

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 35/D3C/2018

N° de série : 01/BA/2018



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement
Option :

Présentée et soutenu par :

Lahneche Amina Maya

Intitulé

**L'effet protecteur des extraits de la
plante *Centaurea sphaerocephala* L. vis-
à-vis de la toxicité induite par l'acide
valproïque : Etude in vitro et in vivo**

Membres de jury

Président : Laalaoui Korichi Professeur Université Frères Mentouri Constantine.

Directrice de thèse : Zama Djamila Professeur Université Frères Mentouri Constantine.

Examinatrice : Dahamna Saliha Professeur Université Ferhat Abbas Sétif.

Examineur : Khennouf Seddik Professeur Université Ferhat Abbas Sétif.

Examineur : Amrani Amel MCA Université Frères Mentouri Constantine

**Année universitaire :
2017 - 2018**

REMERCIEMENTS

Au nom de dieu Clément et miséricordieux grâce à qui nous sommes réunis pour un travail scientifique.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Professeur **Zama Djamil**a qui a initié, suivi et dirigé ce travail durant toutes ces années. Je la remercie tout particulièrement pour l'intérêt qu'elle a porté à ce sujet, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour les conseils prodigués tout au long de ce parcours, ainsi que pour sa patience et sa compréhension. Puissiez-vous trouvez mon infinie reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude vont également à Monsieur **Lalaoui Korichi**, professeur à l'université Mentouri Constantine 1, qui me fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ma thèse.

Mes vifs remerciements à Madame **Amrani Amel**, maitre de conférences A à l'université Mentouri Constantine 1, qui m'honneur de sa participation au jury de ma thèse en tant qu'examinatrice.

Mes remerciements à madame **Dahamna Saliha**, professeur à l'université de Setif, qui m'a honorée de sa présence en tant qu'examinatrice au jury de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **Khennouf Sedik**, professeur à l'université de Setif, qui m'a fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineur.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au professeur **Ibrahim Demirtas**, professeur à l'université Çankiri Karatekin, Uluyazi Campus, Türkiye, je tiens à lui exprimer mes plus sincères remerciements pour l'intérêt manifesté, la chaleur de son accueil, la confiance témoignée et le soutien constant accordé durant mon séjour.

Ma profonde gratitude va également à Madame **Bensaci Sabah**, professeur au Service d'Anatomie Pathologique EHS Daksi Constantine grâce à qui j'ai pu avancer dans mon travail sur le plan anatomo-pathologique.

Je remercie également les membres de l'équipe (Biologie Animale) : Docteur Djebbari Radja, Docteur Amel Amrani, Docteur Nassima Boubekri, Docteur Somia Lassed, Khadidja Bekhouche, Aicha Latreche.

Mon infinie reconnaissance à ma chère amie **Djebbari Radja** qui m'a toujours soutenue, encouragé, accompagné tout au long de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents, vous m'avez inculqué le sens de l'abnégation, de l'assiduité et de l'effort ce qui m'a motivé pour l'accomplissement de ce travail qui j'espère vous rendre plus fières.

A mes frères "Chemsse Eddine et Med Adlene" mes sœurs "Doria et Nany".

A mon mari "Hamza " qui n'a en cesse de m'encourager, de m'orienter parfois a fin de réaliser ce travail.

A mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines, ma belle-famille.

A mon adorable grand-mère "Mami".

A mes amies : Lina, Belhadj Mostefa Maya, Bouafia Maya, Dallel et Ibtissem.

Que ceux ou celles que j'ai omis de remercier m'en excusent.

Communications et publications

Publications:

Amina Maya Lahneche , Ratiba Boucheham , Nassima Boubekri , Sabah Bensaci , Sabrina Bicha , Ali Bentamenne , Fadila Benayache , Samir Benayache , Djamila Zama. Sodium Valproate-Induced Hepatic Dysfunction in Albino Rats and Protective Role of n-Butanol Extract of *Centaurea sphaerocephala* L. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2017; 9(10): 1335-1343.

Communications par affiches:

Amina Maya Lahneche, Ratiba Bouchhem , Nassima Boubekri,,Radja Djebbari,Amel Amrani,Ali Bentamene,Djamila Zama, Fadila Benayache,Samir Benayache. **In vitro antioxidant activities of n-butanol and ethyl acetate extracts of *Centaurea sp.*** At the IXth International congress of physiology and Environmental Biomonitoring.20-23 December 2015, Tabarka,Tunisia.

Amina Maya Lahneche, Lhadj Koli, Nassima Boubekri, Amel Amrani, Djamila Zama, Fadila Benayache, Samir Benayache. **In vitro antioxidant activity and total phenolic content of butanol extract of *Centaurea omphalotricha.*** II éme Congrès International de Biothechnologie et Valorisation des Bio-Ressources(BVBR). 18-23 mars 2014, Tabarka, Tunisie.

Zama Djamila, Lassed Somia, **Lahneche Amina Maya**, Boumoud Meriem, Bouchair Mohamed, Boubekri Nassima, Amrani Amel, Benayache Fadila, Benayache Samir. « **Impact of green tea consumption on oxidative stress in cardiovascular patients** », 11th International Ethnobotany Symposio, in Antalya/Turkey2-5 november, 2013, Volume: Emir. J. Food Agric. 2013. 25 Suppl. Issue <http://www.ejfa.info/>

Radja Djebbari, Yasmin Chemam, Amel Amrani, Somia Lassed, Nassima Boubekri, **Amina Maya Lahneche**, Fadila Benayache, Samir Benayache, Djamila Zama. **In vitro antioxidant activities of n-butanol extract of *Helianthemum confertum.*** IX international congress of physiology and environmental biomonitoring 20-23 December 2015, Tabarka, Tunisia.

Lamia Zehani,Nesrine Sfaksi,Somia Lassed, **Amina Maya Lahneche**,Sabrina Bicha,Fadila Benayache,Samir Benayache,Zama Djamila. **Evaluation of total phenols and flavonoids contents and in vitro antioxidant activity of *Volutaria sp.*** VI^{ème} congrès international de Biotechnologie et valorization des Bio-ressources,organisé par L'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka-Tunisie.

Communications orales :

Amina Maya Lahneche,Radja Djebbari, Ratiba Boucheham,Nassima Boubekri,Sabah Bensaci,Sabrina Bicha, Ali Bentamenne, Fadila Benayache, Samir Benayache,, Djamila Zama. **A study of the modulating action of n-butanol extract of *Centaurea***

***sphaerocephala* L on oxidative stress and histological alterations induced by vpa in rats kidney.** VI^éme congrès international de Biotechnologie et valorization des Bio-ressources, organisé par L'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka-Tunisie.

Djebbari Radja, Lassed Somia, Zama Djamila, Bouchair Mohamed, **Lahneche Amina Maya**, Boumoud Meriem, Amel Amrani, F. Benayache, Benayache Samir. « In Vitro and in vivo antioxydant activities and antihypercholesterolemic effects of green tea in normal and cardiovascular diseases patients », 5 th Chemistry Conference, Abha , Saudi Arabia; 04/2014.

Djebbari Radja, **Amina Maya Lahneche**, , Yasmine Chemam, Nassima Boubekri, Amel Amrani, Fadila Benayache, Samir Benayache, Djamila Zama. **Ameliorative potential of n-butanol extract of Helianthemum ruficomum against doxorubicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in male albino rats.** VI congrès international de Biotechnologie et valorisation des Bio-ressources du 20-23 Mars 2018 à Tabarka-Tunisie

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Première partie : Synthèse bibliographique

I- L'acide valproïque.....4

1. Propriétés chimiques et pharmaceutiques du VPA.....4

2. Absorption, et métabolisme du VPA.....4

3. Les effets secondaires de l'acide valproïque.....6

3.1. Sur le foie.....6

3.2. Sur le rein6

3.3 Sur le système nerveux centrale.....6

3.4 Au niveau du sang.....7

3.5 Au niveau de la peau.....7

3.6 Au niveau du système Gastro-intestinal.....7

3.7 Au niveau du pancréas.....7

3.8. Au niveau des testicules.....8

3.9. Tératogène.....8

II. L'acide valproïque et stress oxydant.....9

II.1. L'Hépatotoxicité du VPA9

II.2. Néphrotoxicité du VPA.....11

II.3. Neurotoxicité du VPA12

II.4. Toxicité du VPA au niveau des testicules.....12

II.5. Le stress oxydant.....12

II.5.1. Les radicaux libres13

5.1.1. Formation des espèces réactives oxydantes (ERO).....14

5.1.2. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....16

5.1.3. Rôle physiologique des ERO18

5.1.4. Conséquences du Stress Oxydatif.....18

5.1.4.1. Les dommages oxydatifs à l'ADN19

5.1.4.2. Les lipides.....	20
5.1.4.3. Les protéines	21
5.1.5. Pathologies liées au stress oxydant	22
II.5.2. Le Système de défense Anti Oxydant	23
5.2.1. Les antioxydants enzymatiques	24
5.2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	26
III. Polyphénols.....	30
1.Définition.....	32
2.Les flavonoïdes	33
3.Biosynthèse des composés phénoliques.....	36
3.1. La voie de l'acides shikimique.....	36
3.2. La voie de l'acide malonique / l'acétate	36
4.Biodisponibilité des polyphénols.....	36
4.1. Le métabolisme des flavonoïdes.....	37
4.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes	37
4.2.1. Activité antioxydante	38
4.2.2. Activité antimicrobienne	38
4.2.3. Activité anticancéreuse	38
4.2.4. Activité neuroprotectrice.....	39
4.2.5. Activité hépatoprotectrice.....	39
4.2.6. Activité néphroprotectrice.....	40
5.Aperçu bibliographique sur la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i>	40
5.1. Introduction.....	40
5.2. Description botanique de la plante.....	41
5.3. L'espèce <i>Centaurea sphaerocephala</i>	42
5.3.1. Classification botanique de la plante.....	42
5.3.2 Principaux métabolites secondaires isolés de la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i>	43
5.3.3 Utilisation en médecine traditionnelle.....	43
5.3.4 Intérêts biologiques du genre <i>Centaurea</i> et de ses principaux métabolites secondaires.	43

Deuxième partie : Etude expérimentale *in vitro* et *in vivo*

I. Matériels et Méthodes	46
1. Matériel végétal	46
2. Préparation des extraits.....	46
3. Etude phyto-chimique.....	48
3.1. Détermination des polyphénols dans les deux extraits	48
3.2. Détermination de la teneur totale des deux extraits en flavonoïdes.....	48
3.3. Evaluation du pouvoir antiradicalaire (DPPH).....	48
3.4. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO).....	49
3.5. Etude de l'effet des extraits des plantes sur des lignes cellulaires cancéreuses <i>in vitro</i> ...	49
3.6. Inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN.....	51
4. Expérimentations animales Etude <i>in vivo</i>	51
4.1. Effet préventif de <i>C. sphaerocephala</i> sur la toxicité induite par l'acide valproïque (300mg/kg).....	51
4.2. Prélèvement du sang et des organes.....	52
4.3. Préparation d'homogénat et de cytosol.....	52
4.4. Evaluation biochimique et mesure des paramètres de stress.....	52
4.4.1. Dosage d'AST et d'ALT.....	52
4.4.2. Dosage de cholestérol.....	53
4.4.3. Les triglycérides.....	53
4.4.4. Dosage de la créatinine.....	53
4.4.5. Dosage de la glycémie.....	53
4.4.6. Dosage du MDA au niveau d'homogénat.....	54
4.4.7. Dosage de glutathion (GSH).....	54
4.4.8. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx).....	55
4.4.9. Evaluation de l'activité enzymatique du catalase (CAT).....	55
4.4.10. Dosage de protéine total.....	56
4.5. Etude histologique.....	56
4.6. Etude statistique.....	57
II. Résultats et discussion	58
II.1. Résultats et discussion de l'étude expérimentale <i>in vitro</i>	58

1.Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.....	58
2. Evaluation du pouvoir anti radicalaire.....	59
3. Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	61
4.Inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN	63
5.L'effet des extraits des plantes sur des lignées cellulaires cancéreuses in vitro.....	64
II.2. Résultats et discussion de l'étude expérimentale <i>in vivo</i>.....	66
2. Résultats.....	66
2.1. Effet préventif de l'extrait butanolique de la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i> sur les marqueurs biochimiques.....	66
2.1 .1. L'effet sur l'activité enzymatique des transaminases (AST et ALT).....	66
2.1.2. L'effet sur le taux du glucose.....	67
2.1.3. L 'effet sur la concentration de la créatinine.....	68
2.1.4. L'effet sur le taux du cholestérol et des triglycérides.....	69
2.2. L'effet préventif de l'extrait butanolique de la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i> sur les marqueurs du stress.....	70
2.2.1. L'effet sur le taux d'MDA au niveau du foie et des reins.....	70
2.2.2. L'effet sur le taux d'MDA au niveau du cerveau et des testicules.....	71
2.2.3. L'effet sur le taux du GSH au niveau du foie et des reins.....	72
2.2.4. L'effet sur le taux du GSH au niveau du cerveau et des testicules.....	73
2.2.5. L'effet sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du foie et des reins.....	74
2.2.6. L'effet sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du cerveau et des testicules.....	75
2.2.7. L'effet sur l'activité enzymatique de la catalase au niveau du foie et des reins.....	76
2.3. Etude histologique.....	77
2.3.1 Au niveau du foie.....	77
2.3.2. Au niveau des reins.....	80
2.3.3. Au niveau des testicules.....	83
3. Discussion de l'étude expérimentale in vivo.....	87
Conclusion	96
Références bibliographiques.....	98

Résumés

Annexes

Publications

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AED	Antiepileptic Drug
ALT	Alanine Transaminase (GPT/ Glutamate Pyruvate Transaminase)
AST	Aspartate Transaminase (GOT/ Glutamate Oxaloacetate Transaminase)
CAT	Catalase
CYP	Cytochrome P
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
VPA	Valproic acid
DPPH	Di Phényle PicrylHydrazyle
EGC	Epigallocatechin
ERN	Espèce Réactive de l'azote
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfide
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO·	Radical hydroxyl
HOCL	Hypochlorite
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDH	High Density Lipoprotein
LDL	Low DensiteLipoproteine
LPO	Lipoxygénase
MAP	Mitogen-Activated Protein
MDA	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NO	Monoxyded'azote
NO ₂	Dioxyded'azote
NOS	Oxyde Nitrique Synthase

O ₂ ^{·-}	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PBS	Phosphate Buffer Solution
RL	Radicaux Libre
RO [·]	Radicalaloxyle
ROO [·]	Radicalerperoxyle
ROOH	Hydroperoxyde
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Super Oxyde Dismutase
TBA	ThioBarbituriqueAcide
TBARs	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Trichloroacetic
UV	Ultra-violet
VIT	Vitamine
8-OH2DG	8-hydroxy-2' deoxyguanosine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de l'acide valproïque.....	4
Figure 2 : Principales voie de biotransformation de VPA (B).....	5
Figure 3 : Mécanisme de l'hépatotoxicité du VPA	11
Figure 4 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.....	13
Figure 5 : Cascade de production des principales ERO.....	16
Figure 6 : Production des ROS mitochondriales.....	16
Figure 7 : Les ROS favorisent l'élimination des agents pathogènes par des mécanismes oxydatifs.....	18
Figure 8 : Les conséquences du stress oxydant.....	19
Figure 9 : Les lésions de l'ADN.....	20
Figure 10 : Les différentes étapes de la peroxidation lipidique.....	21
Figure 11 : Représentation schématique d'une cellule humaine qui peut être endommagée par les radicaux libres générés par des sources internes et externes.....	22
Figure 12 : Stress oxydatif et développement des maladies.....	23
Figure 13 : Les différents types d'antioxydants.....	24
Figure 14 : Mécanisme commun de balayage de $O_2^{\cdot-}$ par les SOD.....	25
Figure 15 : Les réactions impliquant le glutathion.....	27
Figure 16 : La structure chimique de la Vitamine E.....	27
Figure 17 : La structure chimique de la Vitamine C.....	28
Figure 18 : Les différents composés rétinoïdes.....	29
Figure 19 : Effets biologiques des polyphenols.....	31
Figure 20 : Structure chimique représentative des principaux groupes de polyphenols.....	32
Figure 21 : Structure des dérivés communs de flavones.....	33
Figure 22 : Résumés des actions biologiques des flavonols.....	34
Figure 23 : Structure chimique générale des acides phenoliques.....	35
Figure 24 : Métabolisme des flavonoids	37
Figure 25 : Les différents rôles des flavonoids.....	38
Figure 26 : Quelques espèces de genre <i>Centaurea</i>	41
Figure 27 : <i>Centaurea sphaerocephala</i>	42

Figure 28 : Protocole d'extraction de la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i>	47
Figure 29 : Principe du dosage de Malondialdehyde.....	54
Figure 30 : Principe du dosage de glutathion.....	55
Figure 31 : La teneur en phénols totaux des extraits (butanoliques et éthyle acétate) de la plante <i>C. sphaerocephala</i>	58
Figure 32 : La teneur en flavonoïdes des extraits (butanoliques et éthyle acétate) de la plante <i>C. sphaerocephala</i>	59
Figure 33 : Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> à différentes concentrations	60
Figure 34 : Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait éthyle acétate de la plante <i>C. sphaerocephala</i> à différentes concentration	60
Figure 35 : l'activité anti radicalaire de radical DPPH° de l'extrait butanolique et éthyle acétate de la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i> et de la vitamine C.....	61
Figure 36 : Inhibition de la peroxidation lipidique (formation du MDA) par l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> à différentes concentrations	62
Figure 37 : L'activité inhibitrice de la peroxidation lipidique (formation du MDA) de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> et de la vitamine C.....	62
Figure 38 : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>C. sphaerocephala</i> sur la sécurité de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par H ₂ O ₂ photolysé aux UV.....	63
Figure 39 : Activité de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>C.sphaerocephala</i> sur la ligne cellulaire HeLa (2,5X10 ⁴ cell/well	65
Figure 40 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. Sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et de la vitamine E la libération des transaminases AST et ALT.....	66
Figure 41 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plate <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg /kg) et de la vitamine E sur la concentration du glucose dans le plasma.....	67
Figure 42 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et de la vitamine E sur la concentration de la creatinine.....	68
Figure 43 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et de la vitamine E sur la concentration plasmatique du taux de cholestérol et triglycérides.....	69
Figure 44 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et de la vitamine E sur le taux d'MDA au niveau du foie et des reins.....	70
Figure 45 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/Kg) et de la vitamine E sur le taux d'MDA au niveau du cerveau et des testicules.....	71

Figure 46 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et la vitamine E sur le taux du GSH dans le foie et les reins.....	72
Figure 47 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et la vitamine E sur le taux du GSH dans le cerveau et les testicules.....	73
Figure 48 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du foie et des reins.....	74
Figure 49 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du cerveau et des testicules.....	75
Figure 50 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante <i>C. sphaerocephala</i> (50,100mg/kg) et la vitamine E sur l'activité enzymatique du catalase au niveau du foie et des reins.....	76
Figure 51 : Observation microscopique des coupes histologiques du foie des rats (Gx100, x400).....	78
Figure 52 :Observation microscopique des coupes histologiques des reins des rats (Gx400).....	81
Figure 53 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats (Gx100, x400).....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : ROS produisant des enzymes dans les peroxysomes.....	17
Tableau 2 : ROS générés à partir de sources exogènes	17
Tableau 3 : Classification systématique de la plante <i>Centaurea sphaerocephala</i>	42

Introduction

Les effets indésirables des médicaments constituent un problème majeur de santé publique et une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Dans le cas des médicaments antiépileptiques (AED), les réactions indésirables aux médicaments constituent un obstacle à la réussite du traitement puisqu'elles diminuent l'adhésion au traitement et impact sur la qualité de vie des patients (Salam et Omar, 2015).

L'acide valproïque (VPA) est l'un des médicaments antiépileptiques les plus prescrits au monde, il est utilisé pour traiter l'épilepsie, la migraine et les troubles bipolaires. Malgré son importance pharmacologique, diverses conséquences telles que l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, l'infertilité, tératogénicité et la neurotoxicité sont associées à son utilisation (Morsy *et al.*, 2017 ; Chang *et al.*, 2016).

Le mécanisme exact de la toxicité induite par l'acide valproïque reste une source de débat, malgré un certain nombre de recherche ont étudié la possibilité de son association au stress oxydatif chez les patients et dans des modèles animaux. Cela est dû à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la capacité antioxydante compromise dans les différents tissus durant sa métabolisation (Abdella *et al.*, 2014).

Depuis longtemps, et malgré les progrès scientifiques, la médecine traditionnelle demeure le recours principal des populations afin de traiter leurs problèmes de santé. Selon l'organisation mondiale de la santé, environ 80% des individus dépendent de la médecine traditionnelle dans les soins primaires dans la vie quotidienne (Ladoh *et al.*, 2014). Toutefois, les plantes médicinales ont des propriétés antioxydantes potentielles qui peuvent contribuer à prévenir la formation de radicaux libres et les différentes pathologies. Les composés phénoliques et polyphénoliques ainsi que les flavonoïdes sont les composés actifs les plus importants avec ces propriétés (Sedighi *et al.*, 2017). C'est pour cela, la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir des différentes maladies.

Plusieurs études ont analysé l'effet protecteur de différentes plantes médicinales vis-à-vis d'une toxicité induite par le VPA. Dans ce contexte, de nombreuses plantes médicinales ont été testées comme antioxydantes afin de maîtriser le potentiel de l'effet nocif des radicaux libres et de réduire les dommages causés par le VPA sur les différents tissus. A titre d'exemple, l'extrait de la plante *Foeniculum vulgare* qui par sa richesse en composé polyphénoliques a pu réduire les effets nocifs de ce médicament au niveau du foie et les reins des rats *Albinos Wistar* (Al-Amoudi, 2016). Aussi

bien, l'extrait de safran (*Crocus sativus*L) a également amélioré les lésions cytogénétiques et testiculaires induites par le VPA chez les rats albinos grâce à la présence d'un ou plusieurs composants antioxydants (Sakr *et al.*, 2014). L'extrait éthanolique des deux plantes *Apium Graveolens* et *Rosmarinus Officinalis* agit par l'intermédiaire de la capacité antioxydante des composés phénoliques actifs pour restaurer la fonction et l'intégrité du foie et pour créer une synergie avec les effets antiépileptiques (Hamza *et al.*, 2016).

C'est dans cette optique s'inscrit l'objectif du présent travail qui consiste à évaluer l'effet protecteur des extraits de la plante *Centaurea sphaerocephala* vis-à-vis la toxicité induite par l'acide valproïque. Dans ce cadre, deux études ont été réalisées parallèlement :

Une étude *in vitro* : cette étude a pour but d'évaluer en premier lieu l'activité antioxydante *in vitro* des différents extraits de *C. sphaerocephala* en réalisant différents tests (test de DPPH, peroxydation lipidique, anti-cancéreux) et évaluant le taux des phénols et flavonoïdes.

La deuxième partie de cette thèse c'est l'étude expérimentale *in vivo* vise à évaluer l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. sphaerocephala*. C'est l'étude d'un éventuel effet protecteur des antioxydants présents dans cet extrait contre la toxicité provoquée par le VPA sur les différents organes des rats : foie, reins, cerveau, testicules.

Première Partie :

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'acide valproïque

1. Propriétés chimiques et pharmaceutiques de l'acide valproïque(VPA)

L'AVP est un acide gras ramifié à huit atomes de carbone (acide-2-propylpentanoïque, acide 2-propylvalérique) (Figure1), dérive de l'acide valérique isolé des rhizomes de la valériane (*Valeriana officinalis*), très proche de la configuration moléculaire des acides gras à chaîne moyenne (Bédry et Parrot, 2004). C'est un antiépileptique majeur utilisé dans le traitement de formes variées d'épilepsie généralisées, focalisées simples ou complexes. Il est aussi prescrit pour traiter les personnes souffrant de troubles bipolaires et à ce titre est inscrit sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS (perruca, 2002 ; Bolanos et Medina, 2007 ; Chateauvieux *et al.*, 2010). Durant de nombreuses années, le VPA n'était utilisé que pour ses fonctions de solvant organique, et ce n'est qu'en 1962 que ses propriétés thérapeutiques furent observées par une équipe française. Il fût alors employé dans le but de solubiliser des produits afin de tester leur potentielle d'activité anticonvulsante (Meunier *et al.*, 1963 ; Thomes et Alixis, 2000). À partir de 1967, le VPA fut commercialisé en France, en Grande-Bretagne en 1973 et approuvé par la US Food and Drug Administration en 1978 (Lagace *et al.*, 2004).

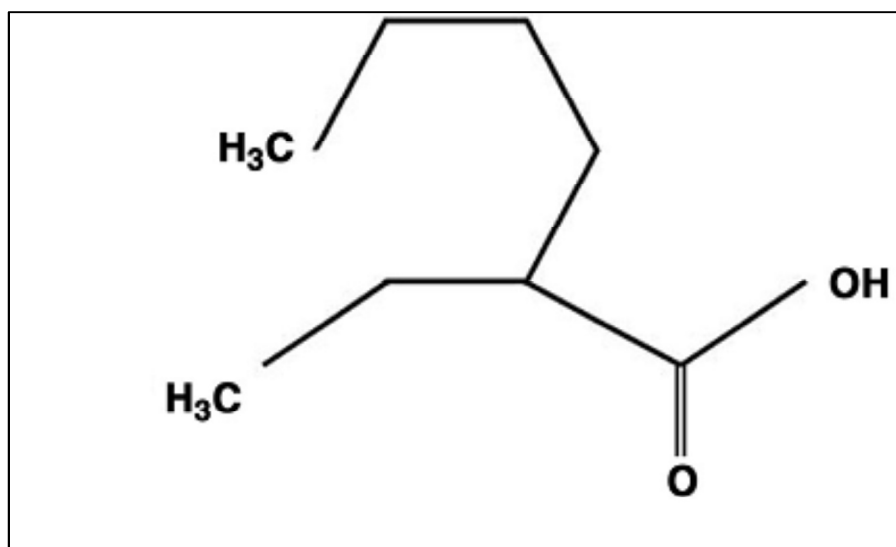


Figure 1 : Structure chimique de l'acide valproïque (Lheureux *et al.*, 2005).

2. Absorption et métabolisme du VPA

Après l'administration orale, l'absorption digestive est rapide et quasi-complète, et le pic plasmatique est atteint en une à deux heures, et entre trois et huit heures pour les formes à libération prolongée. L'alimentation entraîne une absorption retardée mais ne diminue pas l'importance de celle-ci (Bédry et Parrot, 2004). Son volume de distribution est de 8 à 9 L et il est limité au sang, au liquide céphalo-rachidien (LCR) et au cerveau (Jezequel *et al.*, 2010). Sa liaison aux protéines plasmatiques est de 80 à 90 % chez l'homme et elle est liée à la concentration de ce médicament. La fraction libre augmente

proportionnellement à cette concentration, et est responsable des effets toxiques. Cette liaison diminue avec l'augmentation des concentrations du médicament et elle devient aussi plus faible chez les patients âgés et les femmes enceintes, et en présence de quantités croissantes d'acide gras (AG) libre dans le sérum (Hatton *et al.*, 2016). La biodisponibilité sanguine du VPA est de plus 80 % et sa demi-vie est de 8 à 14 h (Lheureux et Hantson, 2009).

Le VPA est métabolisé de façon importante au niveau hépatique en grande majorité par Glucuronidation et β -oxydation, même si d'autres voies métaboliques peuvent intervenir (Figure 2). Les produits de dégradation de l'acide valproïque et qui sont catalysés par le CYP450 : le 4-ène-VPA et le E-2,4-diène-VPA se sont révélés être hépatotoxiques. Moins de 3% de la dose ingérée est excrétée sous forme inchangée dans les urines. On peut trouver aussi des traces d'acide valproïque excrété dans la bile, les fèces et l'air expiré (Potter et Ketter, 1993 ; Mc Evoy, 1997 ; Silva *et al.*, 2008).

