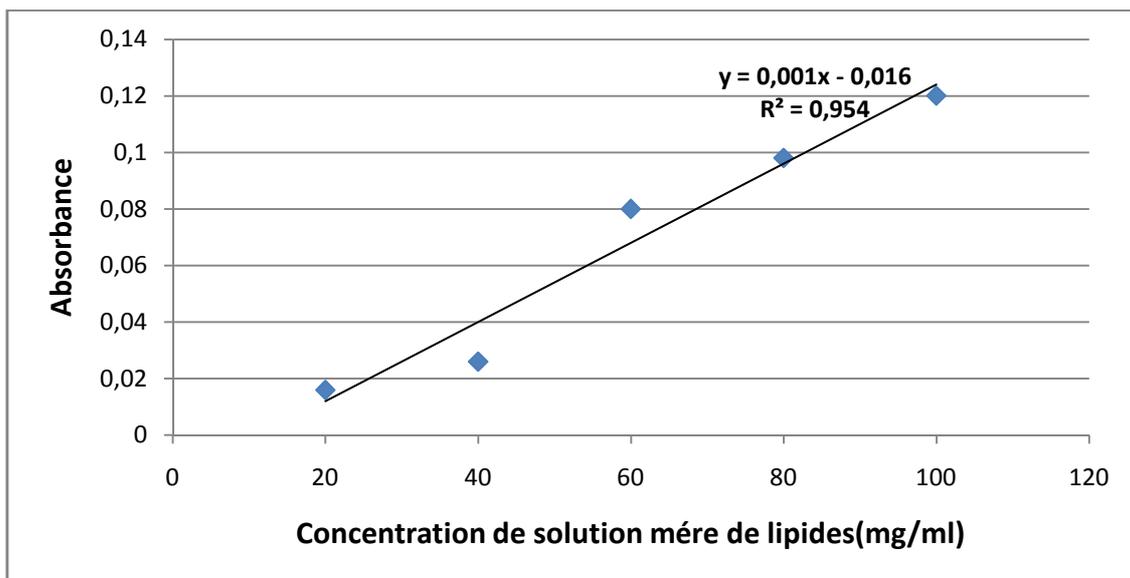
Annexe 02 : Dosage des lipides.

Tableau 08 : La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les lipides au niveaux d'hépatopancréas.

.Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	00	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V) ml	100	80	60	40	20	00
Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Tableau 09: Dosage des lipides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de solution de lipides (mg/ml)	20	40	60	80	100
Absorbance (DO)	0,016	0,026	0,08	0,098	0,12

Figure16: Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).

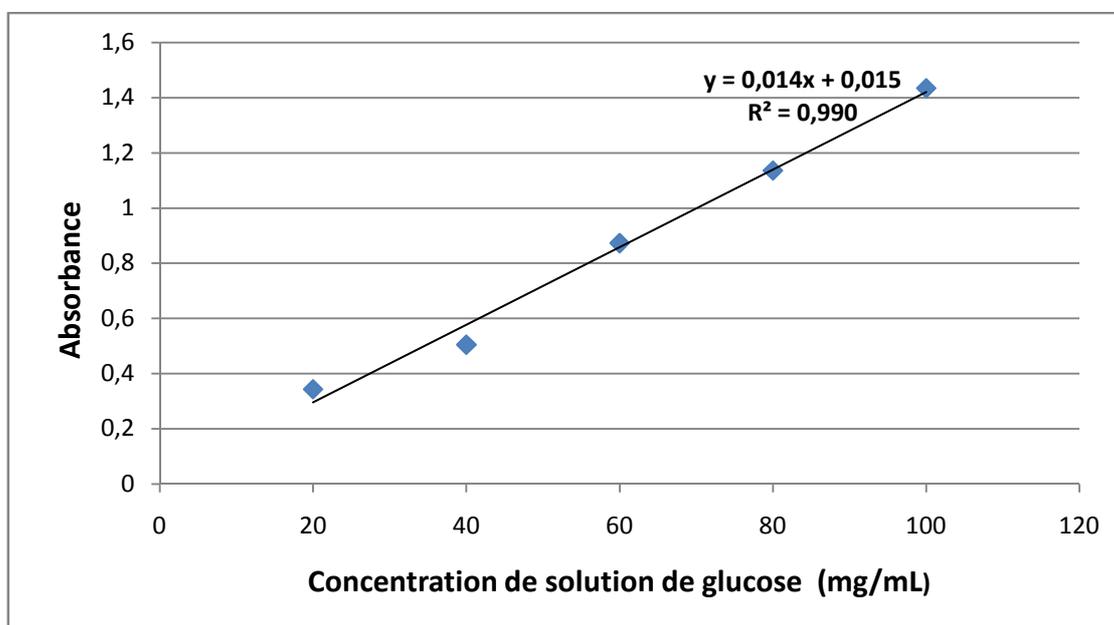
Annexe 03 : Dosage des glucides.

Tableau 10: La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les glucides au niveaux d'hépatopancreas.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (µl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	00
Réactif d'Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau 11 : Dosage des glucides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de solution glucose (mg/ml)		20	40	60	80	100
Absorbance (DO)		0,344	0,505	0,873	1,136	1,434

Figure17: Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).



Université Larbi Tébessi - Tébessa



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e), **HAMZI Souad**
Nom, Prénom :
Régulièrement inscrit(e) en Master au département **Biologie Appliquée**
N° de carte d'étudiant : **10121267934**
Année universitaire : **2016/2017**
Domaine : **Science de la nature et de la Vie**
Filière : **Science biologique**
Spécialité : **Analyse Toxicologique et Biochimique**
Intitulé du mémoire : **Etude toxicologique des huiles essentielles du fenouil**

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : **04/06/2017**

Signature de l'étudiant(e)



Université Larbi Tébessi - Tébessa

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : HAMLA Souley

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 1012/4026951

Année universitaire : 2016/2017

Domaine : Science de la nature et de la Vie

Filière : Science biologique

Spécialité : Analyse Toxicologique et Biochimique

Intitulé du mémoire : Etude toxicologique des huiles essentielles
du fenouil

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 04/06/2017

Signature de l'étudiant(e) :

Hamla