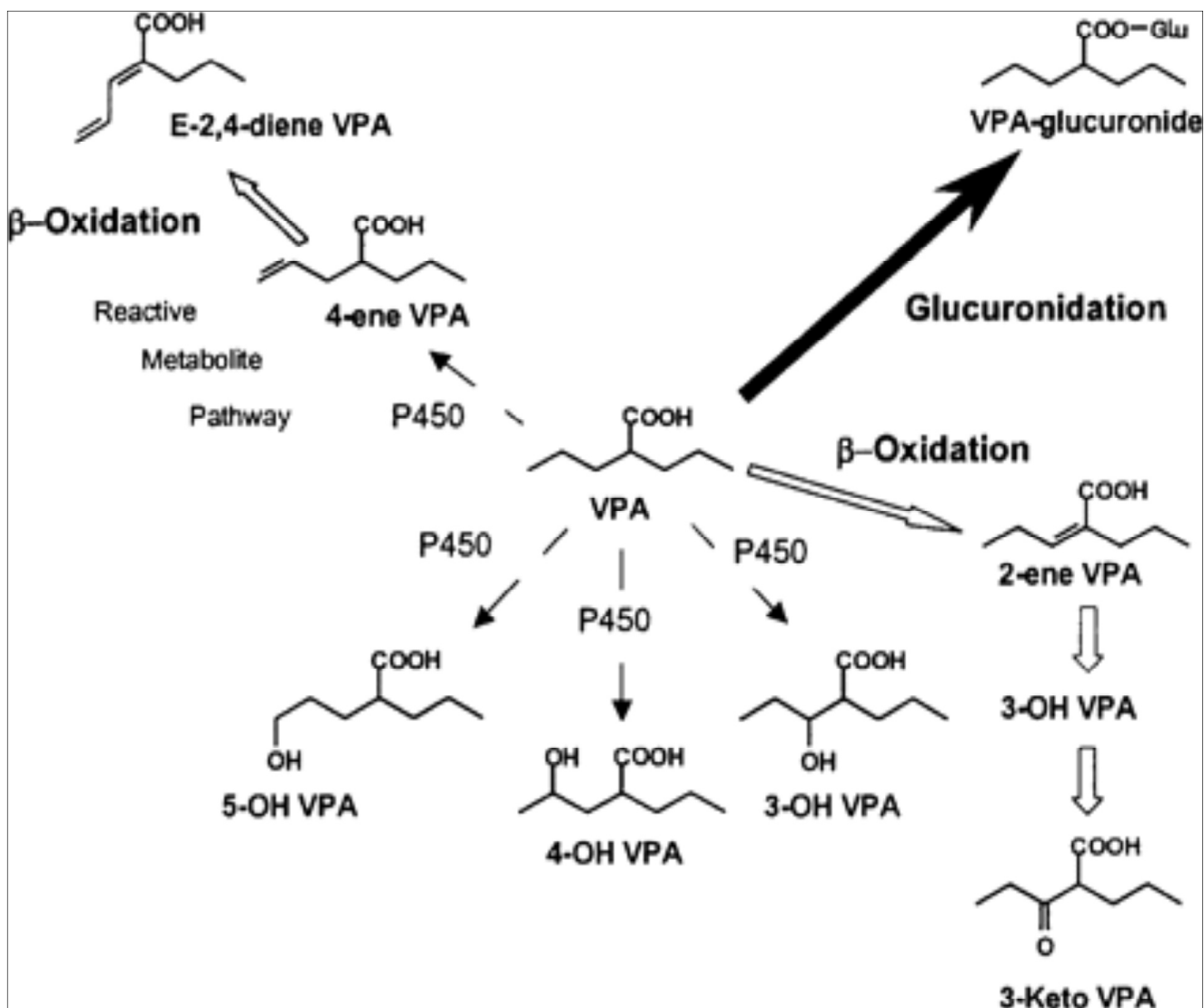


Figure 2 : Principales voies de biotransformation de VPA (Chang et Abbott, 2006).

3. Les effets secondaires de l'acide valproïque

Comme chaque médicament l'acide valproïque présente de nombreux effets secondaires qui ont été décrits dans la littérature et retrouvés avec de nombreux médicaments épileptiques (Hardy *et al.*, 2001).

3.1. Sur le foie

L'un des effets indésirables les plus importants attribués au traitement par le VPA est l'insuffisance hépatique. L'un des indicateurs les plus sensibles et les plus spectaculaires des lésions hépatocytaires est la libération d'enzymes intracellulaires, telles que les aminotransférases l'AST, l'ALT et l'ALP (Cakmak et Yanardag, 2015). La biopsie hépatique révélait une inflammation portale, une perte sévère des canaux biliaires et une cholestase ainsi qu'une stéatose et une nécrose hépatique (Saleh *et al.*, 2012).

3.2. Sur le rein

- Les individus prenant un traitement d'acide valproïque peuvent développer un syndrome de Fanconi dont le glucose, les acides aminés, l'acide urique et les électrolytes sont perdus dans l'urine au lieu d'être réabsorbés. Ce qui peut avoir un impact dévastateur sur le développement et la santé de l'enfant (Watanabe *et al.*, 2005 ; Knights *et al.*, 2016).
- Le VPA peut même conduire à une absorption rénale de glutamine, entraînant par la suite une augmentation de la production de glutamate et d'ammoniac (Mallet *et al.*, 2004 ; Mock et Schwetschenau, 2012).

3.3. Sur le système nerveux central

- Le traitement par le VPA pourrait causer une anomalie neuronale et contribuer à la neurogenèse aberrante associée à l'activité épileptique chez les rongeurs adultes (Jessberger *et al.*, 2007).
- Une encéphalopathie hyperammonémique conduisant à : une neurotoxicité, des lésions cérébrales irréversibles, un œdème cérébral et à un niveau de conscience altéré (Priester *et al.*, 2009 ; Larsen et Ostergaard, 2014 ; Zeiler *et al.*, 2016).
- Trouble de la vigilance allant de la somnolence prononcée au coma (Schmitt *et al.*, 2009 ; Spiller *et al.*, 2000).
- Le VPA parmi plusieurs médicaments antiépileptiques a montré une grande capacité à induire des symptômes parkinsoniens qui ont été récemment décrit dans la littérature (Chateauvieux *et al.*, 2010).

3.4. Au niveau du sang

- Des coagulopathies ont été observées chez plus de 4% des enfants traités avec le VPA. Les symptômes retrouvés dans cette pathologie sont les thrombocytopénies, les dysfonctions plaquettaires, la maladie de Von Willebrand, des déficits en facteur XIII, des hypofibrinogénémies ainsi que des carences en Vitamine K (Kose *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2013).
- Une anémie aplasique et une baisse d'hémoglobine. Des rapports antérieurs décrivant la toxicité hématologique des médicaments anticonvulsifs ont montré une aplasie érythrocytaire pure associée à un traitement par le VPA. Il affecte la fluidité de la membrane plasmique et modifie les protéines réceptrices exprimées à la fois sur les surfaces internes et externes de la membrane cellulaire érythrocytaire. (Farkas *et al.*, 2000 ; König *et al.*, 2003 ; Handoko *et al.*, 2006 ; Chateauvieux *et al.*, 2011).
- Des niveaux accrus d'anticorps plaquettaires IgG ont été enregistré chez la moitié des patients recevant du VPA, reflétant une destruction accrue des plaquettes (Hebert *et al.*, 2017).
- (Coyle *et al.*, 2005) a rapporté que dans trois cas, l'acide valproïque était associé à une leucémie.

3.5. Au niveau de la peau

- Eruption cutanée.
- Des changements de la pousse et la couleur des cheveux (Baba *et al.*, 2003 ; Korkmazer *et al.*, 2006), ce qui est due au traitement par le VPA qui diminue le taux du Zinc et l'activité de l'enzyme biotinidase (Yilmaza *et al.*, 2009).
- Le syndrome d'hypersensibilité (DRESS) peut être induit chez les patients traités par le VPA, souffrant de crises épileptiques qui est un type de réactions indésirables cutanées sévères, caractérisées par des éruptions maculopapulaires aiguës générales, accompagnées d'une forte fièvre et d'une atteinte des organes internes, est un événement indésirable rare, mais potentiellement fatal, avec une mortalité allant de 10% à 40% (Wu *et al.*, 2017).

3.6. Au niveau du système Gastro-intestinal

- Perte de poids ou profit accrue, anorexie (Levy *et al.*, 2002 ; Wirrell, 2003 ; Grosso *et al.*, 2009 ; Zaccara et Tramacere, 2011 ; Brandt *et al.*, 2006 ; Belcanto *et al.*, 2013).

3.7. Au niveau du pancréas

- Des cas de pancréatite et une augmentation de la concentration d'insuline pouvant mettre la vie en danger ont été rapportés suite au traitement par l'acide valproïque (Neuman *et al.*, 2001 ; Sztajnkrzyca *et al.*, 2002 ; Rauchenzauner *et al.*, 2008 ;).
- Le mécanisme par lequel l'acide valproïque induit la pancréatite est inconnu. Cependant, il a été proposé que l'appauvrissement des capteurs de radicaux libres (SOD, CAT, GPx) pourrait conduire à la génération de radicaux libres en excès, qui à leur tour conduisent à la perméabilité endothéliale et à la peroxydation des lipides, entraînant des lésions tissulaires (Ray *et al.*, 2015).
- Il a également été suggéré que la réduction de la carnitine provoquée par l'utilisation de l'acide valproïque joue un rôle important dans les dommages causés au pancréas (Mahrous *et al.*, 2016).

3.8. Au niveau des testicules

- Le traitement par l'acide valproïque provoque une diminution significative du poids des testicules, la concentration des spermatozoïdes, des spermatozoïdes vivants et le pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles (Nishimura *et al.*, 2000 ; Roste *et al.*, 2003 ; Isojarvi *et al.*, 2004 ; Bairy *et al.*, 2010 ; Cansu *et al.*, 2011).
- Chez les hommes épileptiques traités par le VPA, le taux de testostérone et la qualité de sperme ont été significativement diminués ce qui provoque une infertilité (Iamsaard *et al.*, 2015).
- Il a été démontré que le traitement chronique par l'acide valproïque ralentit la maturation pubertaire en diminuant le taux de croissance testiculaire et de spermatogenèse (Roste *et al.*, 2001).

3.9. Tératogène

- Plusieurs études prospectives basées sur le registre ont récemment confirmé que le traitement par le VPA durant la grossesse augmente le risque de malformations congénitales somatiques chez la progéniture par rapport à la plupart des autres antiépileptiques et que le taux de malformations majeures varie de 6 à 11% avec de fortes contre-indications lorsqu'il est administré au cours du premier trimestre de la grossesse (Sabers *et al.*, 2014 ; Goyal *et al.*, 2016 ; Stadelmaier *et al.*, 2017).
- L'exposition des fœtus au VPA provoque des malformations congénitales majeures (MCM) et des anomalies neurodéveloppementales. Les MCM sont principalement des anomalies cardiaques, mais aussi des anomalies du tube neural qui se manifestent souvent sous forme de spina bifida, entraînant éventuellement un syndrome du valproate fœtal (dysmorphismes

faciaux spécifiques liés à l'acide valproïque), une fente labio-palatine, des anomalies des voies urinaires ou une malformation des membres (Lloyd, 2013).

- L'exposition prénatale à l'acide valproïque entraîne des altérations généralisées de la morphologie cérébrale, du comportement et de la capacité cognitive ainsi qu'un risque accru de trouble du spectre autistique (TSA) chez les enfants (Gao *et al.*, 2016).
- A cause de l'effet tératogène de l'acide valproïque un groupe de travail conjoint de la Commission européenne des affections de la Ligue internationale contre l'épilepsie et de l'Académie européenne de neurologie a publié des recommandations sur le moment et la manière dont l'acide valproïque devrait être utilisé pour traiter les femmes et les épileptiques (Tomson *et al.*, 2016).

II. L'acide valproïque et stress oxydant

L'acide valproïque est l'un des anticonvulsivants les plus couramment utilisés dans le traitement de certains types de crises, troubles anxieux, troubles de stress post-traumatique, migraine, trouble bipolaire et types d'Alzheimer, ainsi que d'autres troubles psychiatriques chez l'enfant et l'adulte (Ogungbenro et Aarons, 2014 ; Mony *et al.*, 2016). Malgré son efficacité médicale, la tératogénicité, la pancréatite et la toxicité hépatique grave ont été associées à son utilisation (Perruca, 2002 ; Lheureux et Hantson, 2009). Les effets secondaires du VPA ont été montrés dans de nombreuses études, mais les mécanismes cellulaires impliqués dans cet effet toxique n'ont pas encore été complètement élucidés (Ubeda *et al.*, 2002 ; El-Shenawy et Hamza, 2016).

Dans des études antérieures, il a été démontré que le VPA augmentait les concentrations intracellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans plusieurs tissus, y compris le foie, le cerveau, les reins et les testicules (Bairy *et al.*, 2010 ; Eskandari *et al.*, 2011 ; Hussein *et al.*, 2013 ; Knights *et al.*, 2014 ; Hamza *et al.*, 2015 ; Hamza et El-Shenawy, 2017). Cela est due à la biotransformation de l'acide valproïque ou suite à une déficience de la défense antioxydante (Verrotti *et al.*, 2008).

II.1. L'hépatotoxicité du VPA

Du point de vue morphologique, l'hépatotoxicité du VPA chez l'homme est associée à deux types d'hépatotoxicité :

- ✓ Une toxicité directe dose-dépendante qui se caractérise par une augmentation des enzymes hépatiques et diminution du fibrinogène. Ces perturbations peuvent être inversées par l'arrêt du médicament avec une récupération clinique complète.
- ✓ Une toxicité indirecte caractérisée par une stéatose microvésiculaire et une nécrose hépatique (Komulainen *et al.*, 2015).

Bien que le mécanisme de la toxicité hépatique n'est pas encore clairement défini, il a été suggéré que l'effet hépatotoxique du VPA est causé par un dysfonctionnement mitochondrial, avec une altération de la β -oxydation mitochondriale jouant un rôle central dans l'accumulation intracellulaire de triglycérides et le développement de l'acidose lactique (Pessayre *et al.*, 1999 ; Lee, 2003 ; Begriche *et al.*, 2011 ;). L'origine de ce dysfonctionnement peut être non seulement due à l'accumulation des acides gras dans l'hépatocyte ce qui provoquera une perturbation lipidique caractérisée par une diminution d'éthanolamine et phosphatidyl-choline ainsi qu'une augmentation de lysophosphatidyl-choline. Egalement la surproduction des espèces réactives de l'oxygène participe à ce dysfonctionnement ce qui favorise la peroxydation des lipides qui peut causer la mort cellulaire d'où la nécrose tissulaire et peuvent aussi participer secondairement à l'activation des cellules de Kupffer (macrophages résidants dans le foie) et les cellules étoilées qui participent respectivement à l'inflammation et à la fibrogenèse (Berson *et al.*, 1998 ; Natarajan *et al.*, 2006 ; Silva *et al.*, 2008 ; Mitchell *et al.*, 2009).

Aussi bien, le stress oxydatif, en raison de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la capacité antioxydante compromise, a été supposé de jouer un rôle dans l'étiologie de la toxicité (Abdella *et al.*, 2014). Les principales voies responsables du métabolisme du VPA sont : l'oxydation du cytochrome P450, la conjugaison et la β -oxydation de l'acide glucuronique et l'oméga (ω) oxydation. Ces voies métaboliques sont associées à une hépatotoxicité due à une synthèse accrue de dérivés d'acide valproïque insaturés dont les plus importants d'entre eux sont : 4-ene -VPA (Tong *et al.*, 2003) et E-2,4-diene VPA (Kiang *et al.*, 2011 ; Surendradoss *et al.*, 2012) et à une déplétion des mécanismes de β -oxydation (Perucca, 2002, Kiang *et al.*, 2010). Ces métabolites toxiques se conjuguent avec le glutathion réduit (GSH) en tant que mécanisme de détoxification protecteur conduisant à la consommation de GSH qui est bien connu pour son activité antioxydante en liant les ROS. Suite à cette déplétion en GSH, les taux intracellulaires de peroxydes s'élèvent, provoquant un stress oxydant via une réaction de Fenton (Zhang *et al.*, 2010 ; Ibrahim *et al.*, 2017).

Hamza *et al.* (2015) ont détecté une diminution de la production d'ATP chez les rats intoxiqués par le VPA. L'incapacité des mitochondries à synthétiser l'ATP entraîne une acidose et une lésion osmotique qui aboutit à la lyse de la membrane plasmique des hépatocytes. De plus, Des tests *in vitro* réalisés sur des hépatocytes des rats ont montré que les ROS et la peroxydation lipidique (LPO) produits par le VPA induisent une lésion membranaire lysosomiale hépatocytaires conduisant à la protéolyse et à la stimulation du processus autophagique aboutissant à la dégénérescence et à la nécrose des hépatocytes suggérant qu'au moins trois sources intracellulaires différentes : cytochrome P450, perturbation de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale et réaction lysosomale de

Haber-Weiss sont impliquées dans la formation des ROS produites par le VPA et ses événements cytotoxiques ultérieurs (Figure 3). Par conséquent, les agents protecteurs qui inhibent ou réduisent le stress oxydatif "antioxydants et piègeurs de radicaux" protègent les hépatocytes contre la toxicité induite par le VPA (Pourahmed *et al.*, 2012).

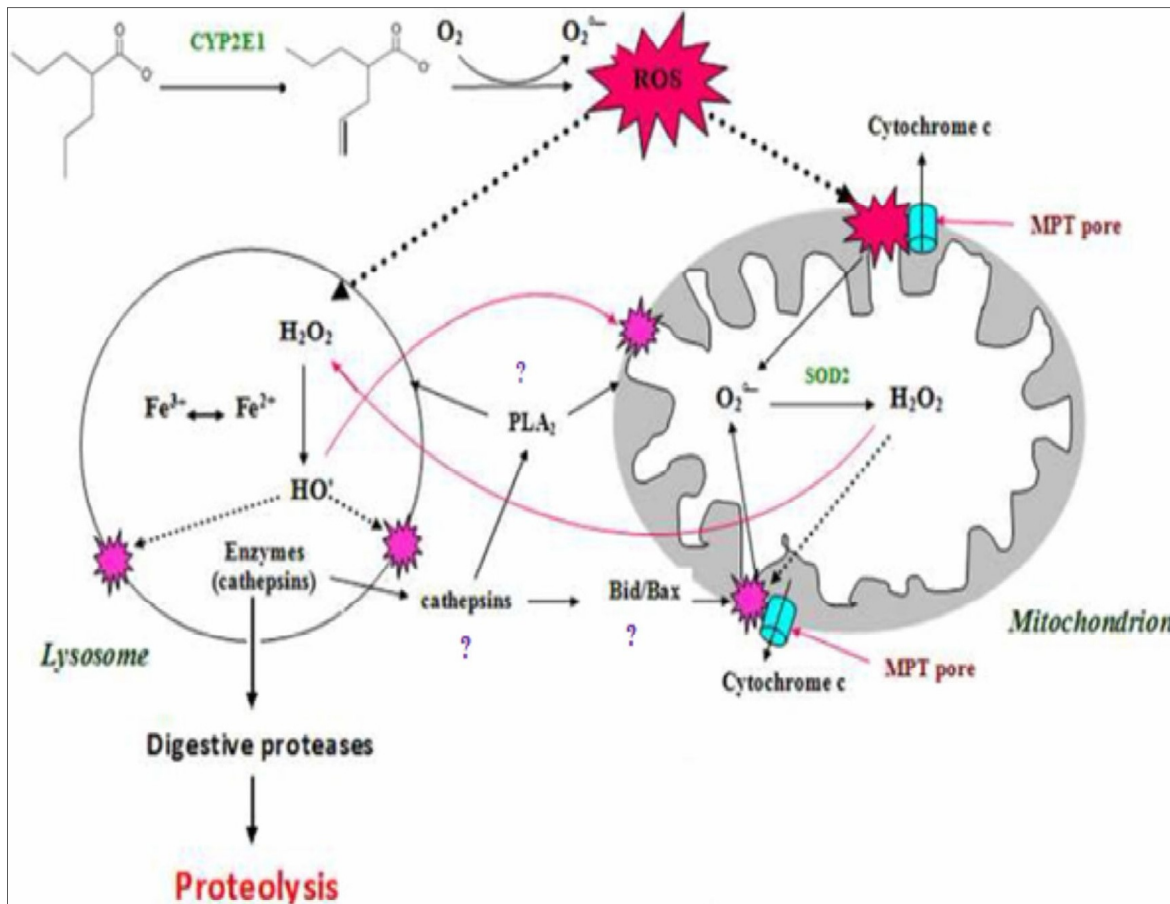


Figure 3 : Mécanisme de l'hépatotoxicité du VPA proposé par (Pourahmed *et al.*, 2012).

II.2. Néphrotoxicité du VPA

Dans les cellules rénales, le stress oxydatif provoqué par les radicaux libres contribue à la pathogenèse de la néphrotoxicité induite par le VPA. La pathogenèse de ces formes de néphrotoxicité induite par le VPA n'est toujours pas claire (Chaudhary *et al.*, 2015). Il a été rapporté que l'activité cytotoxique du VPA est le résultat de la production de peroxyde d'hydrogène et de la production de radicaux hydroxyles hautement réactifs. Cela pourrait être derrière l'augmentation du niveau du LPO et la diminution de l'activité enzymatique des (SOD, CAT et GPx) et la capacité antioxydante totale chez les rats traités par le VPA. Il possède également un effet notable sur le tissu rénal des rats traités. Ces effets apparaissent comme une atrophie des glomérules, une dégénérescence des tubules rénaux et un œdème (Tabatabaei et Abbott, 1999). Les dommages rénaux, tels que la néphrite interstitielle et tubule rénale proximale peuvent aussi apparaître (Al-Amoudi, 2016). Aussi bien les patients traités par le VPA avaient une déficience des fonctions tubulaires rénales (Verrotti *et al.*, 2000). De même, les

enfants épileptiques qui étaient ambulatoires et dépendaient de la monothérapie par le VPA ont développé une dysfonction tubulaire rénale proximale cliniquement insignifiante (Altunbasak *et al.*, 2001). Récemment, les enfants sous traitement anti-épileptique avec l'acide valproïque ont montré des signes de dysfonction tubulaire rénale, reflétés par l'index d'activité N-acétyl bêta-glucosaminidase / créatinine (NAG / Cr) (Mazaheri *et al.*, 2011).

II.3. Neurotoxicité du VPA

Le cerveau est très sensible aux dommages oxydatifs car cet organe contient un grand nombre d'acides gras facilement oxydés et un système antioxydant limité. Afin de piéger les espèces réactives de l'oxygène, divers systèmes de défense restent dans le cerveau, tels que les antioxydants enzymatiques (CAT) et non enzymatiques (GSH). La génération de radicaux libres peut être, au moins partiellement. La base de troubles neurologiques et neurodégénératifs abondants tels que l'ischémie-réperfusion, la crise, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. La thérapie antioxydante a été bien enregistrés pour protéger contre les lésions du SNC (Morsy *et al.*, 2017). En effet, il a été constaté une réduction significative de l'activité des GST, GR, GPx, SOD et CAT ainsi qu'une augmentation significative de l'activité de la xanthine oxydase et des niveaux de peroxydation lipidique dans le cervelet et le cortex cérébral des rats traité par le VPA (Chaudhary et Parvez, 2012).

II.4. Toxicité du VPA au niveau des testicules

Malgré les effets bénéfiques du VPA dans le traitement de nombreuses maladies, sa toxicité sur le système reproducteur masculin est une réelle préoccupation pour les patients (Xiaotian *et al.*, 2013). Des études réalisées sur les animaux et l'être humain ont démontré que le VPA a de nombreux effets indésirables sur la fertilité masculine, y compris l'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes, (Girish *et al.*, 2014). Les effets délétères du VPA sont accompagnés d'un stress oxydatif accru (Hamza et Amin, 2007).

Les testicules et les spermatozoïdes sont riches en acides gras polyinsaturés, ce qui augmente leur susceptibilité à l'attaque par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par conséquent les dommages oxydatifs. Au niveau des testicules, le stress oxydatif peut perturber la capacité stéroïdogénique des cellules de Leydig et la capacité de l'épithélium germinale à se différencier en spermatozoïdes avec une fonction normale (Ourique *et al.*, 2016).

II.5. Le stress oxydant

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales a été envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant. Il se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants ce qui conduit à l'accumulation des radicaux libres qui provoquent des dégâts cellulaires irréversibles en agressant toutes les cellules et tous les tissus, en

provoquant des altérations de l'acide désoxyribonucléique (ADN), en induisant des phénomènes de peroxydation lipidique, et en stimulant l'expression des produits de l'inflammation (Kehili *et al.*, 2017 ; Farh *et al.*, 2017). L'organisme humain a développé des systèmes de défense pour traiter ce phénomène (stress oxydant) et lutter contre les espèces réactives qui sont préjudiciables à la vie humaine (Prior et Cao, 1999 ; Laguerre *et al.*, 2007).

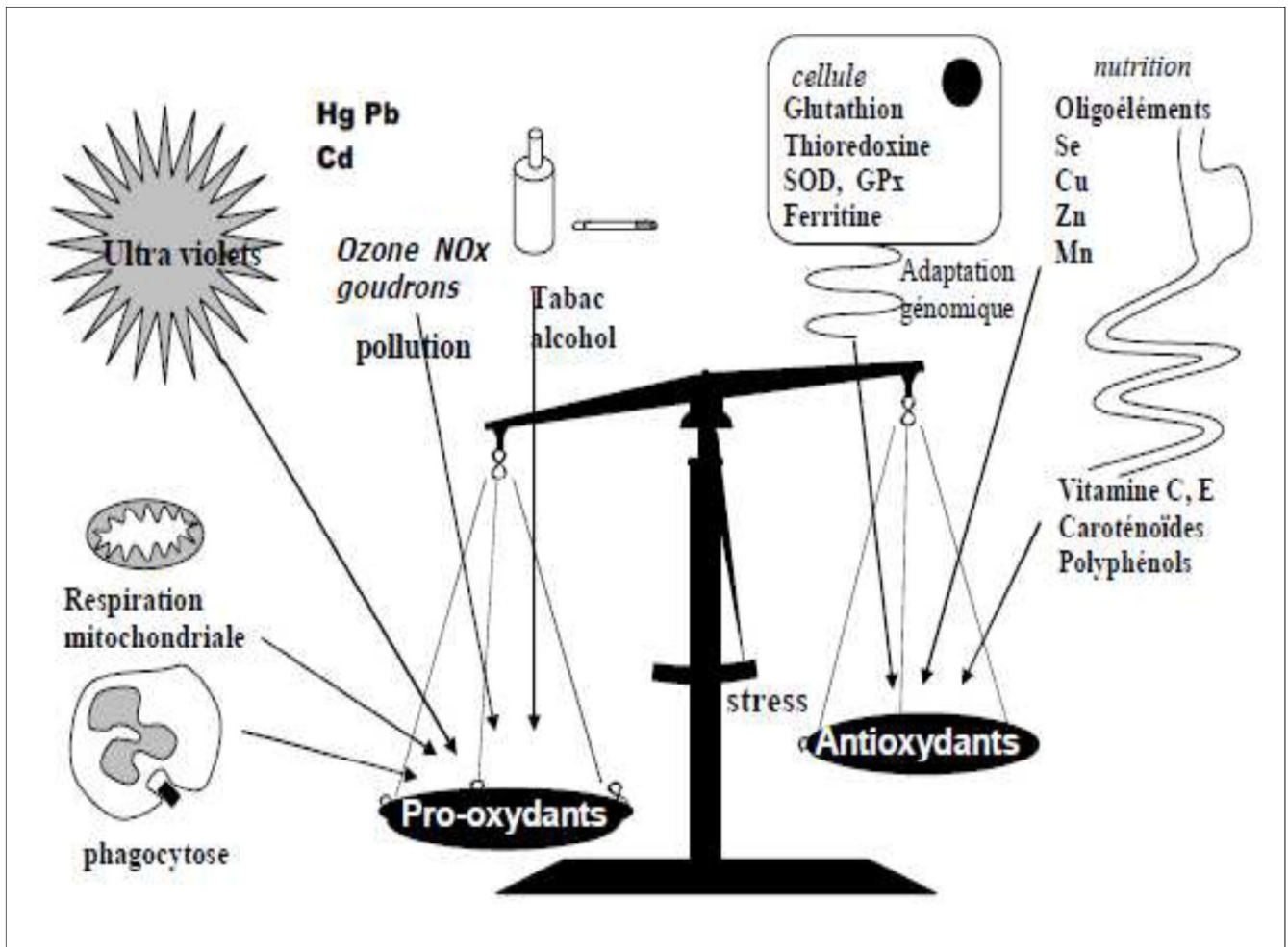


Figure 4 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

II.5.1. Les radicaux libres

Les ROS sont impliqués dans de nombreux événements cellulaires, notamment en tant que seconds messagers dans l'activation de plusieurs voies de signalisation, conduisant à l'activation de facteurs de transcription, la mitogènes, l'expression génique et l'induction de l'apoptose ou mort cellulaire programmée (Birben *et al.*, 2012). Ils comprennent les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, qui jouent un rôle clé dans l'initiation et la progression des cellules tumorales et améliorent leur potentiel métastatique. En effet, ils sont maintenant considérés comme un marqueur de cancer (Ríos-Arrabal *et al.*, 2013).

Ils sont généralement définis comme des espèces chimiques qui possèdent des électrons non appariés.

a) Les dérivés oxygénés radicalaires : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}).

b) Les dérivés oxygénés non radicalaire : l'oxygène singulet 1O_2 le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le nitroperoxyde ($ONOOH$), les hydroperoxydes organiques ($ROOH$) et l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) (Birben *et al.*, 2012 ; Savini *et al.*, 2013 ; Lefaki *et al.*, 2017). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

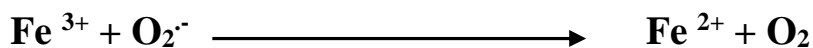
5.1.1. Formation des espèces réactives oxydantes (ERO)

Le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est le plus actif, intervient dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Liu *et al.*, 2017). Il provient de diverses sources cellulaires dont la source physiologique majeur est la chaîne respiratoire mitochondriale où 2% de l'oxygène consommé est transformé en $O_2^{\cdot-}$, une telle réaction est catalysée par une cytochrome oxydase mitochondriale. Il est formé après réduction d'une molécule d' O_2 par un électron lors de la phagocytose en présence de la NADPH-oxydase, présente dans la membrane plasmique des phagocytes. Une autre source peut également être une source biologique importante c'est la xanthine oxydase qui en présence d'oxygène catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique (Li et Fukagawa, 2010 ; Birben *et al.*, 2012).

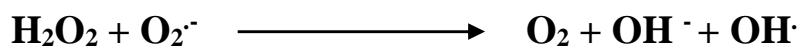
Autre espèce c'est le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) qui est le plus important des produits. C'est une espèce oxygénée très réactive qui provient de la coexistence de l'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier va réagir avec le fer et produit du fer oxyde et le radical hydroxyle, via la réaction de Fenton (Lipinski, 2011 ; Dutta *et al.*, 2017).



Ensuite le fer ferrique est réduit en fer ferreux par l'anion super oxyde principalement :



L'ensemble de ces réactions forme la réaction d'Haber Weiss



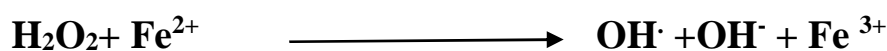
La troisième espèce c'est l'oxyde nitrique (NO) qui est un médiateur pro-inflammatoire impliqué dans divers événements physiologiques. Sa production est extrêmement importante pour défendre le corps. Cependant, sa surproduction peut entraîner des lésions tissulaires et l'activation de médiateurs pro-inflammatoires associés à une inflammation aiguë et chronique (Njoya *et al.*, 2017). Le NO^{\cdot} peut être converti en ion nitrosium (NO^+), en anion nitroxyde (NO^-) ou en peroxynitrite ($ONOO^-$). Ce dernier se dissocie pour produire un OH^{\cdot} et un radical dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}) (Santana *et al.*, 2017).

Le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) est dérivé de l'oxygène dans les systèmes vivants. La forme la plus simple du radical peroxyde est le radical perhydroxyle (HOO^{\cdot}) formé par la protonation du

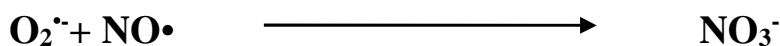
superoxyde. Il initie la peroxydation des acides gras et peut également favoriser le développement de la tumeur (Phaniendra *et al.*, 2015). Par contre, le radical alkoxy ($\text{RO}\cdot$) se produit lors de la dégradation des hydroperoxydes organiques, ils sont très réactifs (Birben *et al.*, 2012).

D'autre part, l'oxygène singulet est une espèce d'oxygène réactif (ROS). Il est hautement réactif et se met facilement en contact avec une variété de biomolécules, en particulier celles contenant des doubles liaisons (Mor *et al.*, 2014).

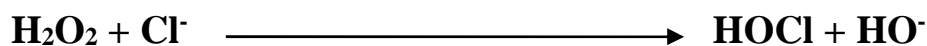
Aussi bien, le peroxyde d'hydrogène est un oxydant particulièrement intéressant en raison de sa stabilité ; sa durée de vie plus longue qui lui permet de participer soit en tant que molécule messagère secondaire, soit en tant qu'oxydant létal (Huang et Sikes, 2014). Il provient de la dismutation enzymatique ou spontanée des anions superoxyde, qui sont les sous-produits d'une variété large et omniprésente d'oxydases. Il peut aussi donner naissance à des radicaux $\text{OH}\cdot$ hautement toxiques grâce aux réactions de Fenton et de Haber-Weiss à l'aide d'ions métalliques redox-actifs libres (Cuypers *et al.*, 2016).



Cependant, la réaction entre les radicaux libres oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$) et superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) conduit à la formation contrôlée de la diffusion de peroxyde nitrite NO_3^- qui est un puissant agent oxydant et nitrant et favorise les dommages nitroxydatifs (Carballal *et al.*, 2015).



En plus, l'acide hypochlorique (HOCl) a été impliqué dans l'inflammation comme médiateur des lésions tissulaires oxydatives et des dysfonctionnements cellulaires entraînant l'initiation et l'accélération de nombreuses maladies ; telles que la fibrose kystique, les broncho-pneumopathies chroniques obstructives, la goutte, l'athérosclérose, polyarthrite rhumatoïde et le cancer (Chen *et al.*, 2016). C'est un oxydant puissant formé à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorure (Zhou *et al.*, 2015).



Un récapitulatif des principales ERO et de leurs formations est présenté dans la figure 5.

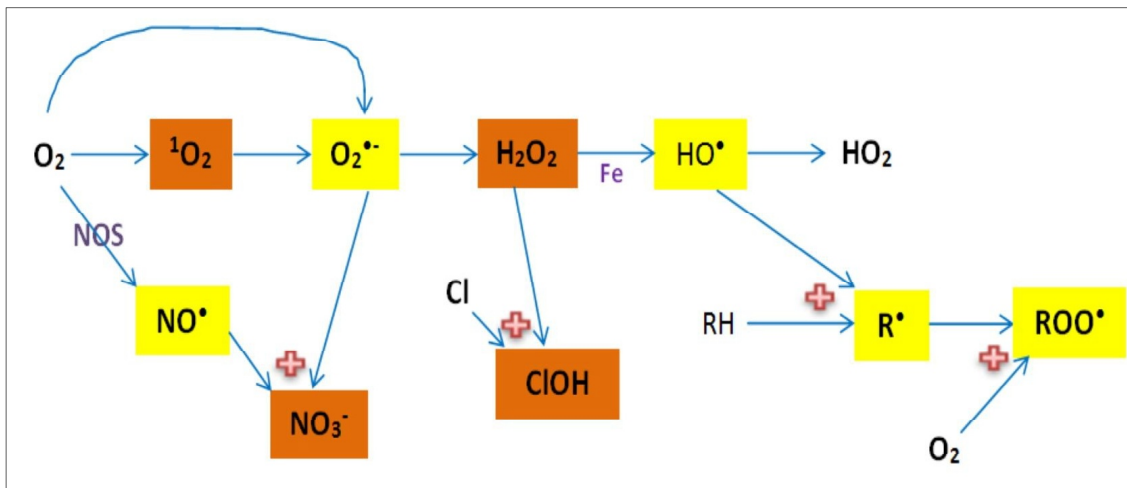


Figure 5: Cascade de production des principales ERO : en orange ERO non radicalaires et en jaune ERO radicalaires (Favier, 1997).

5.1.2. Origine des espèces réactives de l'oxygène

Les ROS peuvent être produits à partir de sources endogènes ou exogènes. Les sources endogènes de ROS comprennent différents organites cellulaires tels que les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique, où la consommation d'oxygène est élevée.

➤ La mitochondrie

La plupart des ROS intracellulaires proviennent des mitochondries (Figure 6).

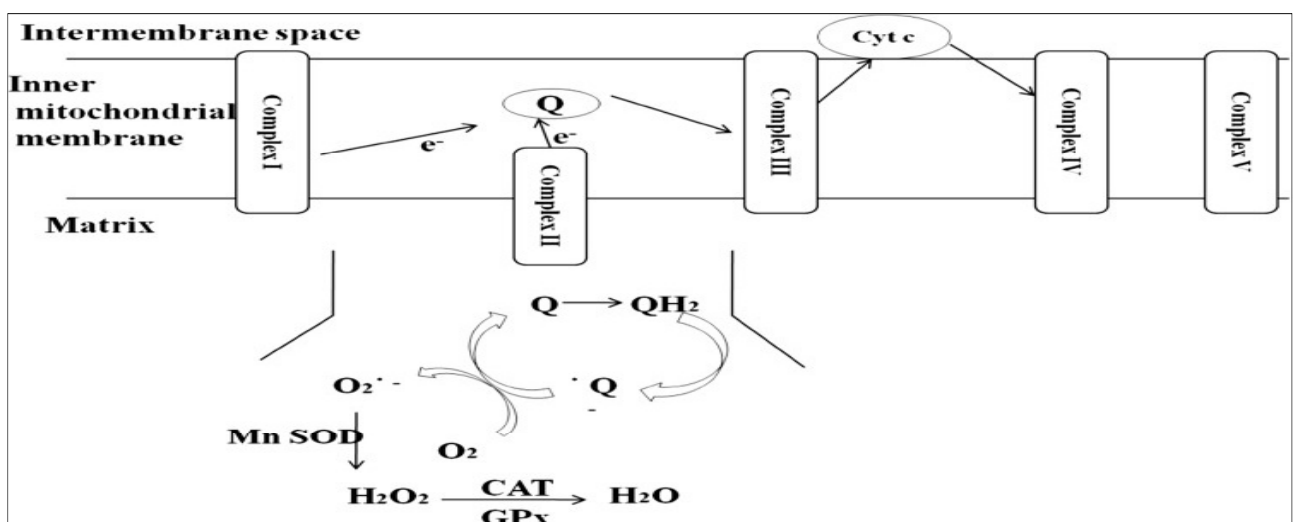


Figure 6 : production des ROS mitochondriales (Phaniendra *et al.*, 2015).

➤ Peroxysomes

Dans les peroxysomes, la voie respiratoire implique le transfert d'électrons de divers métabolites à l'oxygène qui conduit à la formation de H_2O_2 . Mais n'est pas couplé à la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP au lieu de libérer de l'énergie libre sous forme de chaleur. Les autres radicaux libres produits dans les peroxysomes comprennent H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} et NO^{\bullet} . La β -oxydation des acides

gras est le principal processus métabolique produisant H₂O₂ dans les peroxysomes. Les différentes enzymes peroxysomales telles que l'acyl CoA oxydases, la D-aminoacide oxydase, la L- α -hydroxy oxydase, l'urate oxydase, la xanthine oxydase, la D-aspartate oxydase se sont avérées produire des ROS différemment (Schrader *et al.*, 2006) (Tableau1).

Tableau1 : ROS produisant des enzymes dans les peroxysomes.

Enzyme	Substrat	ROS
✓ AcylCoA-oxydases	✓ Acides gras	✓ H ₂ O ₂
✓ D-aminoacide	✓ oxydaseD-proline	✓ H ₂ O ₂
✓ L-a-hydroxy	✓ oxydaseGlycolate	✓ H ₂ O ₂
✓ Urate oxydase	✓ Acide urique	✓ H ₂ O ₂
✓ D-aspartate	✓ D-aspartate	✓ H ₂ O ₂
✓ Xanthine oxydase	✓ Xanthine	✓ O ₂ •-, H ₂ O ₂

➤ Réticulum endoplasmique

Les enzymes du réticulum endoplasmique telles que les enzymes du cytochrome P450 et b₅ et la diamine oxydase contribuent à la formation des ROS (Bhattacharya, 2015).

Les autres sources endogènes de ROS comprennent la synthèse des prostaglandines, l'auto oxydation de l'adrénaline, les cellules phagocytaires, la riboflavine réduite, FMNH₂, FADH₂, l'activation des cellules immunitaires, l'inflammation, le stress, l'exercice excessif, l'infection, le cancer, le vieillissement, l'ischémie etc... (Pizzino *et al.*, 2017).

D'autre part, les ROS sont également produits dans les systèmes biologiques par diverses sources exogènes indiquées dans le tableau 2 :

Tableau2 : ROS générés à partir de sources exogènes (Pham-Huy *et al.*, 2008)

✓ Pollution de l'air et de l'eau	✓ Lumière ultraviolette
✓ L'alcool	✓ Cuisson (viande fumée, huile usée)
✓ Fumée de tabac	✓ Métaux de transition (Fe, Cu, Co, Cr)

✓ Métaux lourds (Cd, Hg, Pb, As)	✓ Haute température
✓ Des médicaments tel que : l'halothane, Paracétamol, VPA	✓ Solvants industriels

5.1.3. Rôle physiologique des ERO

Physiologiquement, les espèces réactives de l'oxygène existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles, assurant de nombreuses fonctions utiles.

Les ERO sont des armes mortelles utilisées par les phagocytes et d'autres types cellulaires, tels que les cellules épithéliales pulmonaires, contre les pathogènes. Ils peuvent aussi tuer les agents pathogènes directement en causant des dommages oxydatifs ou indirectement en stimulant l'élimination des agents pathogènes par divers mécanismes non oxydatifs. Notamment la signalisation des récepteurs de reconnaissance des formes, l'autophagie, la formation de pièges extracellulaires neutrophiles et les réponses lymphocytaires T (Paiva et Marcelo, 2014) (Figure 7).

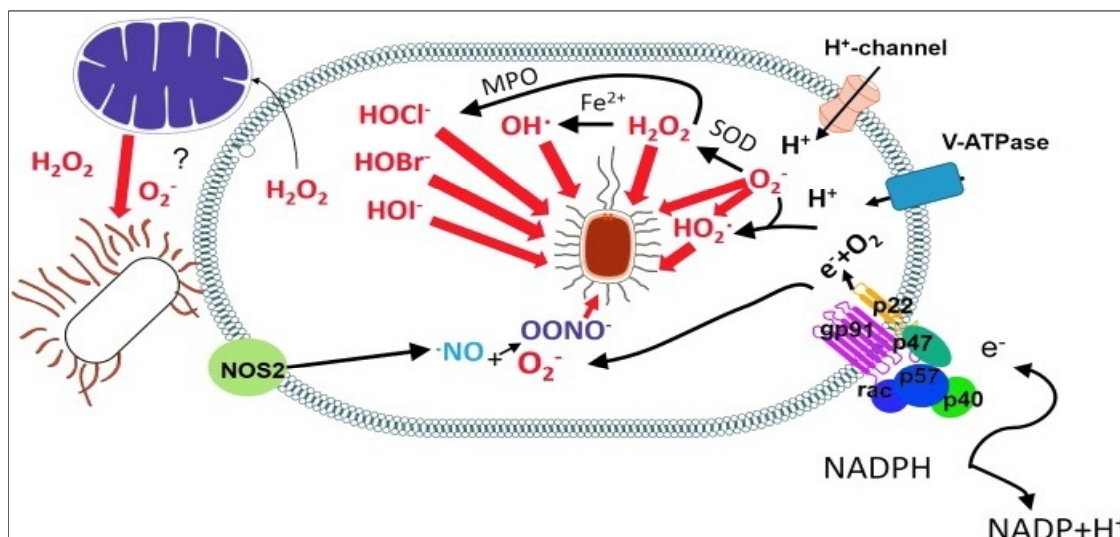


Figure 7: Les ROS favorisent l'élimination des agents pathogènes par des mécanismes oxydatifs (Paiva et Marcelo, 2014).

5.1.4. Conséquences du Stress Oxydatif

En raison de leurs caractéristiques chimiques spéciales, les ROS / RNS peuvent initier la peroxydation des lipides et provoquer des ruptures de brins d'ADN. En plus ils peuvent oxyder de façon indiscriminée pratiquement toutes les molécules dans les membranes et les tissus biologiques, entraînant des blessures (Li *et al.*, 2015) (Figure 8).

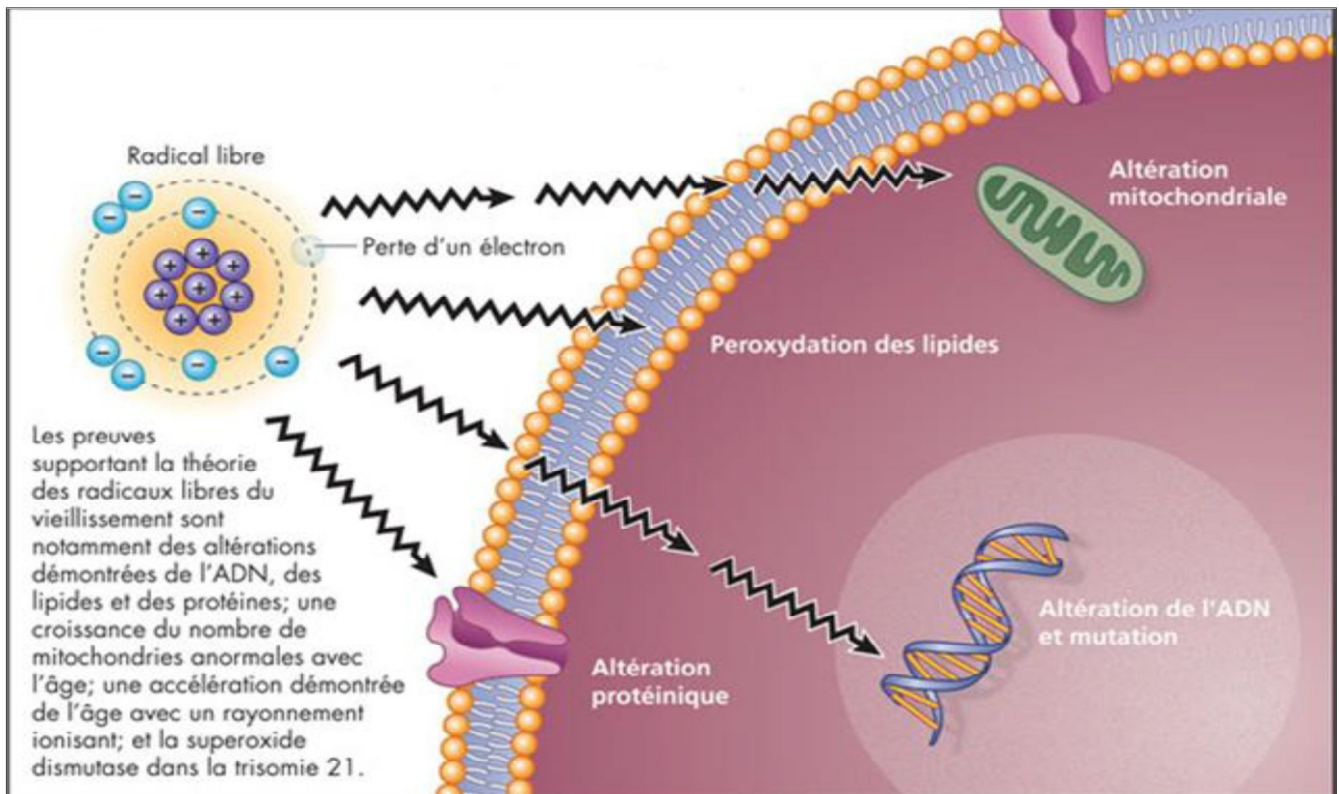


Figure 8 : Les conséquences du stress oxydant (Bonnet *et al.*, 2010).

5.1.4.1. Les dommages oxydatifs à l'ADN

Les dommages oxydatifs de l'ADN sont largement utilisés dans la littérature pour décrire les lésions de l'ADN induites par le stress oxydatif (Valente *et al.*, 2012). Il peut induire environ 10 000 altérations de l'ADN par cellule et par jour, ce qui représente une partie importante des lésions endogènes de l'ADN (Dey *et al.*, 2013 ; Tang *et al.*, 2014). Ceci peut induire des cassures monos et double brin de l'ADN, des modifications des bases, des interactions protéines-ADN, des altérations génétiques, et des mutations conduisant à l'apparition de cancer (Phaniendra *et al.*, 2014 ; Kumar *et al.*, 2017) (Figure 9). Ces attaques sont essentiellement causées par le HO[•] qui réagit avec les purines et les pyrimidines de l'ADN par l'addition de doubles liaisons et l'abstraction d'un atome H (H[•]) du groupe méthyle de la thymine et de chacune des liaisons C-H du 2'-désoxyribose. Il en résulte des produits, tels que le 5-hydroxyméthyl-uracile, le radical d'addition C8-OH[•] de la guanine et la 8-hydroxyguanine (8-OH-G) (Klaassen *et al.*, 2010).

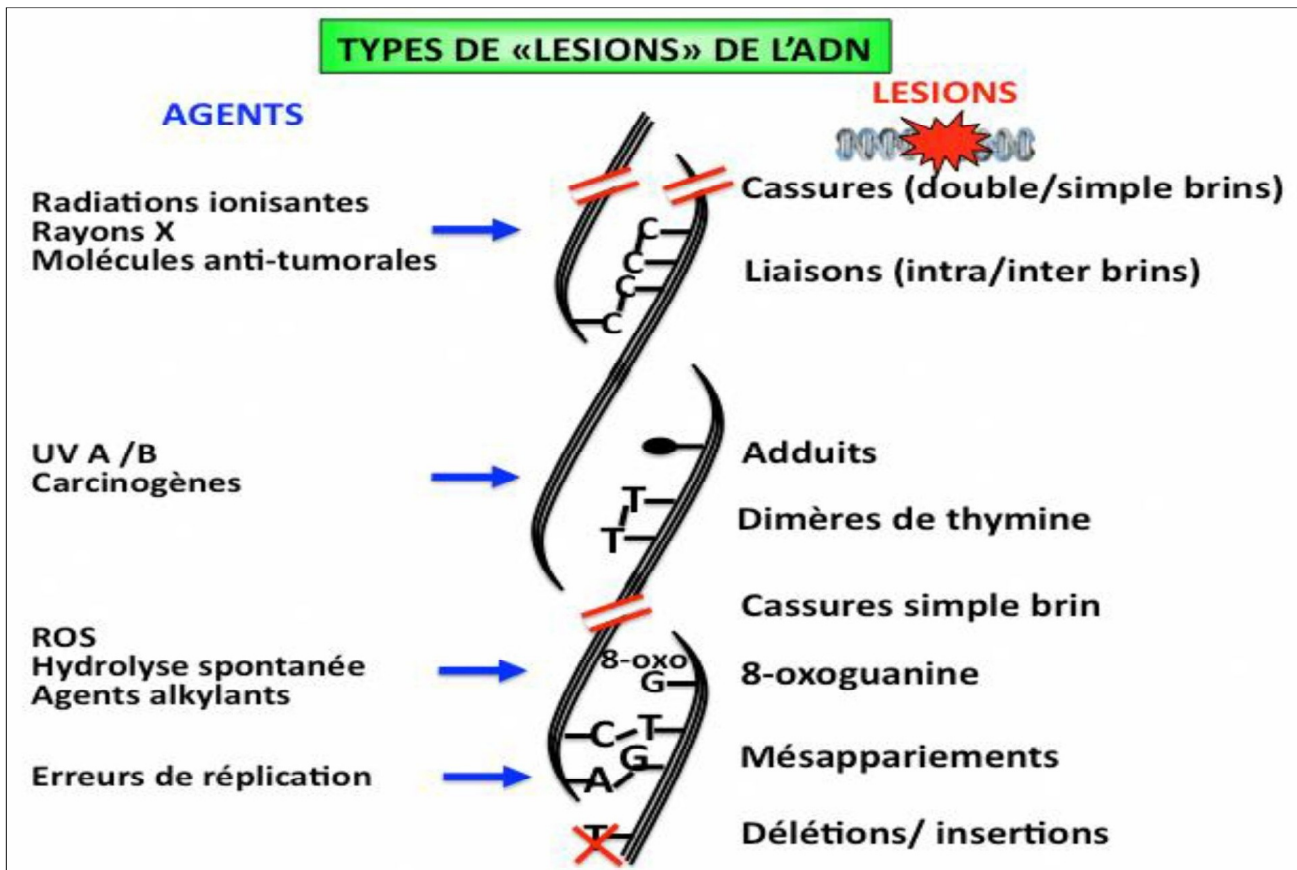


Figure 9 : Les lésions de l'ADN (Favier, 2003).

5.1.4.2. Les lipides

La peroxydation lipidique peut être décrite comme un processus dans lequel les oxydants tels que les radicaux libres ou les espèces non-radicaux attaquent les lipides contenant des doubles liaisons carbone-carbone, en particulier les acides gras polyinsaturés (PUFA) qui impliquent l'extraction d'hydrogène du carbone dans les radicaux peroxydes lipidiques et les hydroperoxydes. Ce qui provoque des changements dans la perméabilité et la fluidité de la bicouche lipidique membranaire et des altérations de l'intégrité cellulaire (Yin *et al.*, 2011 ; Barrera, 2012). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) et le malonyldialdéhyde (MDA). Ce dernier a été largement utilisé pendant de nombreuses années comme un biomarqueur pratique pour la peroxydation lipidique des acides gras en raison de sa réaction facile avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Kumar *et al.*, 2017).

Le processus global de la peroxydation lipidique comprend trois étapes : initiation, propagation et terminaison. Dans l'étape d'initiation de la peroxydation lipidique, les pro-oxydants tels que le radical hydroxyle font abstraction de l'hydrogène allylique formant le radical lipidique centré sur le carbone (L[•]). Dans la phase de propagation, le radical lipidique (L[•]) réagit rapidement avec l'oxygène pour former un radical lipide peroxy (LOO[•]) qui extrait un hydrogène d'une autre molécule lipidique générant un nouveau L[•] (qui continue la réaction en chaîne) et hydroperoxyde lipidique (LOOH).

Dans la réaction de terminaison, des antioxydants comme la vitamine E donnent un atome d'hydrogène aux espèces LOO et forment un radical de vitamine E correspondant qui réagit avec un autre LOO[•] formant des produits non radicalaires (Figure 10) (Ayala *et al.*, 2014 ; Savina, 2014).

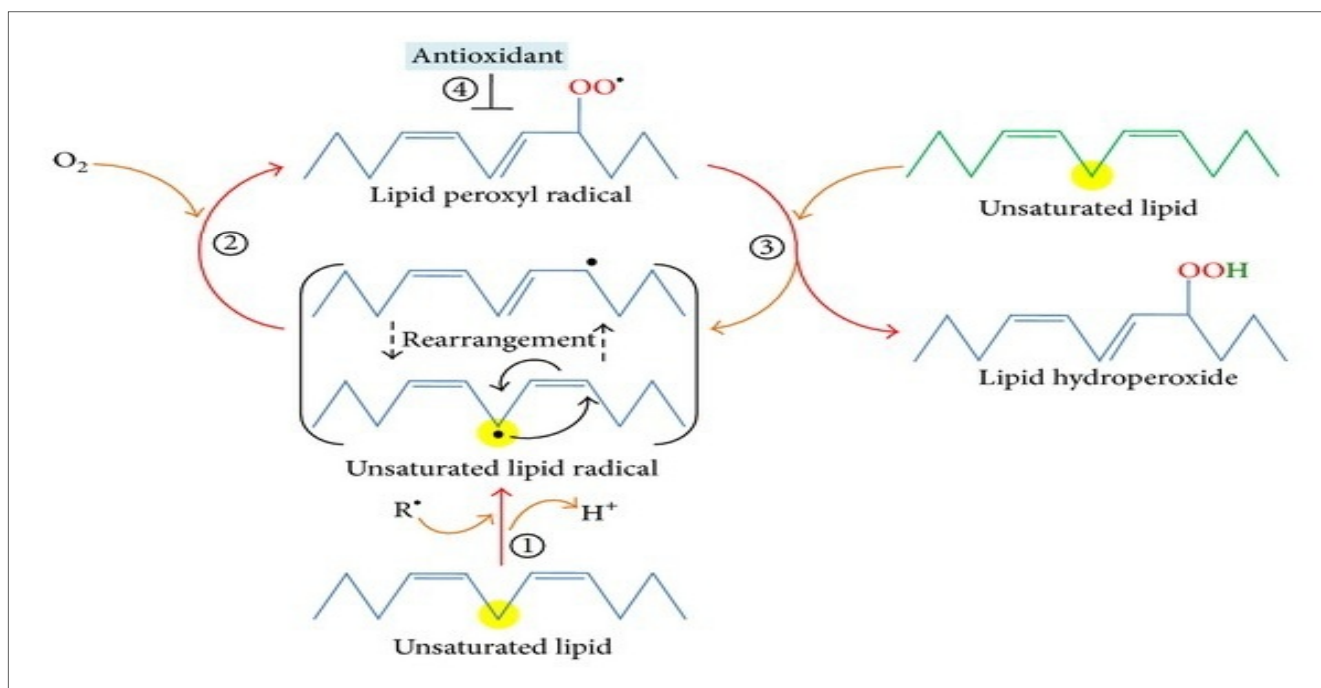


Figure 10 : les différentes étapes de la peroxydation lipidique (Ayala *et al.*, 2014).

5.1.4.3. Les protéines

Les effets néfastes des niveaux des ROS déséquilibrés sur les protéines pendant le stress oxydatif sont un sujet de recherche principal pour la communauté scientifique (Höhn *et al.*, 2017). Les ROS oxydent différents acides aminés présents dans les protéines, causant la formation de liaisons croisées protéine-protéine. Entraînant la dénaturation et la perte de fonctionnement des protéines. La perte de l'activité enzymatique et la perte de fonction des récepteurs et des protéines de transport. Les dommages oxydatifs induits par les ROS des résidus d'acides aminés tels que la lysine, la proline, la thréonine et l'arginine donnent des dérivés carbonylés dont leur présence dans les protéines a été considérée comme le marqueur de l'oxydation des protéines induite par les ROS (Phaniendra *et al.*, 2014).

Les dommages cellulaires causés par les radicaux libres semblent être un facteur majeur du vieillissement et des maladies dégénératives du vieillissement telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les cataractes, déclin du système immunitaire, maladies du foie, diabète sucré, inflammation, insuffisance rénale, dysfonctionnement cérébral et stress, entre autres. La neutralisation des radicaux libres ou des radicaux peroxydes par un agent antioxydant est importante pour la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Sanchez, 2016) (Figure 11).

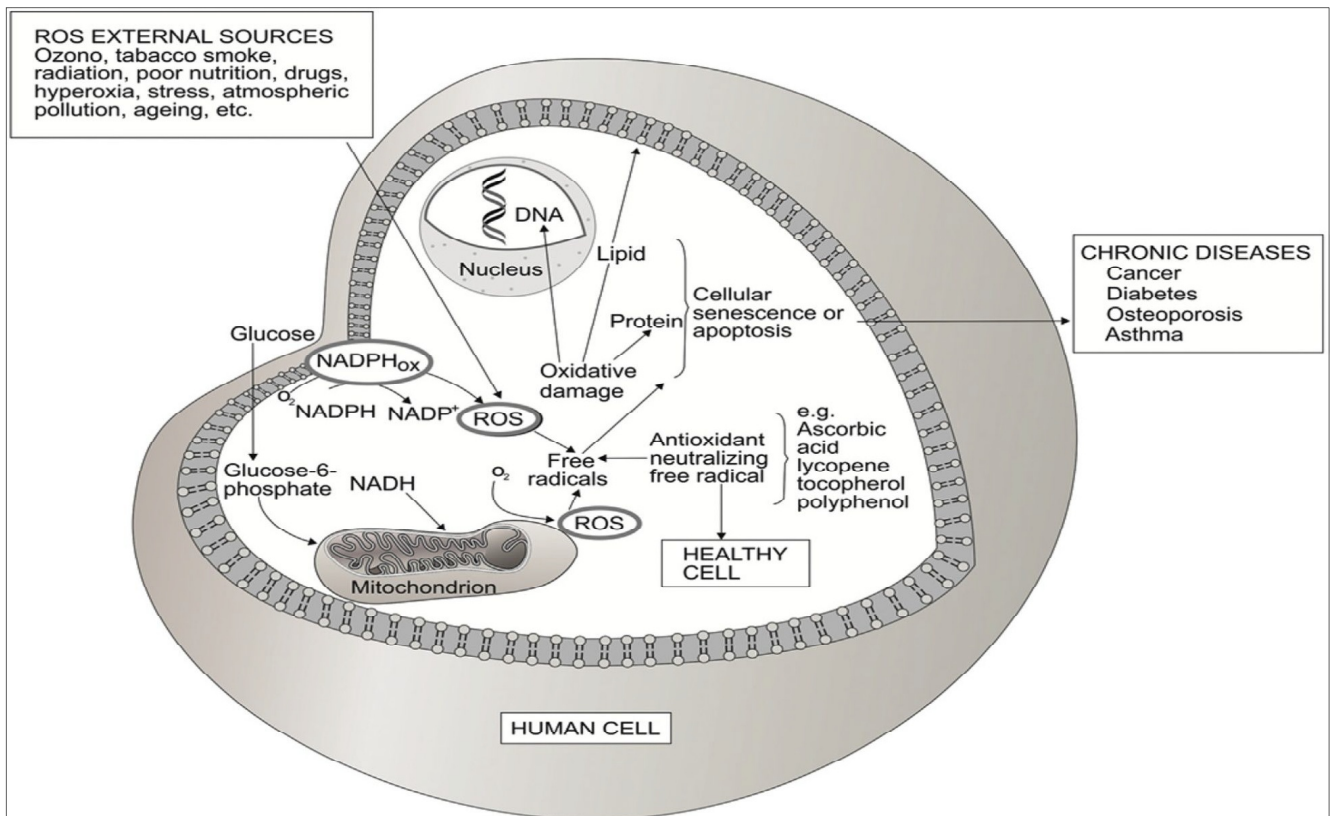


Figure 11 : Représentation schématique d'une cellule humaine, qui peut être endommagée par les radicaux libres générés par des sources internes et externes (Sanchez, 2016).

5.1.5. Pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydatif est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies, comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, le diabète, l'hypertension, les maladies auto-immunes et le cancer (Kreuz et Fischle, 2016) (Figure12).

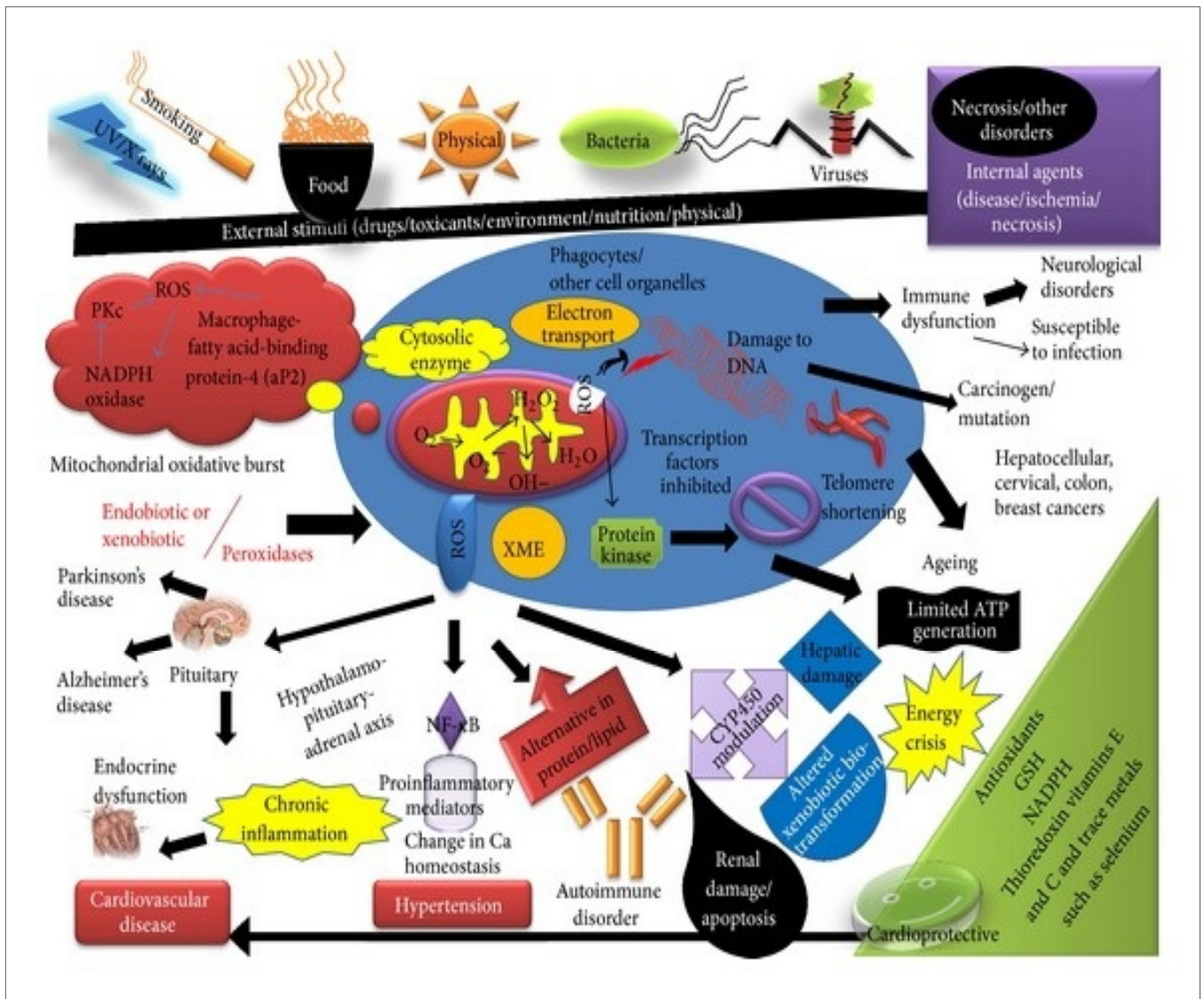


Figure12 : Stress oxydatif et développement des maladies (Rahal *et al.*, 2014).

Le stress oxydatif serait la cause de l'induction d'allergies, de maladies auto-immunes ou neurodégénératives ainsi que d'une altération de la croissance cellulaire, d'infections chroniques menant au néoplasie, cancer métastatique et d'angiogenèse. Les dommages aux composants cellulaires tels que les protéines, les gènes et la vascularisation sont à l'origine de ces altérations. Divers facteurs produits par le stress oxydatif à savoir le TNF, les protéases, les ROS et les kinases, participent activement à la croissance et à la prolifération tumorale. Ces facteurs sont également requis pour la dégradation de la membrane, l'invasion des tissus avoisinants et la migration des cellules tumorales à travers le système vasculaire et les canaux lymphatiques pour les métastases (Rahal *et al.*, 2014).

II.5.2. Le Système de défense Anti Oxydant

Les antioxydants sont utilisés pour contrebalancer l'effet des radicaux libres et réduire les signes néfastes des ROS. Un antioxydant est une molécule stable qui donne un électron à un radical libre

chargé et met fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. La propriété de piégeage des radicaux libres des antioxydants retarde ou inhibe les dommages cellulaires (Kumar *et al.*, 2017). Il existe différentes sortes d'antioxydants (Figure 13).

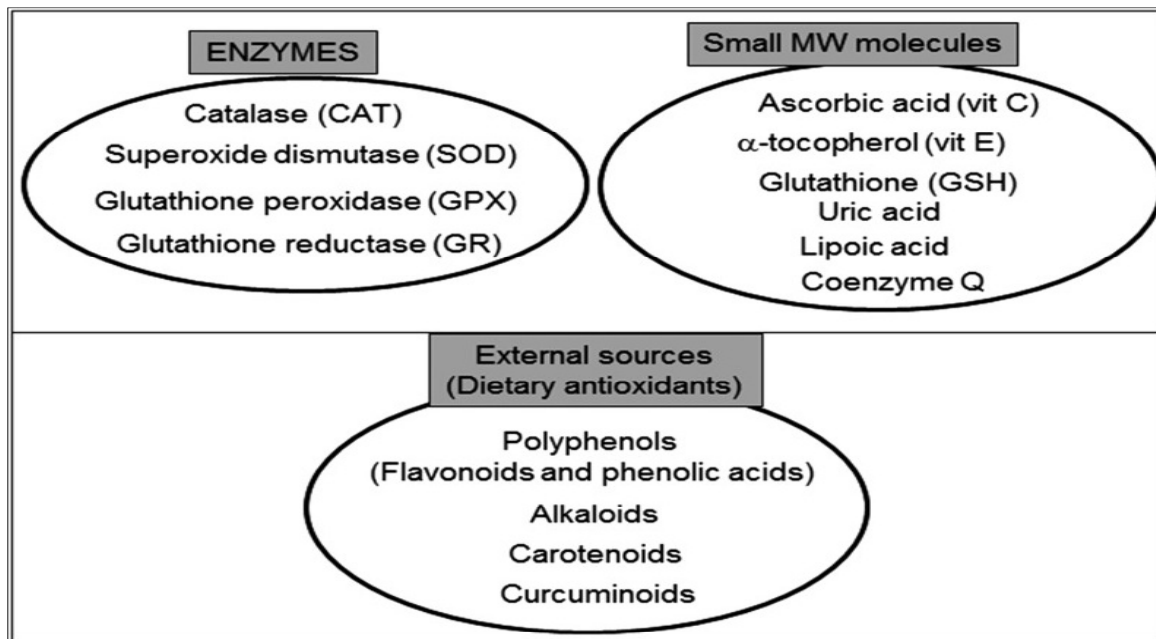


Figure 13 : Les différents types d'antioxydants (Apostolova et Victor, 2015).

5.2.1. Les antioxydants enzymatiques

✓ Le superoxyde dismutase

Le superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme antioxydante qui régule les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dans les conditions basales du métabolisme tissulaire et de la santé (Bernardy *et al.*, 2017).

Le mécanisme de dismutation de ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 par le SOD implique une réduction et une réoxydation alternées d'un métal de transition actif redox, tel que le cuivre (Cu) et le manganèse (Mn) au site actif de l'enzyme, Cela indique que l'activité SOD nécessite un métal catalytique (Fukai et Ushio-Fukai, 2011) (Figure 14).

Il existe trois types de SOD exprimées dans des cellules de mammifères : Une SOD contenant du cuivre/zinc (Cu/ZnSOD, SOD1) est principalement localisée dans le cytosol, bien qu'elle ait été trouvée dans l'espace inter membranaire des mitochondries. Une SOD contenant du manganèse (MnSOD) (SOD2) est l'antioxydant mitochondrial qui existe dans les homotétramères et se localise dans la matrice mitochondriale. Une SOD extracellulaire (ECSOD, SOD3) localisée dans l'espace extracellulaire (Candas et Li, 2014). Ces formes actives des trois isoformes SOD ont été associées à des maladies de mammifères de diversité cellulaire variable. En effet, la maladie la plus étudiée qui possède une mutation SOD est la sclérose latérale amyotrophique (SLA), où Cu/Zn SOD est

l'isoforme spécifique associée à cette maladie, ainsi qu'une autre maladie souvent associée à un déséquilibre de Cu/Zn SOD est la trisomie 21, ou syndrome de Down (Case, 2017).

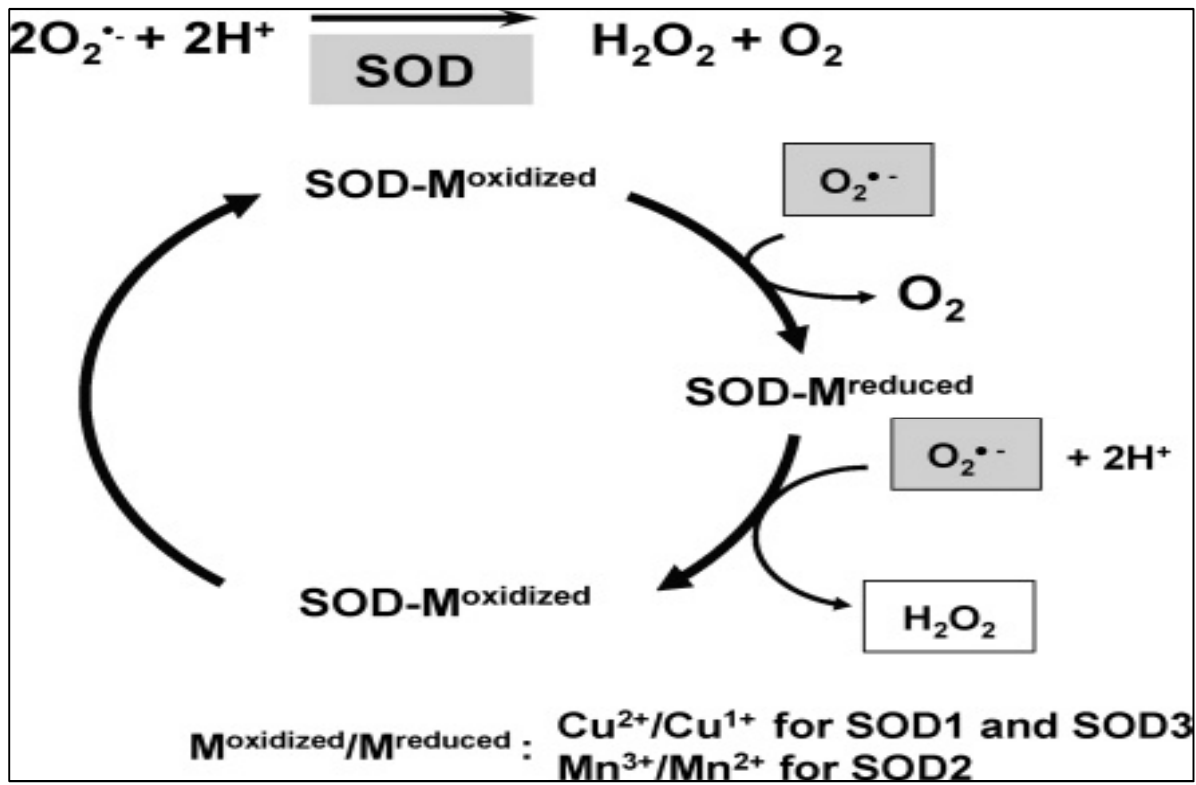


Figure14: Mécanisme commun de balayage de $\text{O}_2^{\bullet-}$ par les SOD (Fukai et Ushio-Fukai, 2011).

✓ Les glutathions peroxydases (GPx)

Les glutathion-péroxydases (GPx) sont des non-hémi-thiol-péroxydases appartenant à une famille d'enzymes antioxydantes omniprésentes. Ce sont des enzymes formées de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Ils sont très importants dans la désintoxication des espèces réactives de l'oxygène induites par le stress et protègent ainsi les cellules contre les dommages oxydatifs graves (Islam *et al.*, 2015).

Ils catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes organiques ou hydroperoxydes lipidiques en eau alcool en utilisant du glutathion réduit (GSH) comme réducteur (Jain et Bhatla, 2014 ; Reichel, 2010). Chez les Eucaryotes, il existe cinq isoenzymes de la GPx qui sont présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries: La GPx 1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmique, la GPx 4 ou PHGPx localisée à l'interface de la membrane interne du cytoplasme et la GPx5 épидidymaire. La plus abondante est la GPx 1 et elle est exprimée dans la plupart des cellules (Comhair et Erzurum, 2002).

✓ Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme antioxydante et hydroperoxydase, protège l'environnement cellulaire des effets néfastes du peroxyde d'hydrogène en facilitant sa dégradation en oxygène et en eau (Dash et Phillips, 2013). La catalase dissocie directement le peroxyde d'hydrogène dans l'eau et le dioxygène par des réactions de redox à deux électrons où les peroxydases éliminent le H₂O₂ en l'utilisant pour oxyder une autre (Bi *et al.*, 2017).

La catalase est principalement localisée dans les peroxysomes de diverses cellules, dans les plaquettes et le stroma des érythrocytes (Codoner-Franch *et al.*, 2011).

5.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

✓ Le glutathion(GSH)

Le glutathion, γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine, est un tripeptide présent dans chaque cellule du corps humain. Bien que ses fonctions soient complexes et restent l'objet de recherches actuelles. Il est largement utilisé dans les industries médicale, alimentaire et cosmétique en raison de ses diverses fonctions physiologiques ; agissant comme antioxydant, détoxifiant des xénobiotiques et immunostimulant. Il intervient aussi dans le cycle de deux vitamines antioxydantes la vitamine E et la vitamine C (power et jakson, 2008 ; Honda *et al.*, 2017 ; Kobayashi *et al.*, 2017). Il est l'un des molécules importantes qui protègent les cellules contre les ROS et maintiennent l'homéostasie redox intracellulaire sous l'action de glutathion S-transférase (GST) et la glutathion peroxydase. Il a deux formes stables principales : le thiol (GSH) et le disulfure (GSSG). Il est synthétisé à partir de ses acides aminés constitutifs via deux étapes catalysées par la γ -glutamyl cystéinesynthase (GSH1) et la glutathion synthase (GSH2). (Fukushima *et al.*, 2017 ; Uchida *et al.*, 2017).

Le glutathion se comporte comme un antioxydant notamment au niveau mitochondrial en présence de GPx dépendante du sélénium. Il minimise le peroxyde d'hydrogène empêchant tout effet nocif tel que la peroxydation lipidique (Lu, 2013).

La figure 15 explique les différentes réactions antioxydantes mettant en jeu le glutathion.

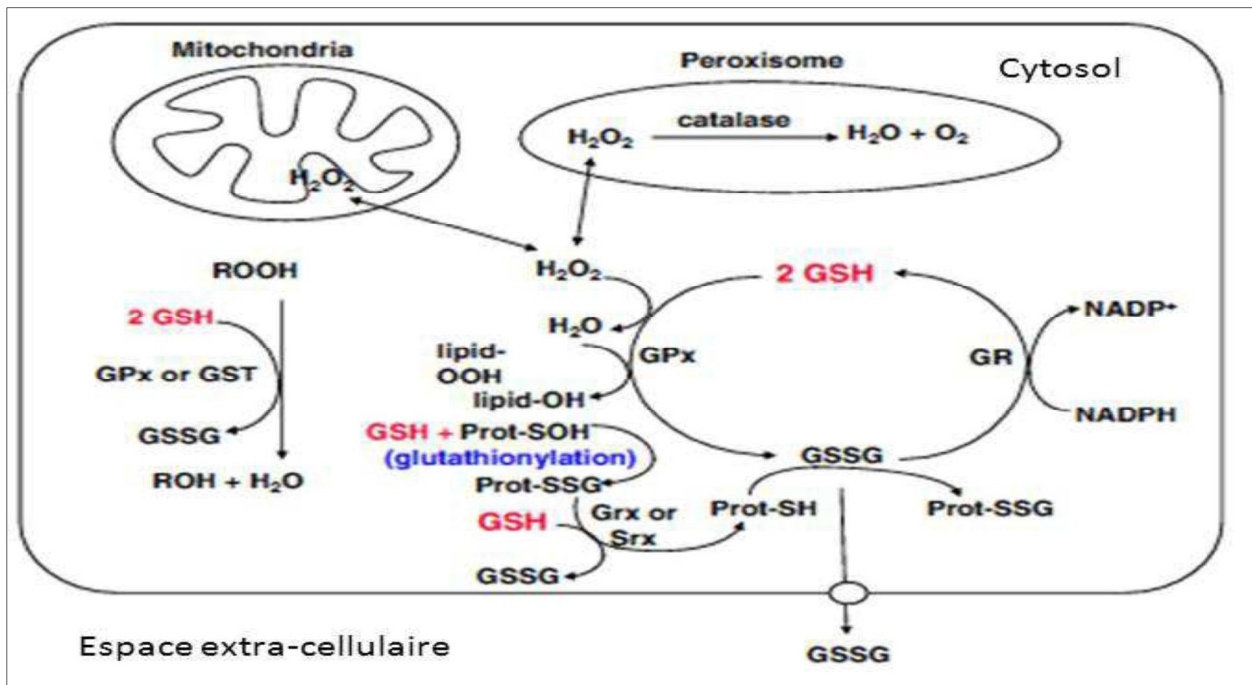


Figure15 : Les réactions impliquant le glutathion (Lu, 2013).

✓ **La vitamine E (α -tocophérol)**

La vitamine E, est une vitamine liposoluble qui fonctionne comme un antioxydant. Huit formes de cette vitamine ont été identifiées comme pertinentes pour la nutrition humaine et animale dont la plus active est l' α -tocophérol (Figure16).

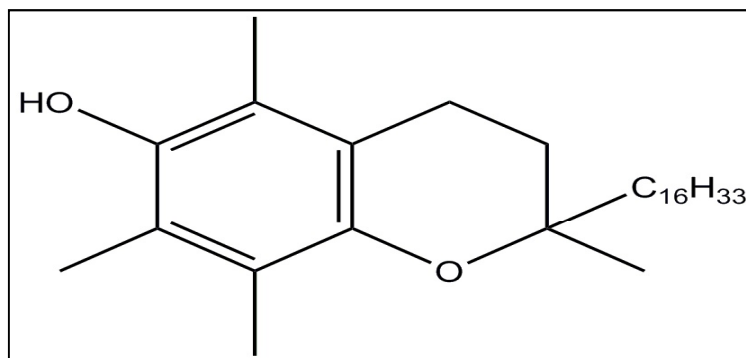


Figure16 : La structure chimique de la vitamine E (α -tocopherol) (Gardèse-Albert *et al.*, 2003).

Elle défend les membranes biologiques, les lipoprotéines et les réserves de lipides contre l'oxydation. En particulier, elle protège les acides gras insaturés par l'hydrogénation de leur radical hydroxyle (ROO \cdot) et alkoyle (RO \cdot) en permettant ainsi la terminaison du mécanisme de la peroxydation lipidique. Elle joue son rôle antioxydant principal dans les membranes biologiques, notamment au niveau de la membrane mitochondriale qui contient de forts taux de vitamine E et qui est riche en acides gras polyinsaturés cibles du stress oxydant.

Cette activité antioxydante est liée à sa capacité à capter l'électron célibataire des radicaux libres. De plus, la vitamine E est essentielle au maintien de la qualité de la chair, à la résistance normale des globules rouges à l'hémolyse et à la perméabilité des capillaires et des muscles cardiaques (Wang *et al.*, 2016 ; Ambrogini *et al.*, 2016 ; Chabory, 2009 ; Magosso *et al.*, 2013).

✓ La vitamine C

L'acide ascorbique (vitamine C, Vit. C) (Figure 17) est une vitamine hydrosoluble importante pour les humains et les autres espèces (Chenet *et al.*, 2017). La vitamine C est également un antioxydant, protégeant le corps contre les effets délétères des radicaux libres, des polluants et des toxines. Elle facilite aussi la conversion du cholestérol en acides biliaires et augmente l'absorption du fer dans l'intestin. Des carences en vitamine C ont été associées à l'anémie, aux infections, à la tendance aux saignements et à la cicatrisation retardée des plaies (Hah *et al.*, 2017).

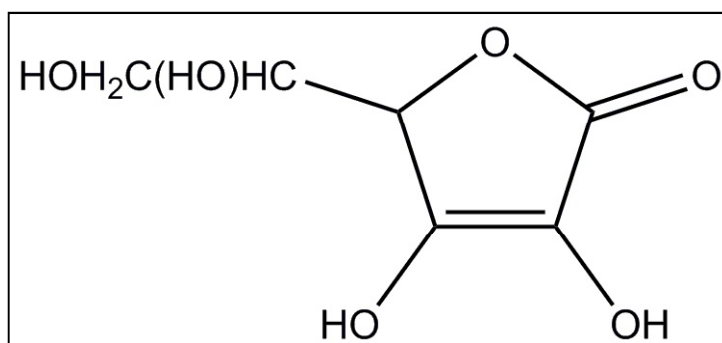


Figure 17 : La structure chimique de la vitamine C (acide ascorbique) (Gardèse-Albert *et al.*, 2003).

✓ La vitamine A

La vitamine A (retinol) est un micronutriment essentiel chez les animaux supérieurs. Ce qui signifie qu'elle doit être obtenue dans l'alimentation pour maintenir la santé et prévenir le développement de la maladie (Clugston et Blaner, 2014). Elle est liposoluble et obtenue à partir de différents composés : all-transrétinol (considéré comme la molécule Vit. A), β -carotène (précurseur Vit. A), et rétinol esters (rétinol estérifié à d'autres molécules, telles que le palmitate). L'arrangement de longues chaînes de doubles liaisons conjuguées, communes à tous les rétinoïdes, permet à la structure d'exercer des propriétés de piégeage des ROS. Habituellement, cette activité est impliquée dans la prévention de la peroxydation des lipides (Petiz *et al.*, 2017) (Figure 18).

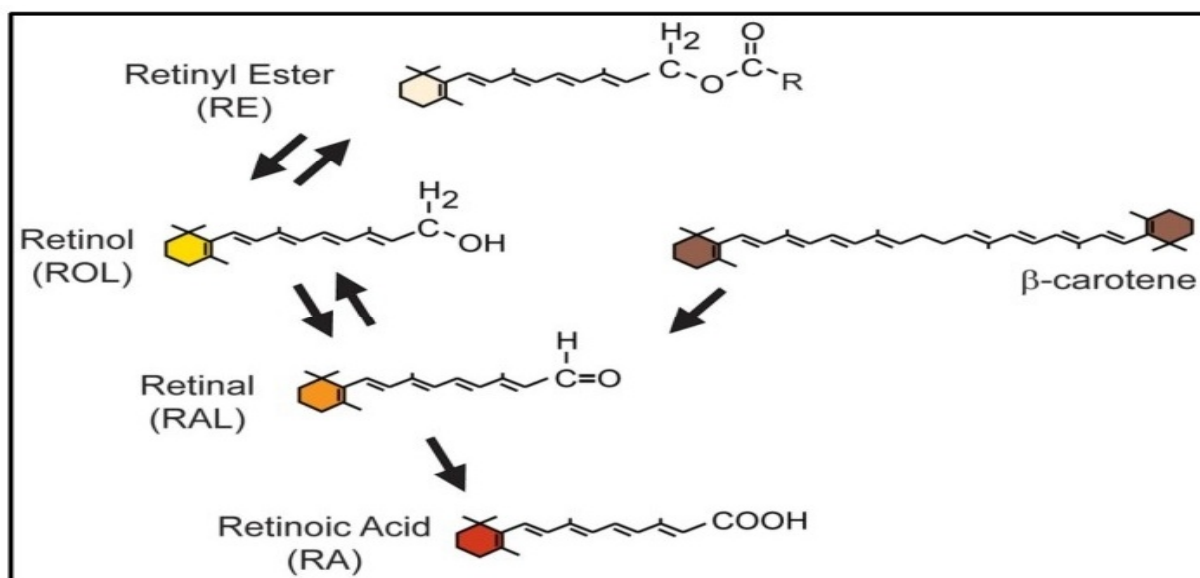


Figure18 : Les différents composés rétinoides par rapport au groupe terminal polaire à l'extrémité de la chaîne. Le composé all-trans-rétinol (ROL) peut être converti de manière réversible en all-trans-rétinal (RAL) ou en esters de rétinyle (RE). Le caroténoïde β -carotène peut être converti en RAL. RAL peut être oxydé de manière irréversible en acide rétinoïque (RA) (Metzler et Sandell, 2016).

✓ L'acide urique

L'acide urique est synthétisé principalement dans le foie, les intestins et d'autres tissus tels que les muscles, les reins et l'endothélium vasculaire en tant que produit final du métabolisme de purines, dérivé en grande partie de protéines animales. De plus, les cellules vivantes et mourantes dégradent leurs acides nucléiques, l'adénine et la guanine en acide urique (El Ridi et Tallima, 2017).

L'acide urique a été reconnu comme un puissant antioxydant qui piège l'oxygène singulet, les radicaux oxygène et les métaux de transition peroxydant et chélates, pour réduire l'oxydation de l'acide ascorbique médiée par les ions fer. Il peut également empêcher la nitrosation des protéines induite par le peroxydant, la peroxydation des lipides et des protéines et protéger aussi les LDL contre l'oxydation à médiation par Cu^{2+} (So et Thorens, 2010).

✓ La bilirubine

La bilirubine, produit final du métabolisme de l'hème, est un antioxydant endogène aux propriétés anti-inflammatoires, capable de piéger les radicaux peroxyde, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires. Des concentrations élevées de bilirubine sérique sont associées à une capacité antioxydante totale accrue et offrent une protection contre les maladies induites par le stress oxydatif. Elle se défend également contre la peroxydation lipidique. Une fois que la bilirubine agit comme un antioxydant,

elle est oxydée en biliverdine qui sera alors immédiatement réduite par la biliverdine réductase en bilirubine (Haleng *et al.*, 2007 ; Karadag *et al.*, 2017 ; Dwarka *et al.*, 2017).

✓ **Les oligo-éléments**

Les oligo-éléments sont principalement des cofacteurs aux enzymes antioxydantes impliqués dans toutes les voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires (Grait, 2006). Parmi les principaux oligo-éléments : le sélénium qui a une importance particulière et joue un rôle important en tant qu'un cofacteur d'enzymes antioxydantes telles que la GPX et la thiorédoxine réductase. Son rôle dans le superoxyde dismutase (SOD) et sa capacité à inhiber les oxydases NADPH qui catalysent la transformation de l'oxygène en radical oxygène singulet sont également pertinents. De même, il a été constaté que le zinc peut empêcher la peroxydation des lipides et donc protéger les membranes cellulaires (Mut-Salud *et al.*, 2015).

III. Polyphénols

1. Définition

Les antioxydants naturels sont largement distribués dans les plantes alimentaires et médicinales. Ces antioxydants naturels, en particulier les polyphénols, présentent un large éventail d'effets biologiques, notamment anti-inflammatoires, antiviellissement, anti-athérosclérose et anticancéreux. En effet, la recherche scientifique appuie fortement sur les propriétés antioxydantes des polyphénols où un grand nombre d'études cliniques, précliniques et épidémiologiques ont suggéré un rôle possible dans la prévention des maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les cancers, l'ostéoporose et les maladies neurodégénératives. Mais la plus forte preuve d'effets bénéfiques pour la santé concerne les maladies cardiovasculaires. Ils peuvent également servir de base au développement de nouveaux composés thérapeutiques et contribuer ainsi à des interventions pharmacologiques (Xu *et al.*, 2017 ; Zamora-Ros *et al.*, 2014 ; Figueira *et al.*, 2017) (Figure 19).

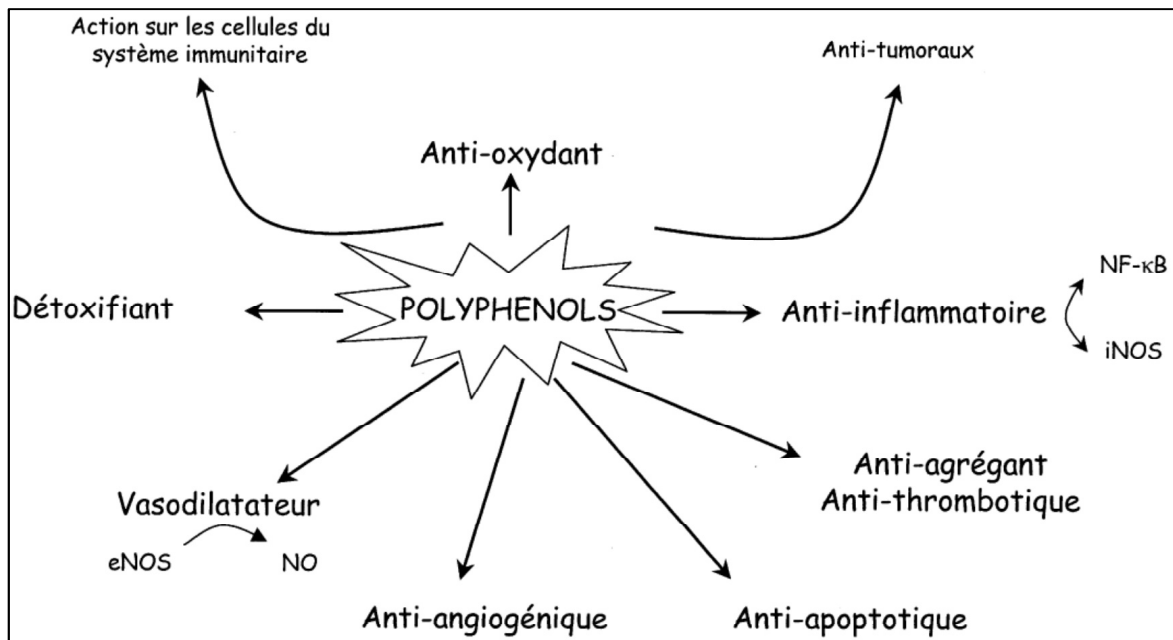


Figure 19: Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols sont classés en flavonoïdes et non flavonoïdes, en fonction du nombre de cycles phénoliques et d'éléments structuraux liés à ces cycles. Les flavonols, les flavones, les anthocyanes, les flavanones et les isoflavones sont les classes les plus importantes de flavonoïdes présents dans les aliments. Les sous-classes de dihydroflavonols, de flavan-3,4-diols, de chalcones, de dihydrochalcones et d'aurones sont des composants mineurs de notre alimentation. Les classes les plus importantes de non-flavonoïdes sont les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes (Mattera *et al.*, 2017) (Figure 20).

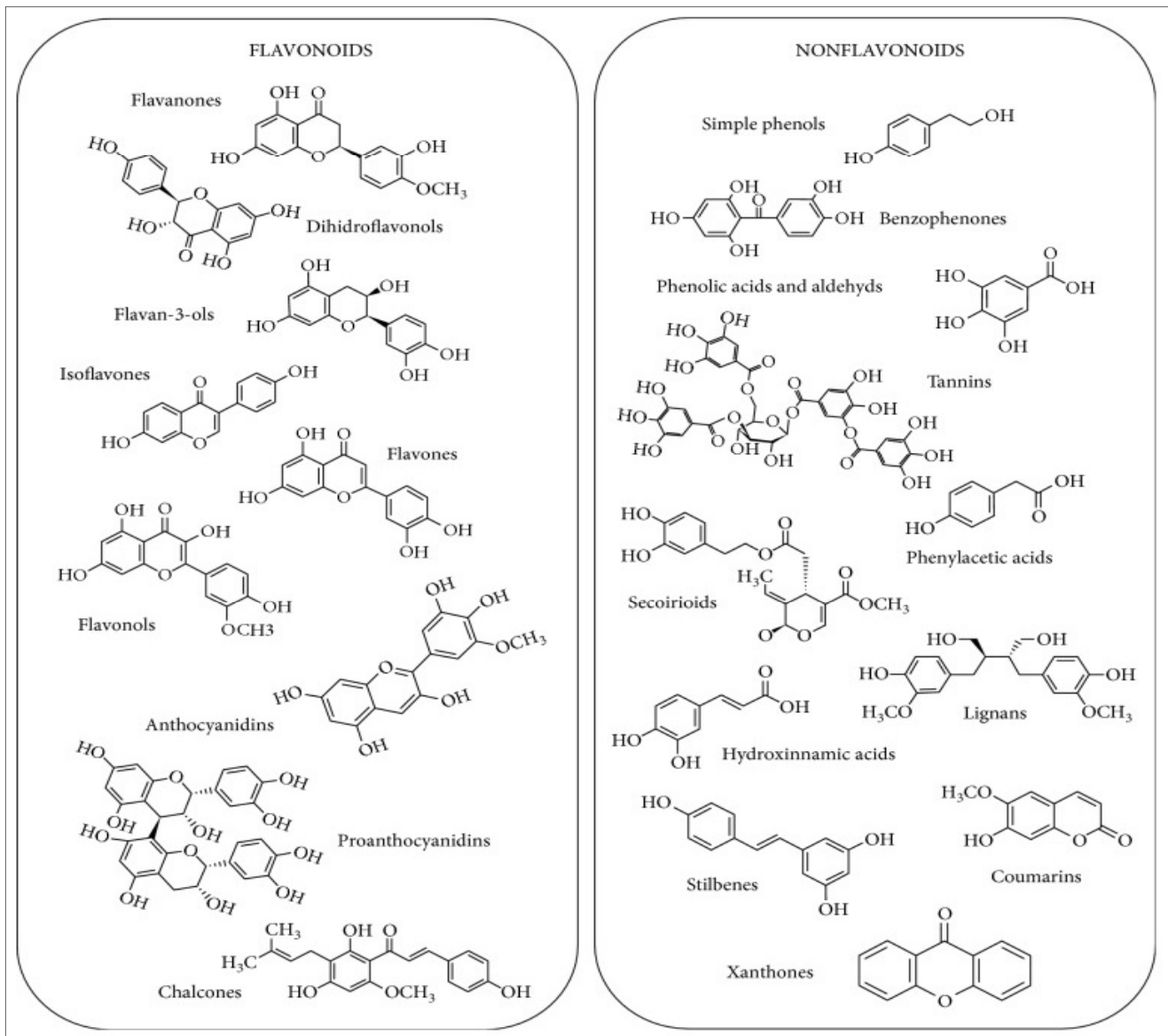


Figure 20 : Structures chimiques représentatives des principaux groupes de polyphénols (Mattera *et al.*, 2017).

2. Les flavonoïdes

✓ Flavones

Les flavones sont une classe de flavonoïdes trouvés dans une variété de fruits et de légumes et sont les plus abondants dans les têtes d'artichauts, le persil et le céleri. Sous leur forme native, ils sont conjugués à des sucres, à des acides simples (acétyle et malonyle) et à des acides cinnamiques (Figure 21) plutôt qu'à des aglycones. Des études *in vitro* démontrent que la flavone apigénine inhibe les cellules cancéreuses humaines du poumon, du côlon, du sein, de la prostate, du cerveau et de la peau, le cancer de la langue et la leucémie. L'apigénine et la lutéoline réduisent également l'adhésion des monocytes aux LDL *in vitro* et stades initiaux de l'athérosclérose. De plus, des études chez l'animale avec des flavones démontrent la capacité à atténuer la réponse inflammatoire (Hostetler *et al.*, 2012).

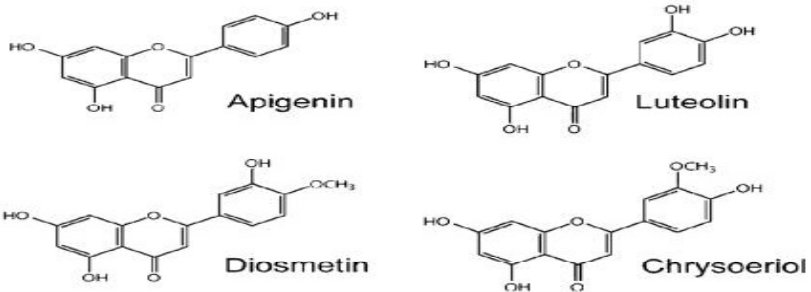
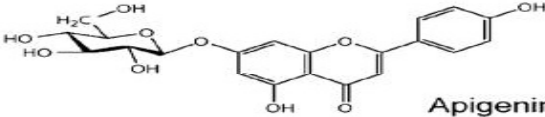
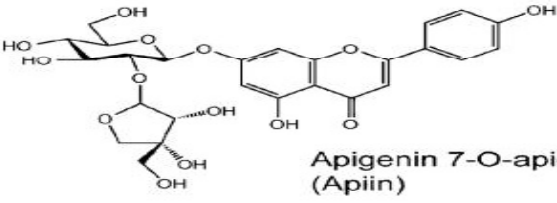
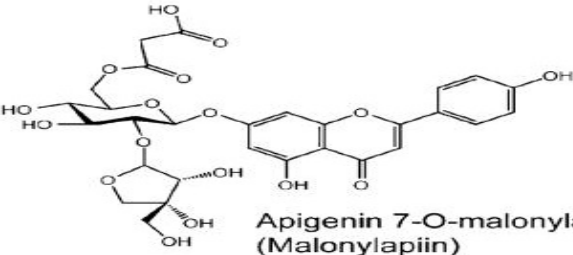
Flavone derivative	Example
Aglycone	 <p>Apigenin Luteolin</p> <p>Diosmetin Chrysoeriol</p>
7-O-glucoside	 <p>Apigenin 7-O-glucoside</p>
7-O-apiosylglucoside	 <p>Apigenin 7-O-aposylglucoside (Apiin)</p>
7-O-malonyl-aposylglucoside	 <p>Apigenin 7-O-malonylapiosylglucoside (Malonylapiin)</p>

Figure 21 : Structures des dérivés communs de flavones (Hostetler *et al.*, 2012).

✓ **Flavonols**

La structure la plus simple du flavonols a le squelette 3-hydroxyflavone. L'action biologique des flavonols peut être modifiée par modification chimique. Par exemple, le nombre de groupes hydroxyle sur le squelette du flavonols influence sa puissance antioxydante et ses propriétés vasorelaxantes. D'après les études précédentes, les flavonols ayant la plus grande activité vasculaire sont la quercétine, qui est la plus abondante dans les fruits et légumes, et le 3', 4'-dihydroxyflavonol (DiOHF), un composé synthétique. Un résumé des actions biologiques des flavonols est présenté dans la Figure 22 (Leo et Woodman, 2015).

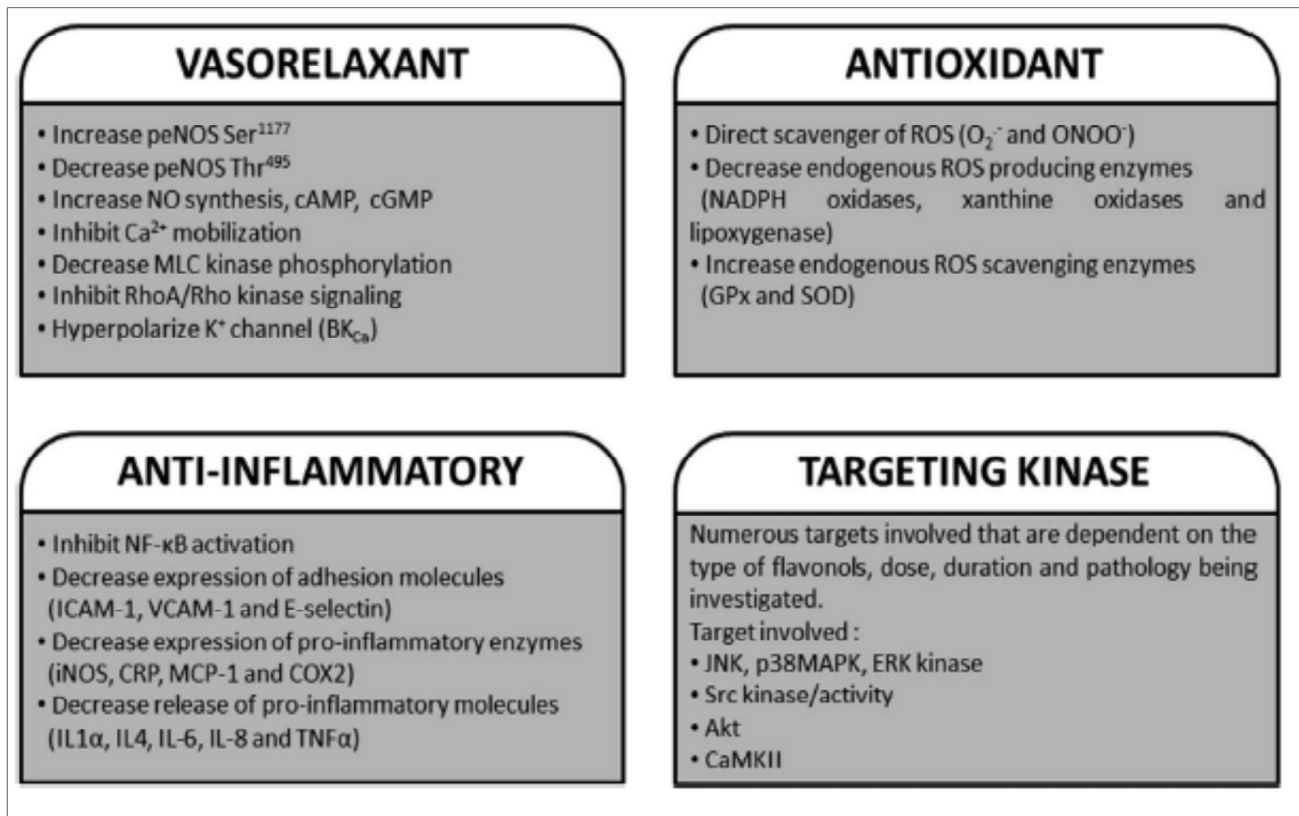


Figure 22 : Résumé des actions biologiques des flavonols (Leo et Woodman, 2015).

✓ Isoflavones

Les isoflavones sont un sous-groupe de phénols végétaux, qui constituent un groupe de métabolites secondaires aromatiques de plantes dérivés de la voie du shikimate et du métabolisme des phénylpropanoïdes. Ces composés sont largement distribués dans toutes les espèces végétales et comprennent le phénol simple, les acides phénoliques, les acides phénylacétiques, les acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide férulique), les coumarines, les stilbènes (par exemple, le resvératrol), les flavonoïdes, les lignanes et les tanins condensés (Medjakovic *et al.*, 2010).

✓ Les flavan-3-ols

Flavan-3-ols, la sous-classe de flavonoïdes la plus complexe chimiquement contient un groupe hydroxyle en position 3 du C-anneau. Ils existent sous des formes monomères, oligomères et polymères et ne sont pas glycosylés dans les aliments. Les monomères les plus simples sont la (+) - catéchine et son isomère (-) - épicatechine, dont l'hydroxylation génère de la (+) gallocatéchine et de la (-) - épigallocatéchine. Le (-) - épicatechine-3-O-gallate et (-) - épigallocatéchine-3-O-gallate (EGCG) sont formés par une estérification supplémentaire avec l'acide gallique en position 3 du cycle C. Les flavan-3-ols se trouvent principalement dans les fruits, les baies, les céréales, les noix, le chocolat, le vin rouge et le thé (Fantini *et al.*, 2015).

✓ Les non-flavonoïdes

• Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des dérivés des acides hydrocinnamique, hydrobenzoïque, phénylacétique et phénylpropionique. Les acides phénoliques existent couramment sous forme d'esters, de glycosides ou d'amides dans la nature, mais pas sous leur forme libre. Le facteur déterminant pour la caractérisation des acides phénoliques est le nombre et l'emplacement des groupes hydroxyles sur le cycle aromatique (Teodoro *et al.*, 2015) (Figure 23).

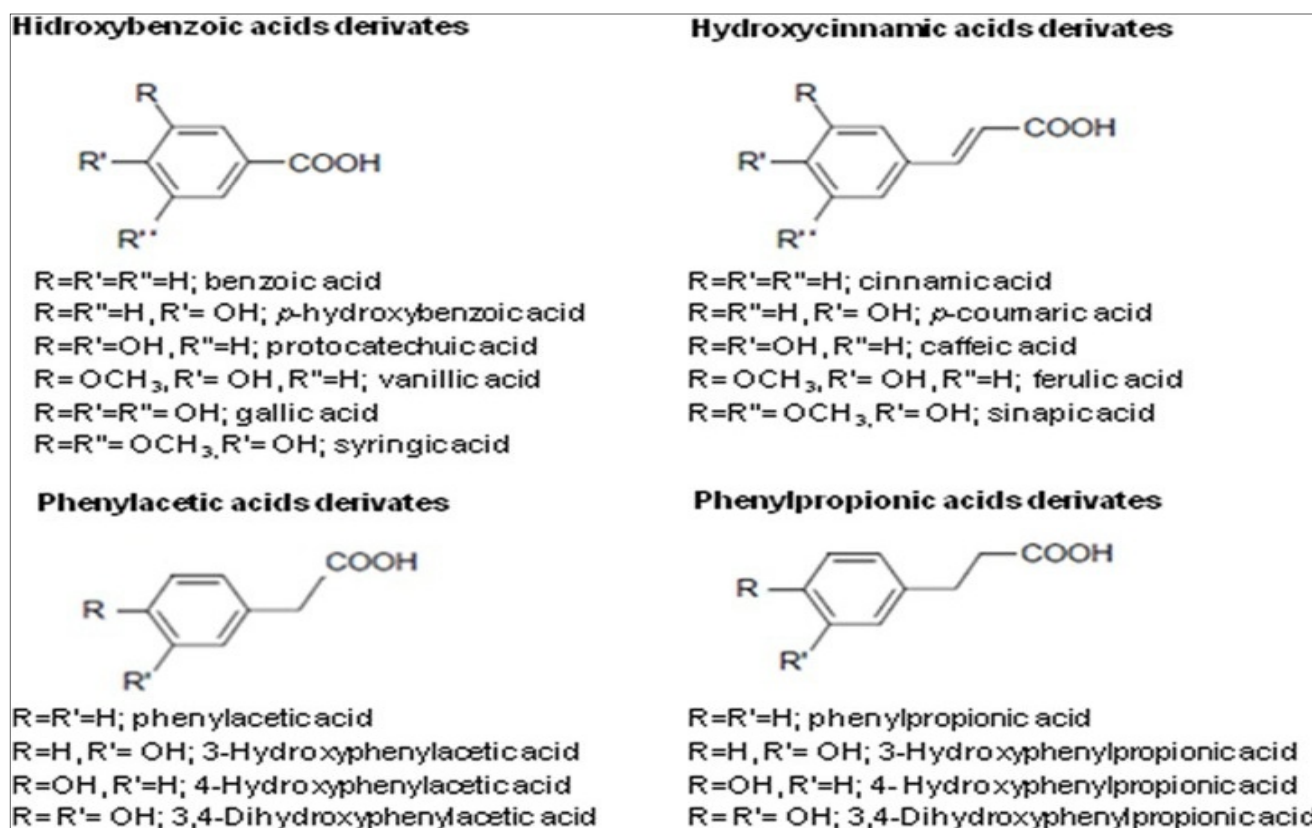


Figure 23 : Structures chimiques générales des acides phénoliques (Teodoro *et al.*, 2015).

✓ Les stilbènes

Les composés de stilbéne font partie d'un vaste groupe de polyphénols de défense naturelle présents dans de nombreuses espèces végétales. Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbéne) est un polyphénol phytoalexine bien connu qui se trouve principalement dans la peau du raisin. Il a attiré une attention scientifique considérable en raison de ses avantages potentiels pour la santé liée à ses propriétés cardiovasculaires, chimiopréventives, anti-obésité, antidiabétiques et neuroprotectrices (Reinisalo *et al.*, 2015).

✓ Les lignanes

Parmi les composés présentant une activité biologique, les composés phénoliques qui présentent un intérêt particulier. Les lignanes, classes très complexes de composés phytochimiques polyphénoliques bioactifs, formés par le couplage de deux résidus d'alcools coniféryliques sont largement distribués dans le règne végétal. Il existe deux types généraux de lignanes : ceux trouvés dans les graines végétales comme le sécoisolaricirésinol diglucoside (SDG), l'isolaricirésinol, le matairesinol, le laricirésinol et ceux trouvés chez les animaux et les humains connus sous le nom de lignanes de mammifères. Les lignanes phénoliques se retrouvent dans la plupart des plantes riches en fibres, y compris les graines de citrouille, les graines de sésame, les céréales telles que le blé, l'orge, le seigle et l'avoine. Les légumineuses telles que les haricots, les lentilles et les fèves de soja ; et des légumes comme l'ail, les asperges, le brocoli et les carottes (Imran *et al.*, 2015).

3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

3.1 La voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques. L'acide shikimique conduit à une transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples. (Ragusa *et al.*, 2017 ; Tsao, 2010).

3.2 La voie de l'acide malonique / l'acétate :

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Fleeger et Flipse, 1964 ; Richter, 1993).

4. Biodisponibilité des polyphénols

Puisque les polyphénols fournissent la plus grande efficacité dans la prévention des maladies, il est essentiel de connaître leur biodisponibilité. La plupart des études portent sur la biodisponibilité liée aux taux de polyphénols présents dans le sang ou l'urine. Mais peu déterminent la biodisponibilité dans les tissus cibles, ce qui peut être plus déterminant pour affirmer leur application à une maladie spécifique. Après hydrolyse intestinale, les polyphénols sont conjugués par glucuronidation (addition d'acide glucuronique), méthylation (addition d'un groupe méthyle), ou sulfurylation (ajout d'un groupe sulfate). Ce qui facilite souvent leur élimination urinaire. Ainsi, ils sont bien absorbés dans

les tissus où ils sont métabolisés (intestin et foie), mais leur biodisponibilité dans les tissus cibles est faible en raison de leur élimination rapide du corps (Amawi *et al.*, 2017 ; Mouhid *et al.*, 2017).

4.1 Le métabolisme des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement consommés sous forme de glycosides avec une proportion de l'aglycone libérée soit dans l'épithélium ou la lumière de l'intestin grêle. Contrairement aux macronutriments alimentaires et aux micronutriments, une grande partie des flavonoïdes ingérés ne sont pas absorbés dans l'intestin proximal et atteignent le côlon où ils sont exposés à l'hydrolyse et à la fermentation du microbiome. Dans l'épithélium, les flavonoïdes subissent un métabolisme de phase I, les métabolites résultants étant transportés dans le foie par la veine porte. Dans le foie, ils subissent d'autres métabolismes de phase I et de phase II qui aboutissent à des composés plus polaires, qui interviennent dans un éventail d'effets biologiques dans les tissus cibles. L'efflux de flavonoïdes du corps se fait par le rein, à partir de l'épithélium intestinal, et par l'excrétion biliaire. Les flavonoïdes sécrétés par la voie biliaire dans le duodénum sont soumis à l'action d'enzymes microbiennes et peuvent être réabsorbés et subir un recyclage entéro-hépatique (Kumar et Pandey, 2013 ; Cassidy et Minihane, 2017) (Figure 24).

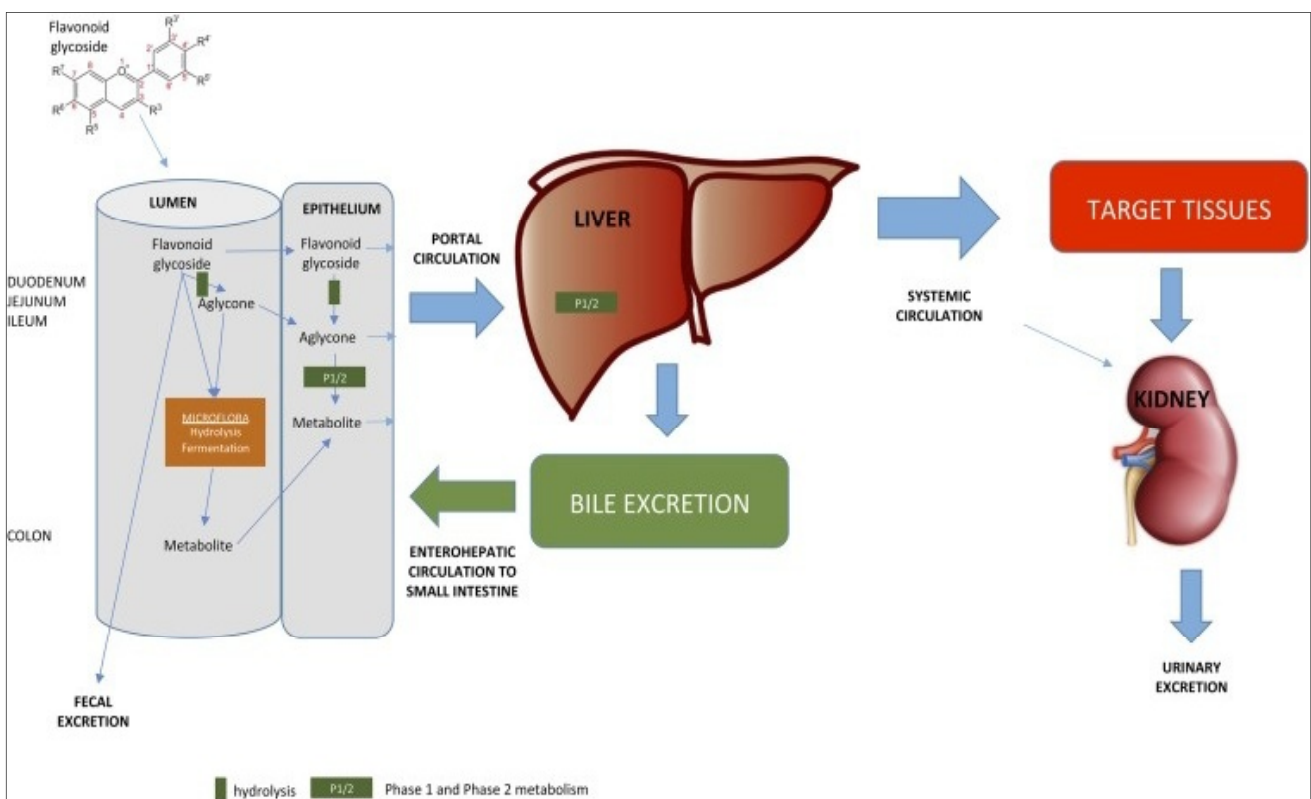


Figure 24 : métabolisme des flavonoïdes (Cassidy et Minihane, 2017).

4.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un grand nombre de propriétés biologiques (Figure 25)

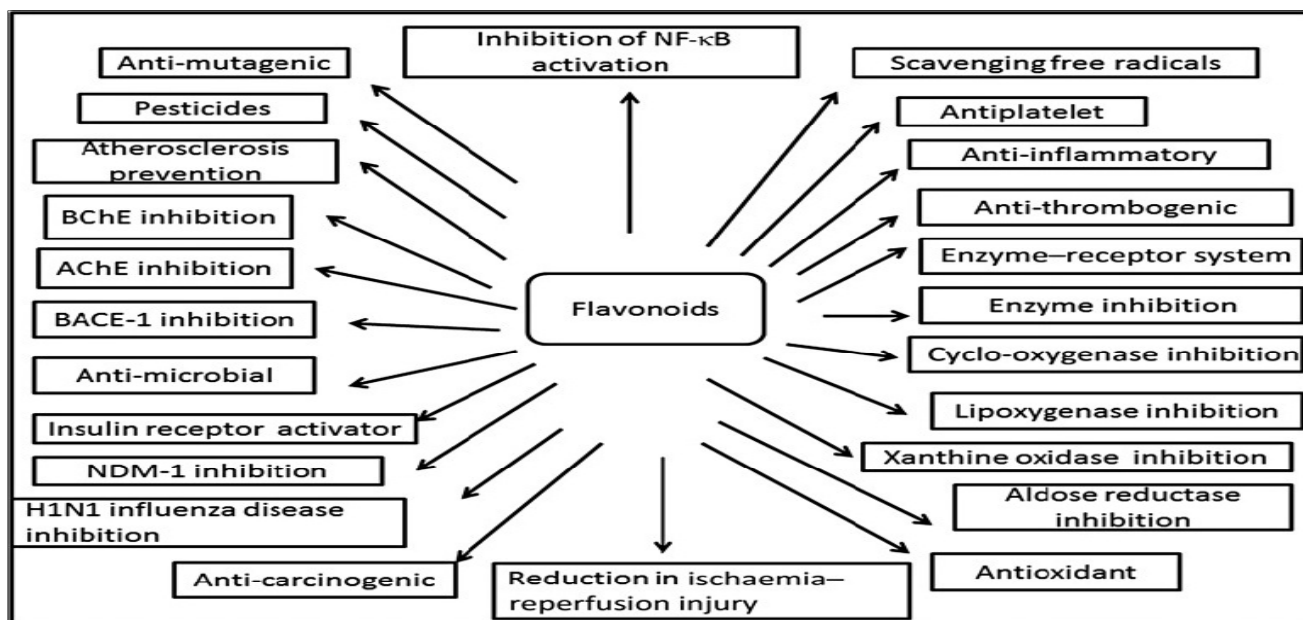


Figure 25 : Les différents rôles des flavonoïdes (Panche *et al.*, 2016)

4.2.1. Activité antioxydante

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont très connus par leur propriété antioxydante. En effet, leur mécanisme d'action antioxydante peut comprendre : la suppression de la formation des ROS, soit par l'inhibition des enzymes, soit par la chélation des éléments traces impliqués dans la génération des radicaux libres. Piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxyde ainsi que l'inhibition des enzymes génératrices des ERO comme la myéloperoxydase (MPO), les NADPH oxydases et la xanthine –oxydase. Ils peuvent aussi stimuler d'autres enzymes qui ont une activité antioxydante dont la catalase et la superoxyde dismutase (Quideau *et al.*, 2011 ; Mishra *et al.*, 2013 ; Kumar Pandey, 2013).

4.2.2. Activité antimicrobienne

Les polyphénols ont également démontré des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales potentielles (Vázquez-Calvo *et al.*, 2017). Ils sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne, tels que la réduction de l'adhésion des ligands hôtes, l'inhibition de la formation de biofilm, la neutralisation des toxines bactériennes et la synergie avec les antibiotiques. Il a été prouvé que les polyphénols avaient une utilisation conjointe avec des antibiotiques afin de potentialiser leur efficacité, de réduire la dose d'antibiotique et, par conséquent, de réduire les réactions indésirables aux antibiotiques (Daglia, 2012).

4.2.3. Activité anticancéreuse

Les polyphénols pourraient jouer un rôle très important dans le traitement. Les effets anticancéreux des polyphénols ont été observés au niveau de la bouche, de l'estomac, du duodénum, du côlon, du

foie, du poumon, de la glande mammaire ou de la peau. De nombreux polyphénols, tels que les proanthocyanidines, les flavonoïdes, le resvératrol, les tanins, l'épigallocatechine-3-gallate, l'acide gallique et l'anthocyanine, ont été testés. Tous ont montré des effets protecteurs dans certains modèles, bien que leurs mécanismes d'action aient été différents (Li *et al.*, 2014).

Les polyphénols peuvent exercer leurs effets anticancéreux par divers mécanismes, notamment l'élimination des agents cancérigènes, la modulation de la signalisation des cellules cancéreuses, la progression du cycle cellulaire, la promotion de l'apoptose, et la modulation des activités enzymatiques (Vauzour *et al.*, 2010) : Par exemple, l'augmentation de la glutathion peroxydase, de la catalase, de la NADPH-quinone oxydoréductase, de la glutathion S-transférase et / ou de l'activité enzymatique du cytochrome P450 par les polyphénols, ce qui peut aider la détoxification des agents cancérigènes (Khan *et al.*, 1992). En outre, ils peuvent moduler l'activité des voies de signalisation (c'est-à-dire MAPK kinase et phosphatidyl inositide 3 kinase (PI3 Kinase)), qui sont impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses (Dhillon *et al.*, 2007 ; Hopfner *et al.*, 2008 ; Ramos, 2008).

4.2.4. Activité neuroprotectrice

L'apport alimentaire de polyphénols est connu pour atténuer le stress oxydatif et réduire le risque de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, les accidents vasculaires cérébraux, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. Les polyphénols présentent un fort potentiel pour traiter l'étiologie des troubles neurologiques car ils atténuent leur physiologie complexe en modulant plusieurs cibles thérapeutiques à la fois (Bhullar et Vasantha, 2013).

Plusieurs mécanismes d'action neuroprotecteurs ont été proposés, suggérant que les polyphénols exercent leurs activités en réduisant la production et l'accumulation des ROS, dont l'accumulation est susceptible de jouer un rôle pathologique crucial dans le vieillissement cérébral, réduisant le stress oxydatif et modulant l'activité intracellulaire des molécules de transduction de signal (Basli *et al.*, 2012).

4.2.5. Activité hépatoprotectrice

Les polyphénols présentent des effets hépatoprotecteurs importants car ils réduisent l'accumulation de graisse hépatique, principalement en réduisant la lipogenèse et en diminuant l'oxydation des acides gras, en diminuant le stress oxydatif et l'inflammation ainsi que les principaux facteurs responsables des lésions hépatiques (Aguirre *et al.*, 2014).

Il a été rapporté que les flavonoïdes à une gamme de concentrations de 1-100 µg/mL ont amélioré la viabilité cellulaire et inhibé la fuite cellulaire de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine aminotransférase (ALT) hépatocytaires causées par un le CCl₄. De même, dans une expérience in

vivo, des flavonoïdes à des doses orales de 50, 100 et 200 mg/kg ont significativement réduit les niveaux d'AST, d'ALT, de protéines totales et d'albumine dans le sérum et les taux d'hydroxyproline et d'acide sialique dans le foie. Les examens histopathologiques ont également révélé une amélioration du foie endommagé suite au traitement par les flavonoïdes (Wu *et al.*, 2006 ;Kumar et Abhay, 2013). La Silymarine à des applications cliniques dans le traitement de la cirrhose, des dommages ischémiques, et de l'hépatite toxique induites par de diverses toxines comme acétaminophen, et les champignons toxiques (Saller *et al.*, 2001).

4.2.6. Activité néphroprotectrice :

La protection du rein par les polyphénols a également été rapportée. Cet effet rénoprotecteur a pu être observé beaucoup plus souvent chez les humains ayant une consommation chronique de vin rouge (Rodrigo *et al.*, 2001 ; Rodrigo et Bosco, 2006).

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), un composant purifié et actif du thé vert a été rapportés dans diverses maladies rénales aiguës et chroniques, notamment la néphropathie obstructive (Zhou *et al.*, 2013), la néphrotoxicité du cis platine (Sahin *et al.*, 2010 ;Pan *et al.*, 2015) la lésion rénale de l'ischémie-reperfusion (Kakuta *et al.*, 2011), les lésions rénales induites par la circulation extracorporelle (Twal *et al.*, 2013), néphropathie diabétique (Ribaldo *et al.*, 2009 ;Yoon *et al.*, 2014) néphrite lupique (Tsai *et al.*, 2011) et glomérulonéphrite chronique (Peng *et al.*, 2011).

Il réduit significativement le stress oxydatif et l'inflammation dans le rein, attesté par la réduction du taux de MDA, l'augmentation de l'activité SOD, et la réduction de l'activité MPO en récupérant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, empêchant la peroxydation des lipides, la carbonylation des protéines et rétablissant ainsi le sérum altéré et les marqueurs rénaux urinaires (Thangapandiyan et Miltonprabu, 2014 ; Gao *et al.*, 2016).

5. Aperçu bibliographique sur la plante *Centaurea sphaerocephala*

5.1 Introduction

L'Algérie, avec ses milliers d'hectares de forêt et de pâturage, regorge de plantes condimentaires et médicinales qui sont encore méconnues et exploitées de façon artisanale. En effet, l'utilisation des plantes médicinales et aromatiques pour l'industrie cosmétique et pharmaceutique, ainsi que pour la production alimentaire, reste un domaine vierge en Algérie (Miara *et al.*, 2013).

Pour cela, nous espérons apporter de nouvelles données pour la phytothérapie en Algérie et la valorisation des composés bioactifs issus des plantes parmi ces derniers : *Centaurea sphaerocephala*. *Centaurea* L. (nom commun : knapweed) est un genre botanique appartenant à la famille des Asteraceae qui contient plus de 600 espèces,45 d'entre eux se développent spontanément en Algérie,

avec 7 espèces localisées dans la région du Sahara (Ozenda,1958 ; Quezel et Santa, 1963 ;Korga *et al.*, 2017).

5.2 Description botanique de la plante

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles, ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour tous les composés, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule, entourées d'un involucre de bractées. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toute tubulées, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelque espèce à fleurs jaunes. L'involucre est composé de bractées inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuse (Bensouna, 2014).

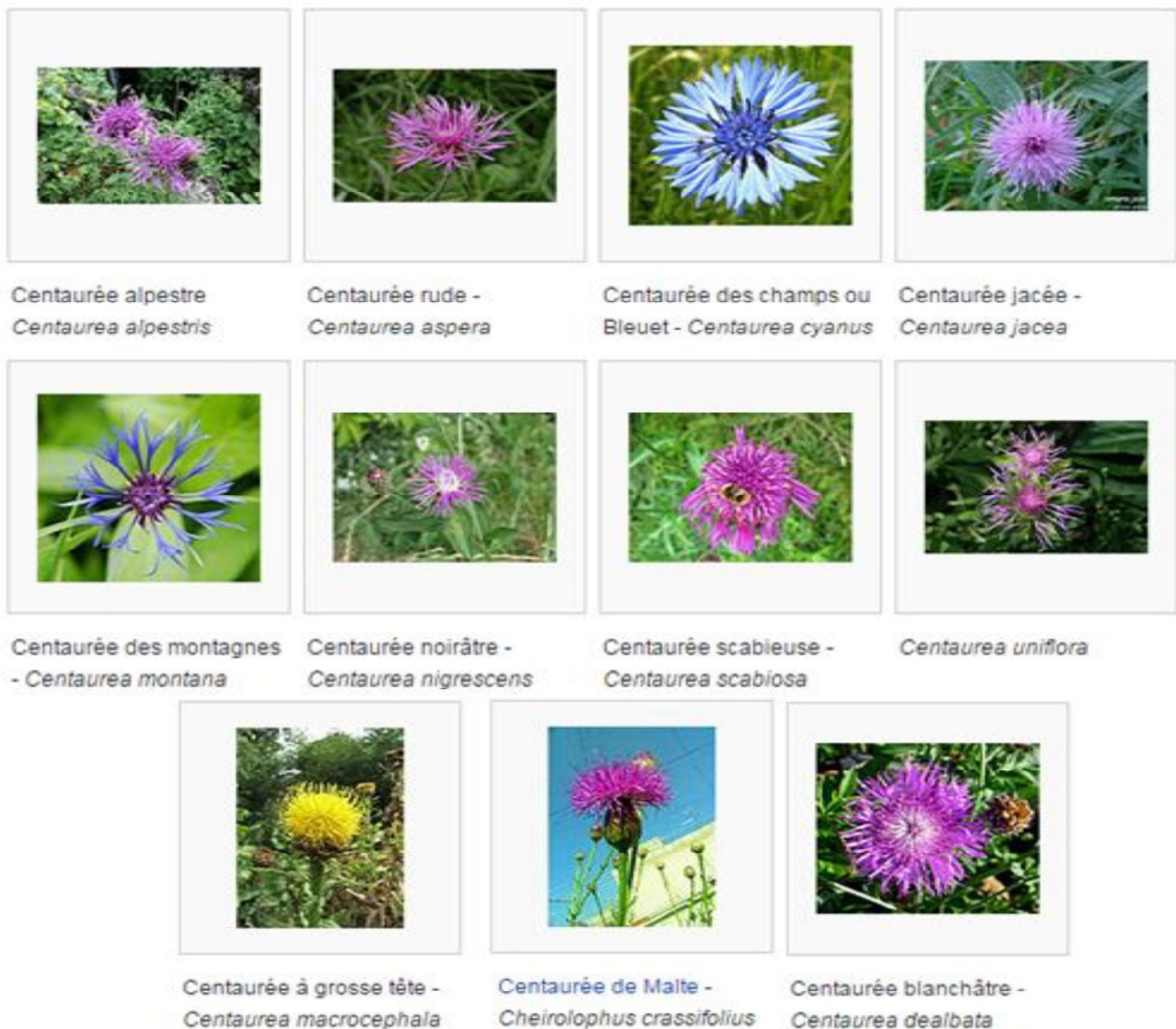


Figure 26 : Quelques espèces de genre *Centaurea* (Asteraceae) (Azzouzi, 2017).

5.3 L'espèce *Centaurea sphaerocephala*

C'est une plante d'environ 25 à 50 cm de hauteur. Plante vivace, ascendante jusqu'à la verticale. Les feuilles sont très polymorphes avec une certaine pilosité, la pointe épineuse, les inférieures, jusqu'à 8 cm de long, avec des lobes pointus grossièrement dentées. Feuilles supérieures dentelées à marges pleines, plus ou moins semi-contreventées. Les fleurs se sont réunies en petits groupes dans des têtes solitaires aux extrémités des tiges. Involucre jusqu'à 3,5 cm de large. Les échelles envahissent les ombellations avec 5 à 13 épines brunes tirant vers le rouge, retournées. Toutes les fleurs tubulaires de 5 lancinaient, jusqu'à 1,5 cm de long, pourpre, les externes sont stériles et élargies, les inférieures sont plus petites et plus fertiles. Fruit atteignant 4,5 mm de long, couronne de poils ciliés, absente des akènes les plus externes (Bayer *et al.*, 1989).



Figure 27 : *Centaurea sphaerocephala*

https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Centaurea_sphaerocephala&oldid

5.3.1 Classification botanique de la plante

Tableau 3 : Classification systématique de la plante *Centaurea sphaerocephala*

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dictotylédones
Ordre	Asterales
Famille	Composées
Sous-famille	Tubiflores

Tribu	Cynarées
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>Centaurea sphaerocephala</i>

5.3.2 Principaux métabolites secondaires isolés de la plante *Centaurea sphaerocephala*

Des études antérieures sur cette espèce et/ou sous-espèce ont conduit à l'isolement de flavonoïdes d'aglycones de type chrysoeriol et apigénine, de flavonoïdes glucosides de type chrysoeriol 7-O- β -glucoside. Ces études ont également permis l'isolement de lactones sesquiterpéniques de types germacranolide et elemadienolide, de lignanes de type matairesinol, arctigénine, arctiin, deux sesquilignans de type lappaol A et un isomère stéréo- ou structurel de lappaol A, et un nouveau dithiénylacétylène. La composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce a également été rapportée notons que la fraction des acides gras et des hydrocarbures était dominante dont l'acide hexadécanoïque était le principal composant de l'huile de *C. sphaerocephala* (Geppert *et al.*, 1983 ; Bastos *et al.*, 1990 ; Bruno *et al.*, 1994 ; Senatore *et al.*, 2006 ; Bentamene *et al.*, 2008 ; Bentamene *et al.*, 2010).

5.3.3 Utilisation en médecine traditionnelle

Dans la littérature, plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont référencées pour leur large utilisation en médecine traditionnelle dans de nombreux pays. Par exemple :

En Turquie, des fleurs séchées de *Centaurea cyanus* sont utilisées comme infusion pour soulager la diarrhée, gagner de l'énergie et augmenter l'appétit ; l'infusion de *Centaurea calcitrapa* est utilisée comme fébrifuge ; *Centaurea jacea* est utilisé pour réduire la fièvre, pour réguler le cycle menstruel, pour soulager la constipation et augmenter l'appétit (Baytop, 1999 ; Arif *et al.*, 2004). En Tunisie, *Centaurea furfuracea*, une espèce endémique de la région désertique du Nord de l'Afrique (Alapetite, 1981), est utilisée comme astringent et diurétique (Fakhfakh, 2007). Alors qu'en Algérie, les racines de *Centaurea incana* sont utilisées dans la région d'Aurès pour le traitement des maladies du foie (Aclinou *et al.*, 1982).

5.3.4 Intérêts biologiques du genre *Centaurea* et de ses principaux métabolites secondaires

Récemment plusieurs espèces du genre *Centaurea* font le sujet d'une large investigation phytochimiques en raison de leur richesse en métabolites secondaires connues pour leurs diverses activités biologiques, on cite à titre d'exemples : les flavonoïdes, les lignanes, l'acétylène, les sesquiterpènes lactones. Ces derniers sont les substances les plus fréquentes chez les espèces du genre

Centaurea, caractérisées par des activités biologiques très importantes : anti inflammatoire, anti tumeur, cytotoxique, antimicrobienne, hypothermique, antifongiques, antiplasmodiales, cytogénétiques, antiulcérogènes, antioxydantes, antivirales, anti protozoaires. Ces activités sont accentuées par la présence du groupe α -méthylène- γ -lactone qui leur confère une activité 10 à 100 fois plus importante que celles où la double liaison C-11 – C-13 est réduite. Ces activités sont également accentuées dans le cas des lactones sesquiterpéniques possédant un cyclopentyle, si ce cycle comporte un atome de chlore. Les lactones sesquiterpéniques qui n'en possèdent pas sont 10 à 20 fois moins actives (Bicha, 2011 ;Albayra *et al.*, 2017 ;). La richesse en métabolites secondaires de ce genre nous a incités à entreprendre l'investigation phytochimiques de l'espèce *Centaurea sphaerocephala*.

Deuxième Partie :
Partie Expérimentale
In vitro et In vivo

I. Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Centaurea sphaerocephala* ont été collectées dans la région d'El Kala, Algérie (21 m, 36 ° 53 '44 "N, 8 ° 26' 35" E) en mai 2012 et identifiées sur la base de Quezel et Santa (1963) par le Professeur M. Kaabache, spécialiste de l'identification des espèces algériennes de Centaurées (Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie). Un spécimen de référence (CSA0512-EK-ALG-65) a été déposé dans l'Herbarium de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1.

2. Préparation des extraits

Les feuilles et les fleurs (2000 g) de *C. sphaerocephala* ont été macérées pendant 24 h, trois fois avec du méthanol-eau (70 :30, v / v) à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré sous vide (jusqu'à 35 ° C), la solution restante (400 ml) a été dissoute dans de l'eau distillée (800 ml) sous agitation magnétique et maintenue à 4 °C pendant une nuit pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, la solution résultante a été extraite successivement avec du chloroforme (CHCl₃), de l'acétate d'éthyle (EtOAc) et du *n*-butanol (*n*-BuOH). Les solutions organiques ont été séchées avec du sulfate de sodium (Na₂SO₄), filtrées en utilisant un papier filtre commun et concentrées sous vide (jusqu'à 35 °C) pour obtenir les extraits suivants : CHCl₃ (5 g), EtOAc (4,94 g) et *n*-BuOH (34 g) (Figures 28).

L'extraction a été réalisée par Mme Bouchehem Ratiba, doctorante en chimie.

Etude expérimentale in vitro et in vivo

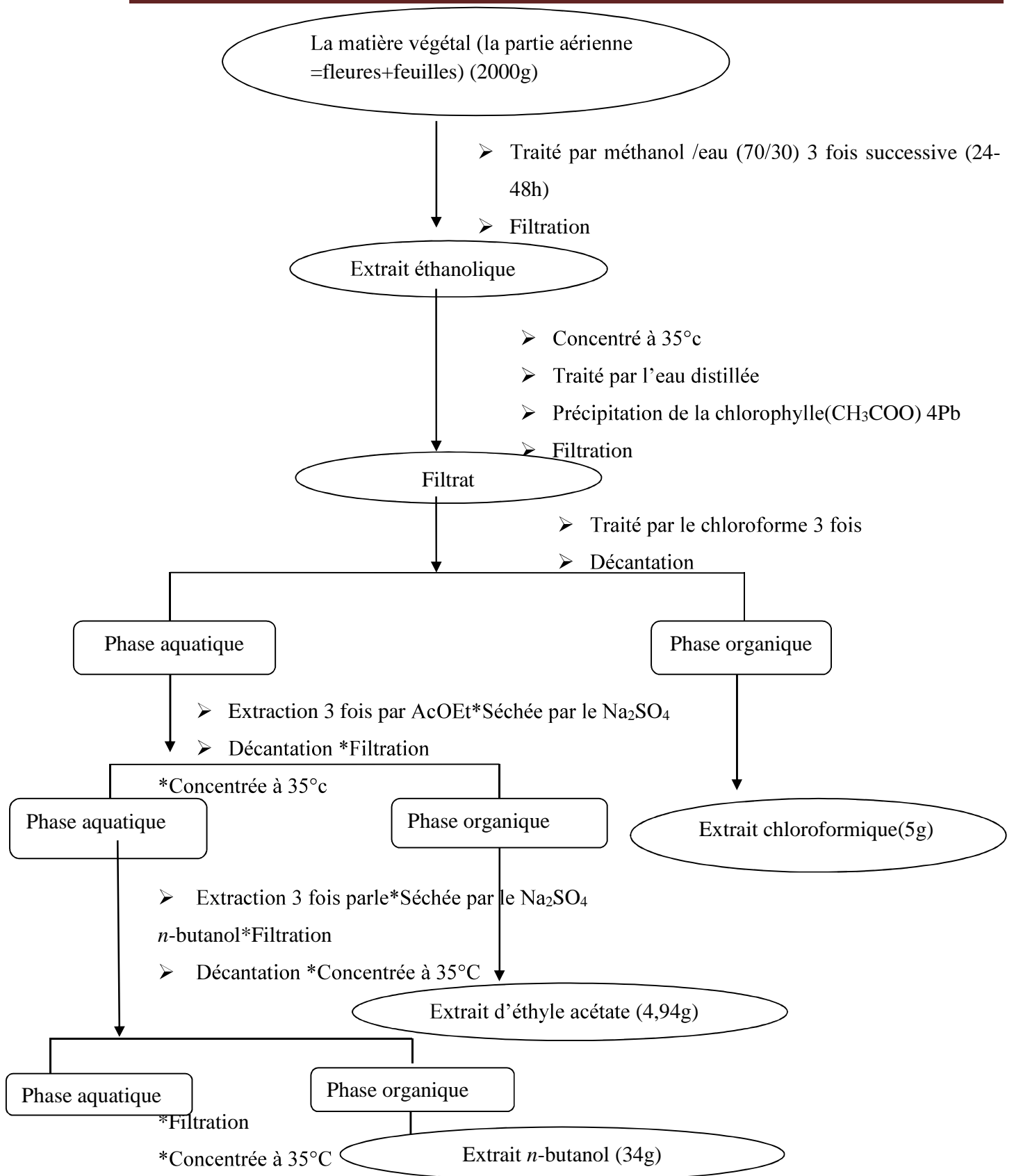


Figure 28 : Protocol d'extraction de la plante *Centaurea sphaerocephala*.

3. Etude phyto-chimique

3.1. Détermination des polyphénols dans les deux extraits

La teneur totale en phénols dans les extraits butanoliques et éthyle acétate de la plante *C. sphaerocephala* a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton *et al.*, (1999). Les extraits sont solubilisés dans le méthanol (MeOH) à une concentration de 1mg/mL. A chaque 20 µl des solutions d'extraits préparés, 100 µl de Folin-Ciocalteu et 1580 µl d'eau distillée ont été ajoutés successivement. Trois minutes plus tard, on ajoute 300 µl de carbonate de sodium (20%). Après 2h à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzu, Kyoto, Japan). La concentration des composés phénoliques totaux a été déterminée en µg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante.

$$\text{Absorbance} = 0.001 \times [\text{acide gallique}]$$

3.2. Détermination de la teneur totale des deux extraits en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes dans les deux extraits *n*-butanol et éthyle acétate de la plante *C. sphaerocephala* a été déterminée selon la méthode de (Ordonez *et al.*, 2006). A chaque 0.5 ml des extraits préparés dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml, 0.5 ml d'AlCl₃ à 2% a été ajouté. Après 1 h d'incubation à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. La concentration des flavonoïdes a été déterminée en µg d'équivalent de quercétine (QE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante.

$$\text{Absorbance} = 0.034 \times [\text{quercétine } (\mu\text{g})] + 0.015$$

3.3. Evaluation du pouvoir antiradicalaire (DPPH)

La capacité des deux extraits (*n*-butanol et d'éthyle acétate de la plante *C. sphaerocephala* à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été évaluée par la méthode de Braca *et al.*, (2001). Le DPPH, la vitamine C et les deux extraits sont préparés préalablement dans le méthanol. Ensuite, 3 ml de solution de DPPH (0.004%) a été ajouté à des concentrations croissantes d'extraits ou de la vitamine C préparés dans le méthanol. Les essais ont été effectués en triple. Puis les tubes ont été incubés dans l'obscurité et à une température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été ensuite mesurée à 517 nm. La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'activité de piégeage de DPPH (I %) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

A₀ : Absorbance de la solution de DPPH seule

A₁ : Absorbance de la solution de DPPH + l'extrait ou de la vitamine C.

Etude expérimentale in vitro et in vivo

Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) des deux extraits et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I %) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

3.4. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La capacité de l'extrait de la plante à inhiber la peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage de la concentration du MDA, qui résulte de la peroxydation lipidique suivant la méthode de (Banerjee *et al.*, 2005). Cette méthode est basée sur la réaction de jaune d'œuf et l'acide thiobarbiturique. A 0.5 ml d'homogénat de vitellus d'œuf à 10%, 50 µl de FeSO₄ (0.07 M) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé ensuite avec des concentrations croissantes de l'extrait ou de la vitamine C à 37 °C pendant une heure.

Après incubation, on ajoute successivement 1 ml de TCA 20% (acide trichloracétique) et 1.5 ml de TBA 1% (acide thiobarbiturique). Les échantillons ont été mélangés puis incubés pendant 15 minutes à 95°C.

Après centrifugation des échantillons, les substances réactives thiobarbituriques résultantes (TBARS) ont été mesurées dans le surnageant à 532 nm.

La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (I %) a été calculé en utilisant l'équation suivante

$$I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

A₀ est l'absorbance de témoin (sans l'extrait ou vitamine C) et A₁ est l'absorbance de l'échantillon + de l'extrait ou de la vitamine C.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) de l'extrait de la plante et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (I %) en fonction des concentrations croissantes de l'extrait et de la vitamine C.

3.5. Etude de l'effet des extraits des plantes sur des lignes cellulaires cancéreuses *in vitro*

L'activité anticancéreuse de l'extrait *n*-butanol a été évaluée sur des lignes cellulaires HeLa (human cervix carcinoma). Cette activité a été évaluée par l'analyseur de cellules en temps réel xCELLigence (RTCA) dans les laboratoires Plant Research à l'université de Çankiri en Turquie.

Etude expérimentale in vitro et in vivo

✓ **Culture des cellules et préparation de la suspension cellulaire**

Les lignes cellulaires HeLa (human cervix carcinoma) ont été cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ dans un milieu d'aigle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma), supplémenté avec 10% du sérum fœtal bovin (FBS) (Sigma, Allemagne) et 2% d'une solution pénicilline/streptomycine (Sigma, Allemagne) dans des boîtes de Pétri pour culture cellulaire, stériles. Toutes les cellules ont été soumises à des passages par trypsinization lorsqu'elles atteignent 70-80% de confluence.

Lors de l'expérience, les cellules HeLa ont été détachées du fond des boites de culture par 10 ml d'une solution de trypsine-EDTA. Après le détachement des cellules, la trypsinization est arrêtée par 10 ml de milieu de culture et mélangée soigneusement. Les suspensions ont été transférées dans deux tubes coniques et placés dans la centrifugeuse. Le surnageant est aspiré par vacuum et les cellules qui restent au fond des tubes sont diluées dans 4 ml de milieu. La concentration cellulaire de chaque suspension obtenue a été mesurée par CEDEX HiRes compteur des cellules qui utilise le bleu de Trypan.

✓ **Préparation de l'extrait**

L'extrait est préparé dans le diméthylfoxyde (DMSO) à une concentration de 20mg/ml puis stockés à 4°C dans l'obscurité.

✓ **Traitement des cellules par l'extrait et mesure de la prolifération cellulaire**

Avant de commencer la manipulation, la hotte de culture cellulaire ainsi que les matériels qui y seront utilisés dedans doivent être stérilisés par de l'éthanol à 70% pour éviter la contamination.

Une plaque de 96 puits stériles a été utilisée. Premièrement on a ajouté 50 µl du milieu de culture DMEM dans tous les puits de la plaque et on la laissée dans la hotte pendant 15 minutes, puis dans l'incubateur à CO₂ pendant 15 minutes supplémentaires. Après ce temps, une mesure de nombre des cellules a été effectuée pour confirmer que le milieu nutritionnel n'est pas contaminé par des cellules. Ensuite, on a ajouté 100 µl de la suspension cellulaire (2.5 x 10⁴ cellules/100 µl) dans tous les puits de la plaque à l'exception les trois derniers qui seront utilisés comme contrôle négative (contiennent du milieu de culture sans cellules). La plaque est laissée dans la hotte pendant 30min. Ensuite, la plaque a été insérée dans l'instrument xCELLigence dans l'incubateur à CO₂ et une mesure a été effectuée pendant 80 min. (Abay *et al.*, 2015). Après, 50-20 et 10µl de la solution d'extrait (dissoudre au DMSO) sont ajoutés dans les puits respectivement pour les doses 250-100 et 50µg/mL. A la fin, le volume final a été complété dans les puits à 200 µl avec du milieu de culture DMEM. Trois puits avec des cellules HeLa non traitées, utilisées comme contrôle positif.

Etude expérimentale in vitro et in vivo

La plaque a été insérée ensuite dans l'instrument xCELLigence dans l'incubateur pendant 51 h. La prolifération des cellules en présence et en absence de l'extrait est mesurée par xCELLigence durant toutes les 51 h et suivi à l'aide d'un ordinateur lié à l'instrument.

3.6. Inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN

Le pouvoir de l'extrait butanolique à inhiber les dommages oxydatifs de l'ADN a été testé dans le laboratoire Plant Research à l'université de Çankiri Karatekin en Turquie, utilisant un ADN plasmidique photolysé par rayonnement UV en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Russo *et al.*, 2001).

Dans la première étape, un ADN plasmidique 46966 a été extrait des bactéries *Escherichia coli*. Ensuite des aliquotes de 1µl de plasmides 46966 (200 µg/ml) ont été mis dans deux groupes de microtubes eppendorf. Dans le premier groupe, on a ajouté séparément 50µg de l'extrait *n*-butanol suivi par 4µl de H₂O₂ à 3% et dans le deuxième groupe on a ajouté seulement 4µl de H₂O₂ à 3% et ce groupe est servi comme contrôle irradié (CR).

Tous les microtubes eppendorf sont ensuite placés directement sur la surface d'un transilluminateur UV (300 nm) pendant 10 min à température ambiante. Un aliquote de 1µl de plasmides 46966 a été mis dans un autre microtube eppendorf et laissé sur paillasse pour servir comme contrôle non irradié (C0).

La séparation d'ADN a été réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Tous les échantillons ont été soumis dans les puits du gel d'agarose par ordre. Les échantillons de contrôle non irradié (C0) et de contrôle irradié (CR) sont placés respectivement dans les premiers puits. Après la migration, le gel d'agarose est photographié au moyen d'un système d'imagerie au gel de Lourmat (Vilber).

4. Expérimentations animales Etude *in vivo*

4.1. Effet préventif de *C. sphaerocephala* sur la toxicité induite par l'acide valproïque (300mg/kg)

Dans cette étude, les rats males de la souche *Wistar Albinos* (Institut Pasteur, Alger) pesant entre (200-250g) sont utilisés. Dès leurs réceptions, les rats sont divisés en groupe de 7 rats dans des cages standards pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans des différentes expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger). Ils sont maintenus dans une animalerie à une température constante à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Ces expériences ont toujours lieu de 8h à 10h du matin.

Etude expérimentale in vitro et in vivo

Cette étude a pour but d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *Centaurea sphaerocephala* vis-à-vis d'une toxicité induite par le VPA, sur les rats durant une période de 14 jours. Les rats sont répartis en huit groupes de 7 rats chacun comme suit :

Groupe témoin : non traité.

Groupe Vit E : reçoit la vitamine E par gavage à la dose 100mg /kg pendant 14jours.

Groupe Ext .50mg/kg : reçoit l'extrait par gavage à la dose 50mg/kg pendant 14 jours.

Groupe Ext .100mg/kg : reçoit l'extrait par gavage à la dose 100mg/kg pendant 14 jours.

Groupe VPA : reçoit le médicament par gavage à la dose (300mg/kg) pendant 14 jours.

Groupe VPA-Ext.50mg/kg : traités avec l'extrait par gavage à la dose 50mg/kg et le VPA par gavage à la dose 300mg/kg pendant 14 jours.

Groupe VPA-Ext .100mg/kg : traités avec l'extrait par gavage à la dose 100mg/kg et le VPA par gavage à 300mg/kg pendant 14jours.

Groupe VPA-Vit E : traité par la Vitamine E par gavage à la dose 100mg/kg et le VPA par gavage à la dose 300mg /kg pendant 14 jours.

4.2. Prélèvement du sang et des organes

Après les différents traitements, les rats sont décapités par dislocation cervicale et la collecte du sang s'effectue à partir de la veine porte dans des tubes héparines ou secs, puis centrifugée pour récupérer le plasma ou sérum. Les activités enzymatiques des transaminases (qui sont des biomarqueurs de la fonction hépatique), le cholestérol, triglycérides ainsi que la glycémie sont mesurées. Aussi bien les biomarqueurs de la fonction rénale (la créatinine) ont été estimé. Les paramètres cités précédemment sont déterminés par des méthodes colorimétriques en utilisant des Kits commerciale (Spinreact, Espagne).

4.3. Préparation d'homogénat et de cytosol

Après le sacrifice des rats, une perfusion aura lieu avec une solution froide de KCL (1.15%) afin de drainer tout le sang restant dans les organes. En suite les organes sont coupés en petits morceaux, pesés, homogénéisés pour doser l'MDA, le GSH et l'activité enzymatique de GPx. L'homogénat est centrifugé 4°C pour obtenir le surnageant qui sera utilisé comme une source de CAT. Le dosage des protéines dans les fractions cytosoliques est réalisé par la méthode de Lowry (1951).

4.4. Evaluation biochimique et mesure des paramètres de stress

4.4.1. Dosage d'AST et d'ALT :

Le dosage des indicateurs de la fonction hépatique AST et ALT est réalisé selon la méthode de (Bergmeyer *et al.*, 1987).

4.4.2. Dosage de cholestérol

Le dosage du cholestérol est réalisé selon la méthode de (Naito, 1984). Ce dosage est basé sur la transformation des esters de cholestérol au cholestérol libre, ensuite leur oxydation donne la naissance de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui réagit avec le phénol et le 4-Aminophénazone dont la présence de l'enzyme de peroxydase pour donner un composant de couleur rose. Leur densité augmente proportionnellement avec la concentration de cholestérol dans l'échantillon à 505 nm.

4.4.3. Les triglycérides

Le dosage des triglycérides est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne) et selon la méthode enzymatique et colorimétrique de (Fossati et principe, 1982). Les triglycérides incubés avec de la lipoprotéine lipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par la glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par le GPO. A la fin, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) réagit avec du 4-aminophénazone (4-AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon à 505 nm.

4.4.4. Dosage de la créatinine

La créatinine est dosée selon la méthode de (Spierto *et al.*, 1979) dans un milieu basique, en utilisant l'acide picrique qui va réagir avec la créatinine pour former un complexe coloré, sa densité lue à 510 nm.

4.4.5. Dosage de la glycémie

Le dosage de la glycémie est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne). La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation de glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit se détecte avec un accepteur chromogène d'oxygène, phénol, 4-aminophénazone (4-AF), en présence de la peroxydase (POD). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans l'échantillon.

Un volume de 10 μ l de plasma est mélangé avec 1 ml de réactif (TRIS pH 7.4, phénol, glucose oxydase, peroxydase, 4 – aminophénazone). Le blanc est constitué de 1 ml de réactif et le standard

Etude expérimentale *in vitro* et *in vivo*

est préparé par 10 μ l de la solution étalon de glucose et 1 ml de réactif. Après 10min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 505 nm.

4.4.6. Dosage du MDA au niveau d'homogénat

La peroxydation lipidique est estimée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de (Uchiyama et Mihara, 1978). L'MDA est l'un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) par les radicaux libres libérés au cours de stress. En milieu acide et chaud (100°C) une molécule d'MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) pour former un complexe coloré en rose. Le principe de cette méthode est résumé dans la figure ci-dessus (Figure 29)

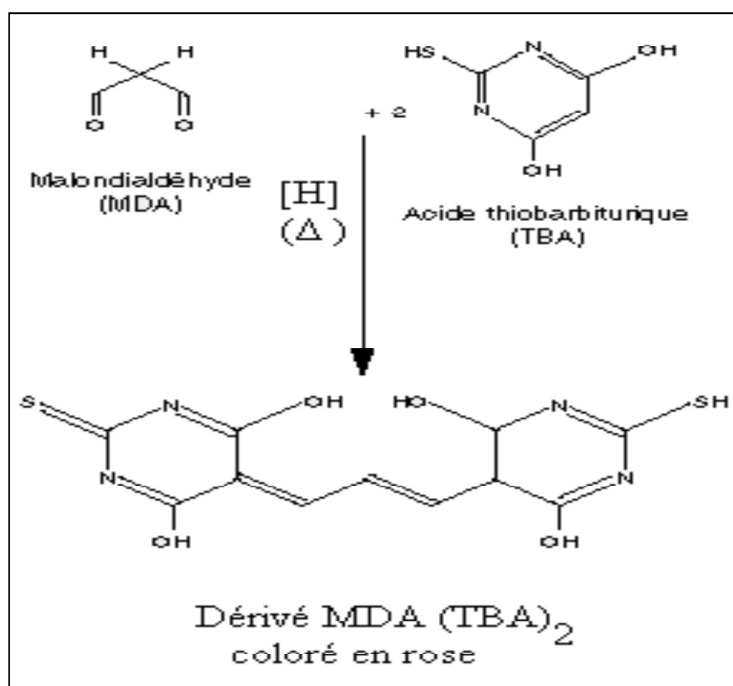


Figure 29 : Principe de dosage du Malondialdéhyde.

La densité optique du complexe formé entre le MDA de l'échantillon et le TBA est mesurée à 532 nm et la concentration du MDA est exprimée nmol/g tissu.

4.4.7. Dosage de glutathion (GSH)

Le dosage du GSH est réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Son principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5,5'-Dithiobis2-nitrobenzoïque (DTNB), libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante (Figure 30) :

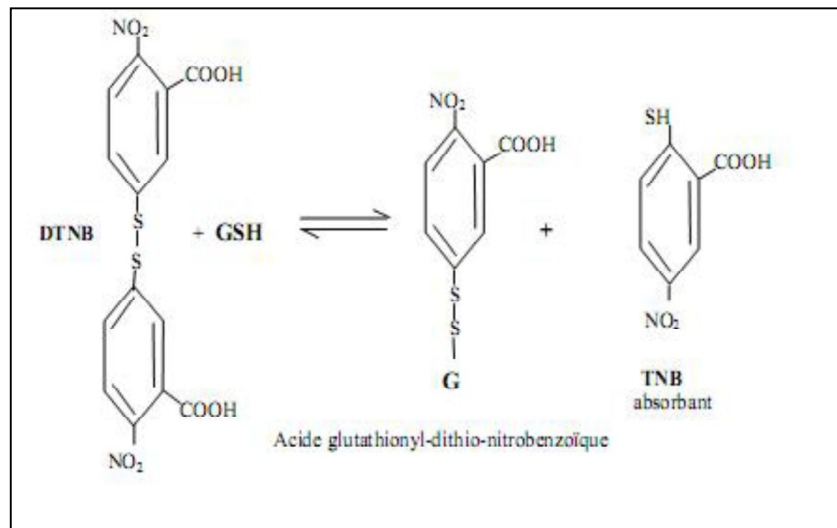


Figure 30 : Principe du dosage de glutathion.

Les concentrations sont exprimées en nmol/g tissu.

4.4.8. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

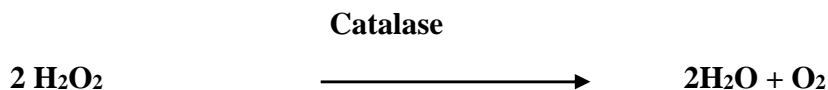
L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence du-GPx selon la réaction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



La densité optique a été mesurée à 412 nm et l'activité GPx a été exprimée en μmol GSH/mg protéine).

4.4.9. Evaluation de l'activité enzymatique du catalase (CAT)

L'activité de la catalase a été estimée selon la méthode de Claiborne, (1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) du fait de l'activité de la catalase présente dans l'échantillon selon la réaction suivante :



Un volume de 25 μl de cytosol a été mélangé avec 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 975 μl du peroxyde d'hydrogène (0.019 M). La densité optique a été mesurée trois fois successive chaque 60 secondes à 240 nm. L'activité de la catalase a été exprimée en unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon l'équation suivante :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2) / \text{g de protéine}$$

A1 : Absorbance à la première minute.

Etude expérimentale in vitro et in vivo

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

La concentration cytosolique des protéines est évaluée par la méthode de Lowry (1951). Sous les mêmes conditions, une gamme étalon est établie en utilisant (0 à 0,5 mg) de protéine avec le sérum albumine bovine. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

4.4.10. Dosage de protéine total

Le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode de Biuret en utilisant un kit commercial (Spinreact, Espagne). Les protéines de l'échantillon donnent une couleur violette/bleue avec le réactif de Biuret. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon.

4.5. Etude histologique

Après le sacrifice des animaux et leurs dissections, une perfusion aura lieu avec une solution froide de KCL (1.15%) afin de drainer tout le sang restant dans les organes. Les organes sont immédiatement prélevés (foie, reins, cerveau et testicules) coupés en petits morceaux, et conservés dans un fixateur (formol). Les fragments des organes sont déshydratés par submersion en utilisant des bains d'éthanol à des concentrations allant en ordre croissant. Après déshydratation par l'éthanol, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue durant 24 heures pour chacun. Le xylène occupe la place de l'eau pour faciliter la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. Les échantillons sont placés dans des moules (barres de Leucart) et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la réalisation des coupes.

- Réalisation des coupes et coloration :

Les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 5µm d'épaisseur. A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine qui sont ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure. Après rinçage par l'eau distillée, les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline pour colorer les noyaux. Elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (8 min) pour colorer le cytoplasme. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et prêtes à l'observation microscopique (objectif x 10 et x 40).

L'étude histologique s'effectue dans les laboratoires d'anatomie pathologique de la cité El- Bir Constantine.

4.6. Etude statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test t de Student. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

ns ; $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

* ; $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative.

** ; $0,05 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative.

*** ; $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

II. Résultats et discussion

II. 1 Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vitro*

1. Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes

Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes incluant principalement les pouvoirs anti-inflammatoire, antimicrobien, anticancéreux, antiviral, ainsi que la prévention des maladies cardiovasculaires et dégénératives. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (Fadili *et al.*, 2017 ; Rebey *et al.*, 2017).

Les résultats de la présente étude ont montré des teneurs variées en polyphénols concernant les deux extraits de la plante *C. Sphaerocephala*. La teneur la plus élevée en polyphénols totaux est celle de l'éthyle acétate 357 ± 11.32 μg d'équivalent d'acide gallique/mg comparativement à l'extrait butanolique 202.5 ± 1.5 d'équivalent d'acide gallique/mg de l'extrait.

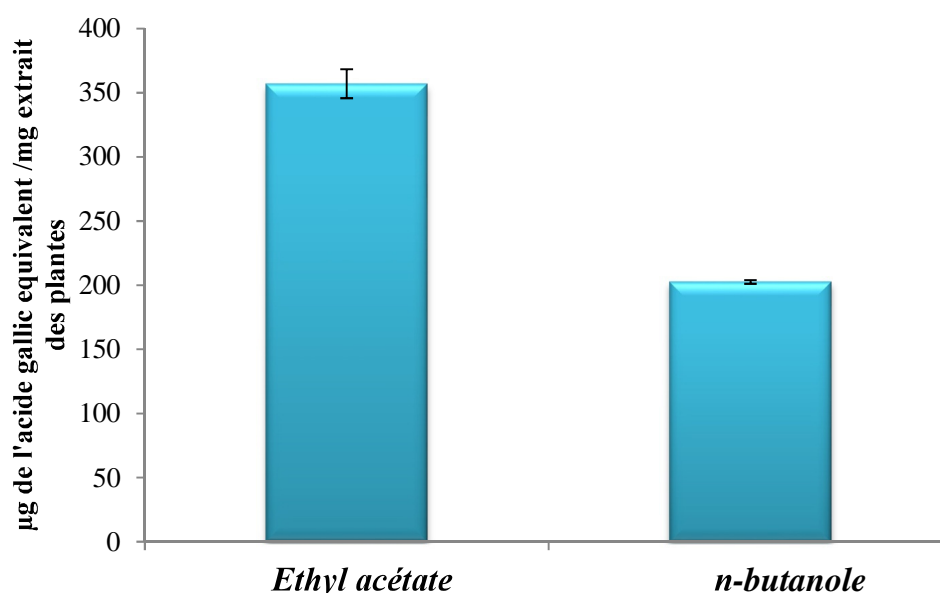


Figure 31 : La teneur en phénols totaux des extraits (butanolique et éthyle acétate) de la plante *C. Sphaerocephala*.

Concernant la teneur en flavonoïdes des deux extraits de la plante éthyle acétate et *n*-butanol on note 283.2 ± 4.17 et 273.8 ± 5.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectivement.

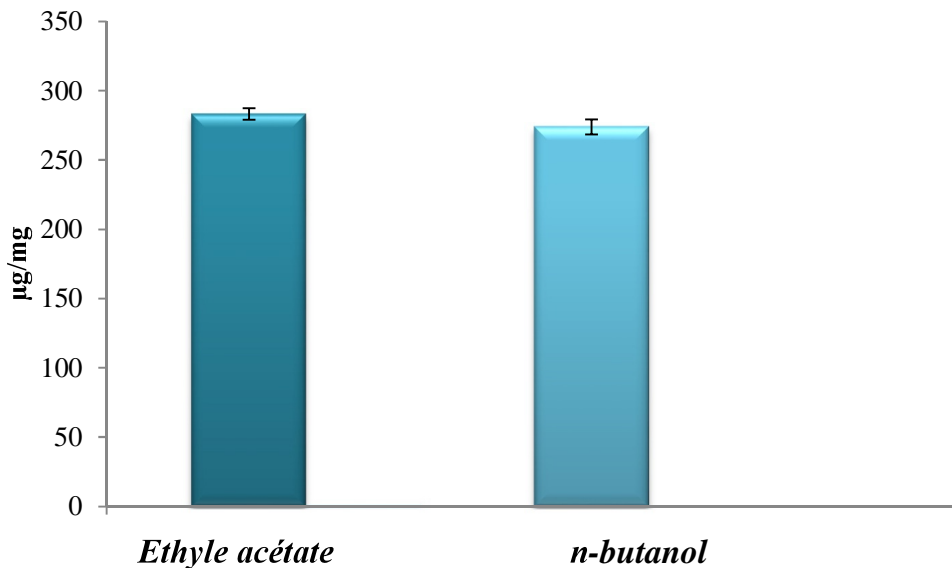


Figure 32 : La teneur en flavonoïdes des extraits (butanolique et éthyle acétate) de la plante *C. Sphaerocephala*.

2. Evaluation du pouvoir anti radicalaire :

L'activité antiradicalaire de la plante *C. Sphaerocephala* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée dans les deux extraits. Selon les résultats enregistrés, les deux extraits de la plante sont dotés d'un bon pouvoir antioxydant. Une diminution dose-dépendante du radical DPPH a été observé lors du traitement. L'extrait éthyle acétate et *n*-butanol de la plante ont manifestés une capacité puissante sur le radical libre DPPH avec une IC_{50} équivalente à $11.59 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ et $16.67 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ respectivement.

Les figures (33,34 ,35) montrent une augmentation significative du pourcentage de piégeage du radical DPPH, cela est due à la capacité des deux extraits à capter ce dernier comparativement à la vitamine C qui est prise comme un antioxydant de référence.

Le pouvoir antiradicalaire de la Vitamine C à la concentration $5 \mu\text{g/ml}$ est de 95% tandis que celui de l'extrait éthyle acétate et *n*-butanol à la concentration de $20 \mu\text{g/ml}$ est de 87.62% et 60.17% respectivement.

Les résultats obtenus concernant l'effet antiradicalaire des deux extraits de la plante *C. Sphaerocephala* ont montrés une activité intéressante. Cette activité pourrait être attribuée à la présence de composés phénoliques comme les flavonoïdes qui peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres.

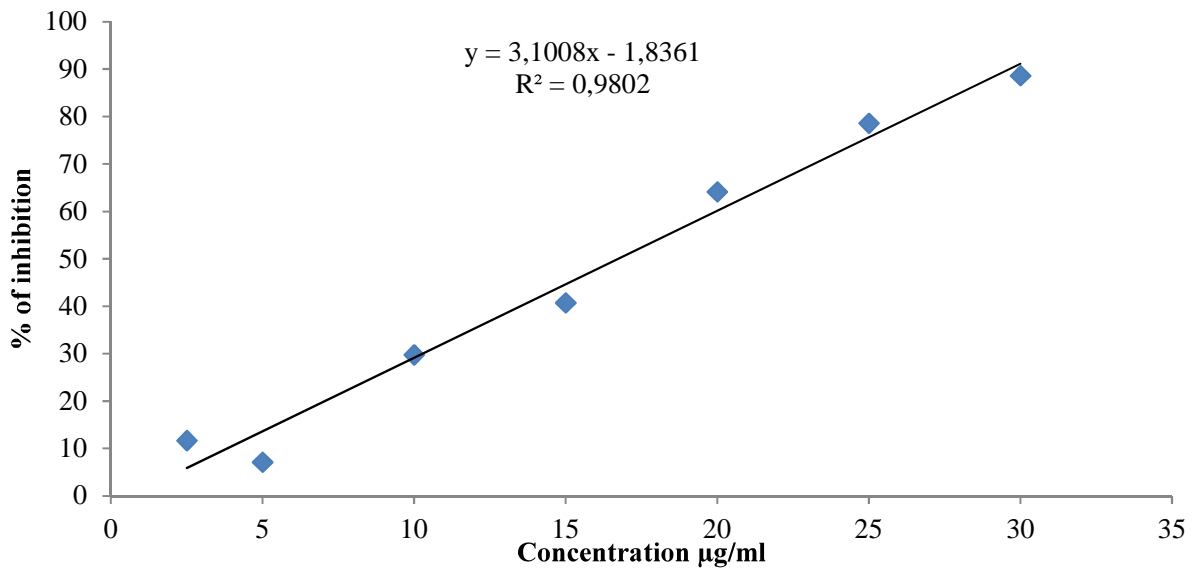


Figure 33 : Le pouvoir anti radicalaire de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* à différentes concentrations.

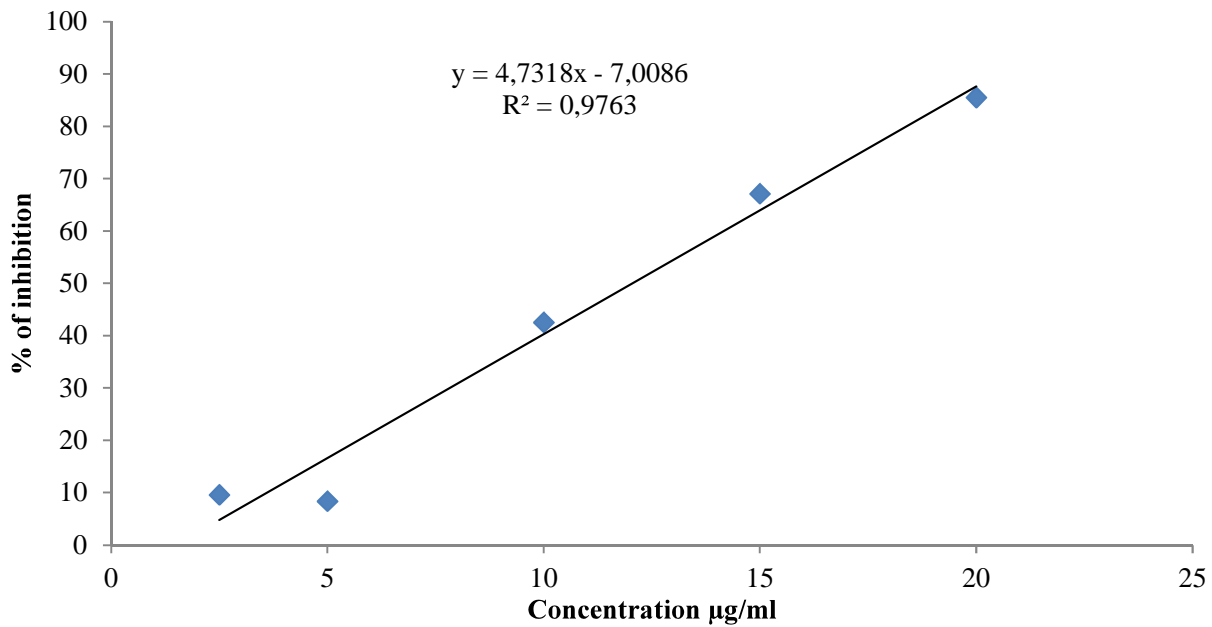


Figure 34 : Le pouvoir anti radicalaire de L'extrait éthyle acétate de la plante *C. sphaerocephala* à différentes concentrations.

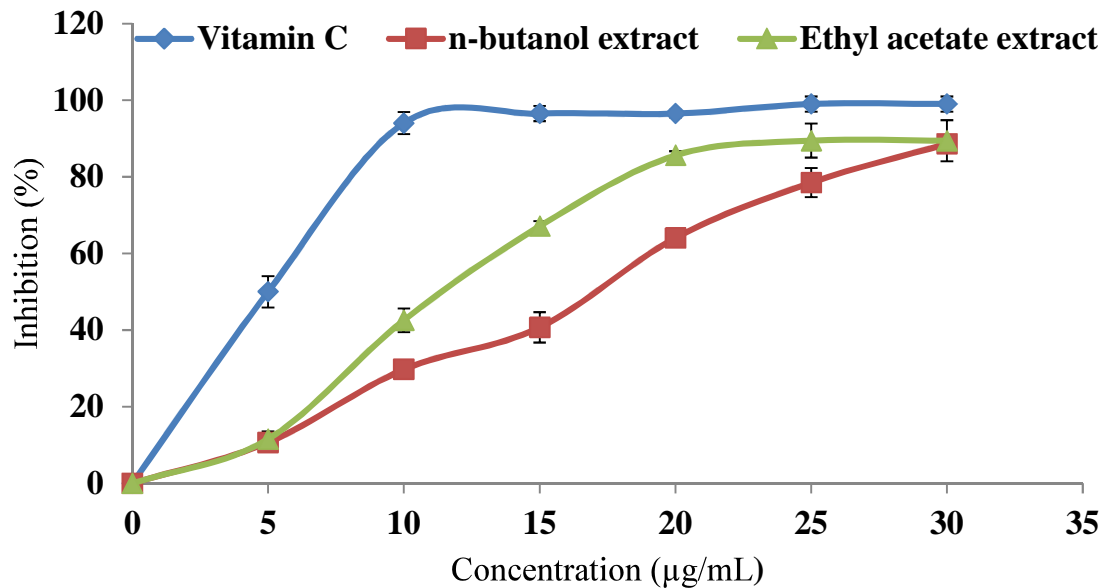


Figure 35 : l'activité anti radicalaire (DPPH°) de l'extrait butanolique et éthyle acétate de la plante *C. sphaerocephala* et de la vitamine C.

3. Le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un paramètre très important pour déterminer le potentiel antioxydant total de la plante. La peroxydation lipidique implique la formation et la propagation de radicaux lipidiques avec de nombreux effets délétères, y compris la destruction des lipides membranaires, les troubles métaboliques et l'inflammation (Gul *et al.*,2013). Dans la présente étude, nous avons évalué la capacité de l'extrait butanolique de la plante *C. Sphaerocephala* à inhiber la peroxydation lipidique induite par le FeSO₄, en utilisant un homogénat de vitellus d'œuf (Figure 36, 37).

Une diminution dose-dépendante de la peroxydation lipidique a été noté avec l'extrait butanolique dont IC₅₀=340.94±7.49 µg/mL, tandis que IC₅₀ de la Vitamine C est de 20,62±0,93 µg/mL. La capacité inhibitrice de la peroxydation lipidique par l'extrait butanolique de la plante est due à son pouvoir antioxydant et antiradicalaire.

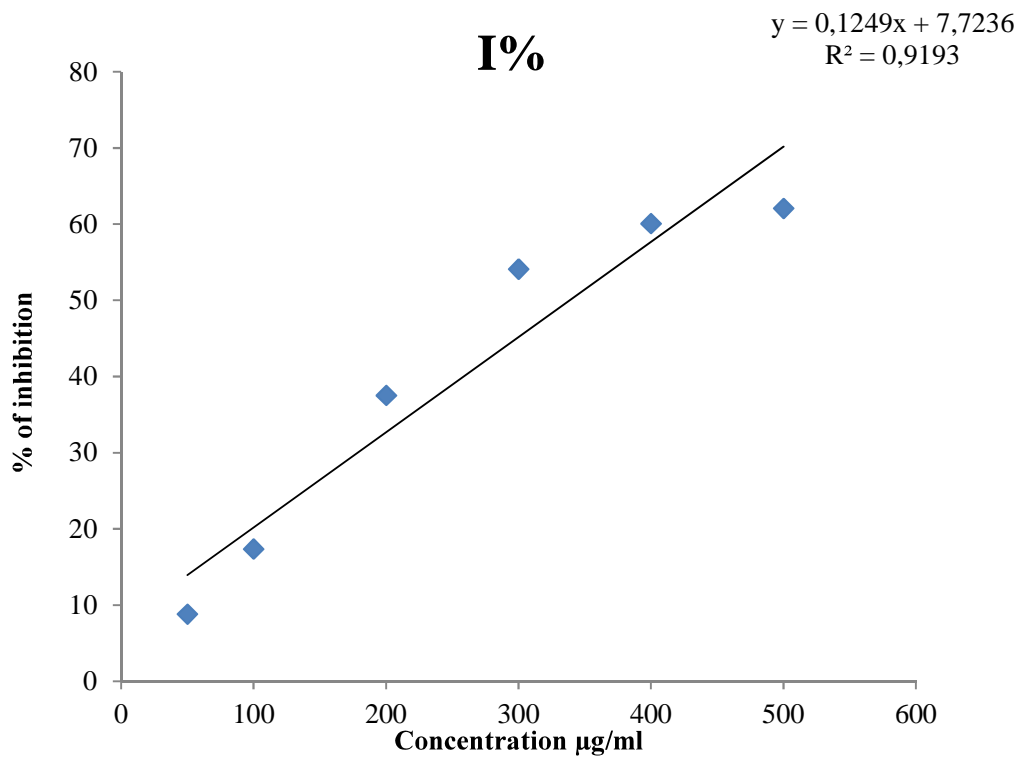


Figure 36 : Inhibition de la peroxydation lipidique (formation du MDA) par l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* à différentes concentrations.

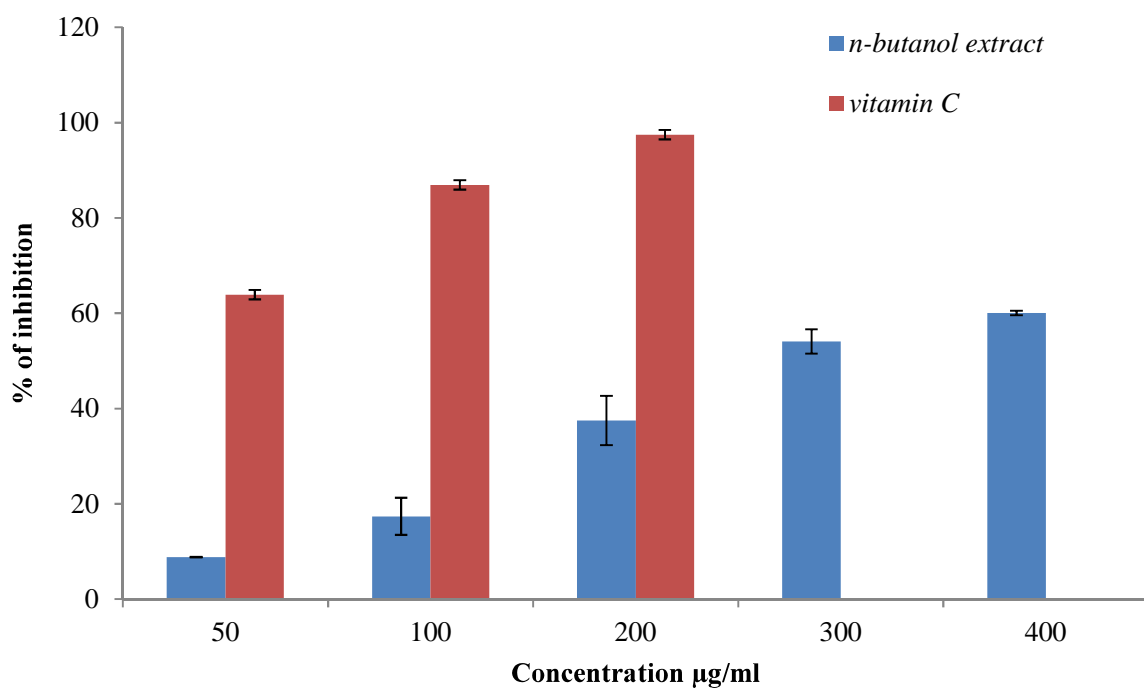


Figure 37 : l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (formation du MDA) de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* et de la vitamine C (moyenne de trois répétitions).

4. Inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN

De nombreuses études ont prouvé que l'ADN est susceptible de subir des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres dans plusieurs maladies telles que le cancer (Russo *et al.*, 2011).

La capacité de l'extrait butanolique de la plante *C. Sphaerocephala* à protéger l'ADN vis-à-vis des dommages oxydatifs a été testée sur le plasmide 46966 qui a été exposé au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) photolysé par le rayonnement UV. Selon les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN non irradié et non traité (C0) a généré une bande qui correspond à un ADN circulaire superenroulé ou la forme native se trouvant normalement *in vivo*. Alors que le contrôle irradié (CR) ainsi que l'échantillon (contenant 50 μg de l'extrait butanolique) ont montré deux nouvelles formes d'ADN : la forme circulaire relâchée et la forme linéaire. Ces formes se produisent naturellement lorsque l'ADN est coupé et endommagé. Dans cette expérience, l'ajout de l'extrait a généré des résultats semblables au contrôle irradié ce qui signifie qu'il n'a pas conservé l'ADN dans sa forme superenroulée et donc ne présente pas une activité efficace contre la photolyse de l'ADN par l'UV et les dommages induits par H_2O_2 . Ce qui implique que les molécules antioxydantes de l'extrait de la plante *C. Sphaerocephala* exercent leur pouvoir biologique par d'autres moyens autres que la protection d'ADN.

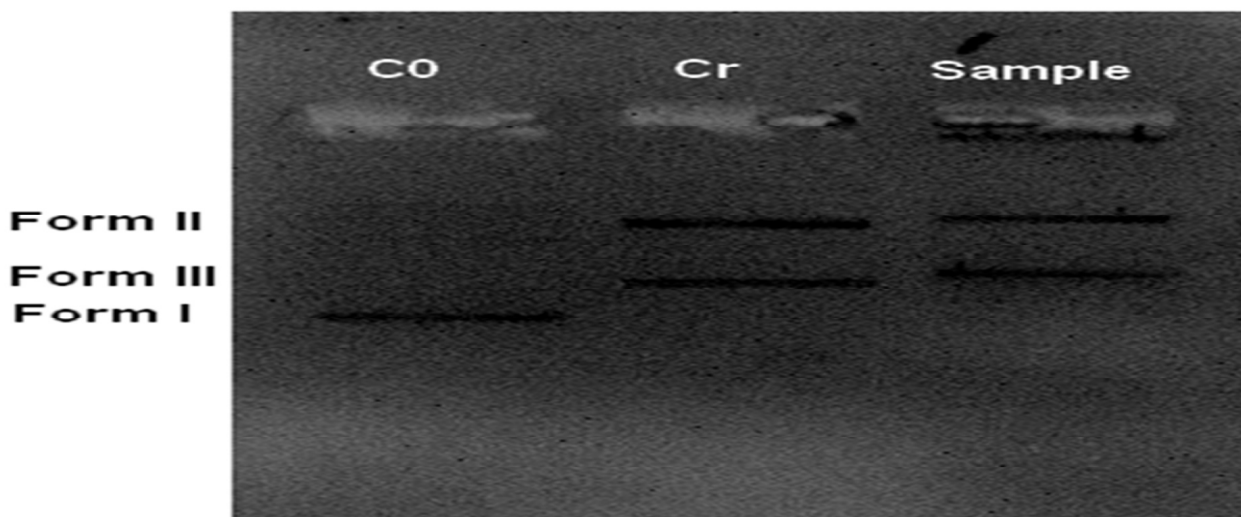


Figure 38 : Effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. sphaerocephala* sur l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par H_2O_2 photolysé aux UV. C0 = ADN non irradié non traité, CR = ADN non irradié aux UV et échantillon = ADN irradié aux UV traité avec l'extrait de *n*-butanol. Forme I : ADN plasmidique surenroulé. Forme II : ADN circulaire double brin ouvert. Forme III : ADN linéaire.

5. L'effet des extraits des plantes sur des lignées cellulaires cancéreuses *in vitro*

L'activité anticancéreuse de l'extrait butanolique de la plante *C. Sphaerocephala* a été réalisée sur une lignée cellulaire HeLa (human cervix carcinoma) qui a été la première lignée cellulaire humaine établie en culture et est devenue la lignée cellulaire humaine la plus largement utilisée dans la recherche biologique (Lucey *et al.*, 2009 ; Manosroi *et al.*, 2012). Les résultats obtenus montrent que l'extrait butanolique possède une activité anticancéreuse très significative.

Le suivi de la prolifération des cellules HeLa en présence et en absence de l'extrait butanolique par l'analyseur de cellules en temps réel Xcelligence (RTCA) a été effectué. Durant les 51 heures, l'extrait à la concentration 50 à 250 µg / mL, exhibe une activité antiproliférative dose-dépendante intéressante contre les cellules HeLa. Comme le montre la figure 39 l'extrait butanolique a montré une activité rapide et efficace contre les cellules HeLa à une concentration de 250 µg / mL comparant au contrôle (prolifération des cellules HeLa sans traitement) et au milieu de culture (niveau de prolifération est zéro). En effet, la concentration élevée a fortement affecté la prolifération cellulaire et la viabilité ce qui montre une activité antiproliférative maximale.

Selon cette étude, on peut suggérer que les propriétés anticancéreuses positives de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* pourraient être attribuées à la présence de composés phénoliques en particulier les flavonoïdes dont de nombreuses études ont rapporté leurs effets protecteurs contre certaines maladies comme le cancer (Samet *et al.*, 2014 ; Koldaş *et al.*, 2015 ; Abay *et al.*, 2015). Parmi ces flavonoïdes se trouve l'isocoreopsine, la butrine et l'isobutrine qui jouent un rôle essentiel dans la chimioprévention du cancer du côlon (Teoh *et al.*, 2017).

Ces résultats ont confirmé d'autres études qui ont rapporté que les espèces de *Centaurea* contiennent un agent anticancéreux puissant contre diverses malignités humaines, y compris la prostate, les poumons, le côlon, l'estomac, les reins, le pancréas et les glandes mammaires (Yaglioglu *et al.*, 2014). Cet effet bénéfique a été attribué à la présence de grandes quantités de polyphénols en particulier les lactones sesquiterpéniques qui en plus de leurs activités antioxydantes, elles inhibent le développement du cancer grâce à un certain nombre de mécanismes essentiels cellulaires (Bentamene *et al.*, 2010 ; Oke-Altuntas *et al.*, 2016 ; Erenler *et al.*, 2016).

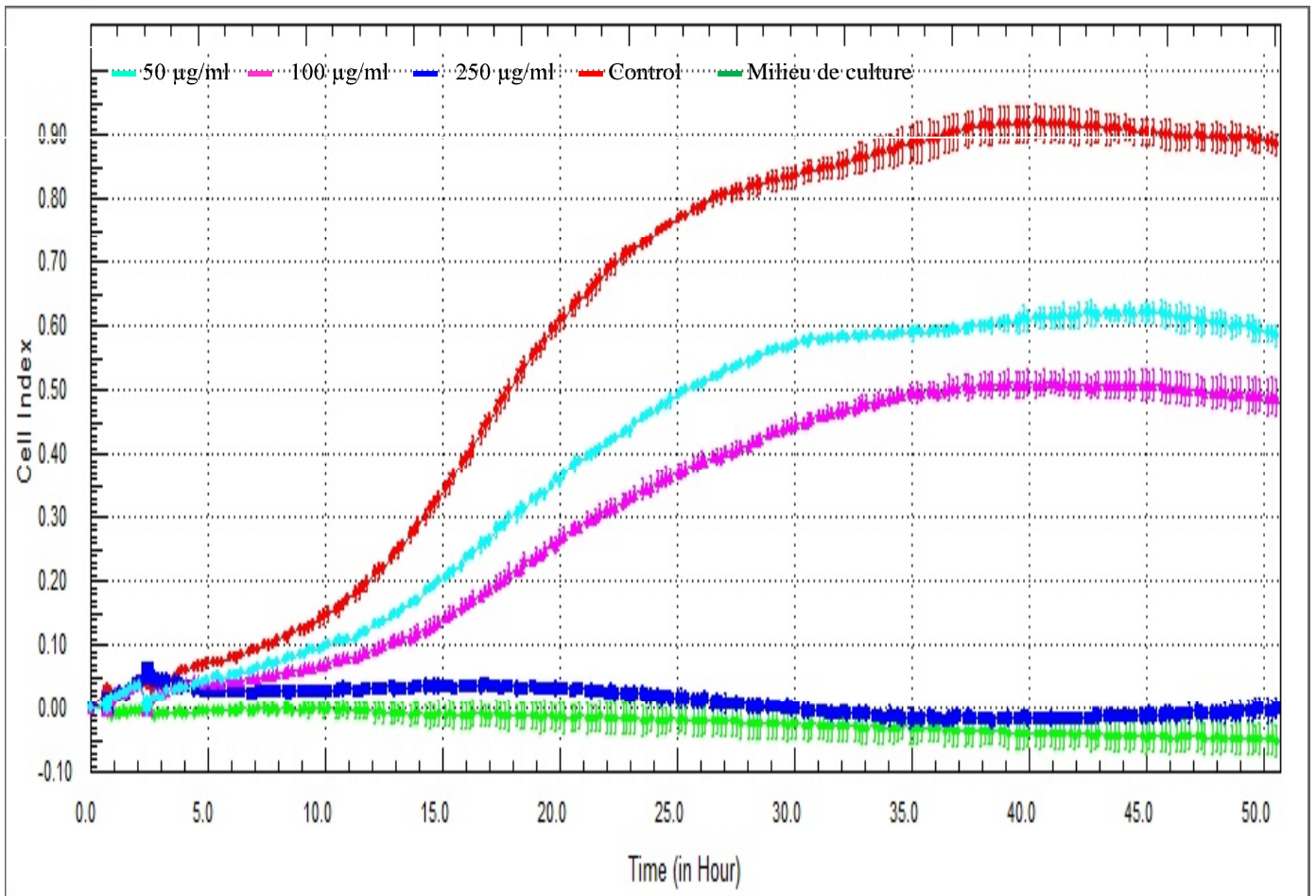


Figure 39 : L'activité anticancéreuse de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea sphaerocephala* sur la ligne cellulaire HeLa ($2,5 \times 10^4$ cell/well). Trois concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml). Chaque concentration a été testée en deux expériences et en trois répétitions ($n = 3$) en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

II.2. Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vivo*

2. Résultats

2.1. Effet préventif de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea sphaerocephala* sur les marqueurs biochimiques

2.1 .1. L'effet sur l'activité enzymatique des transaminases (AST et ALT)

Le traitement des rats par l'acide valproïque a provoqué une augmentation significative de l'activité enzymatique des aminotransférases, l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT). Comparant au groupe témoin, cette augmentation était très hautement significative ($p < 0.001$). Tandis que, chez les rats prétraités par l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* et la Vitamine E à la dose (100 mg/kg) on a noté une diminution significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) de l'activité de l'AST et l'ALT comparant aux rats traités par le VPA respectivement. On a également enregistré une diminution significative ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) de l'activité de ces deux enzymes dans le groupe prétraité avec la dose 50 mg/kg (Figure 40).

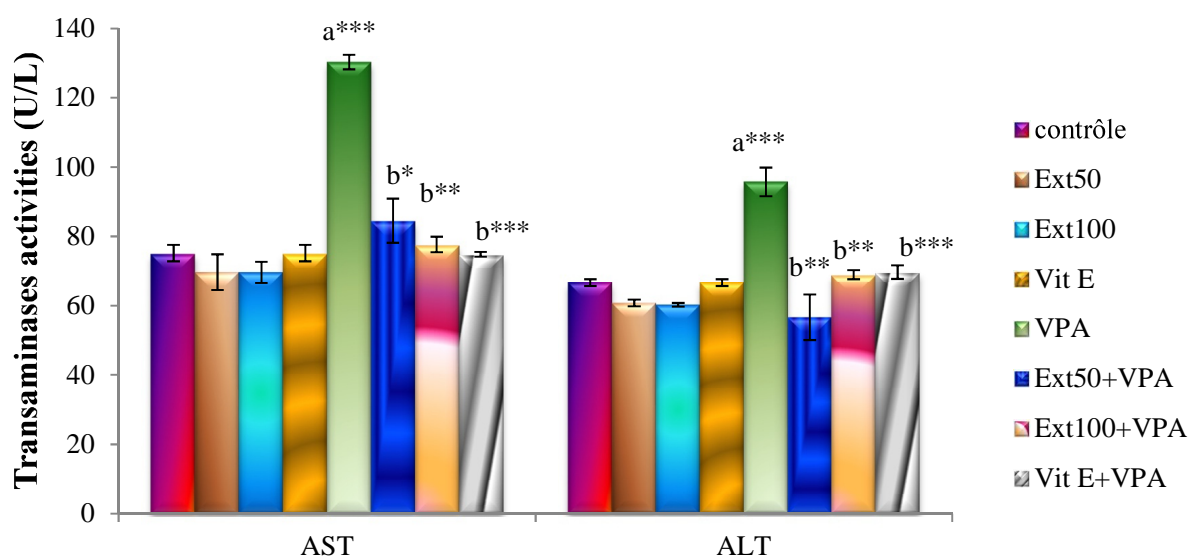


Figure 40 : Effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100mg/kg) et de la Vit E sur la libération des transaminases AST et ALT. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. Test de Student : *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin,

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.1.2. L'effet sur le taux du glucose

D'après les résultats obtenus (Figure 41) on a remarqué une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration du glucose dans le plasma chez le groupe traité par l'acide valproïque par rapport au groupe témoin. Par contre et comparant aux rats traités par le VPA, une diminution significative ($p < 0.01$) et ($p < 0.001$) de la concentration du glucose plasmatique a été observé chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50 et 100 mg/kg) ainsi que par la Vit E (100mg/kg) respectivement.

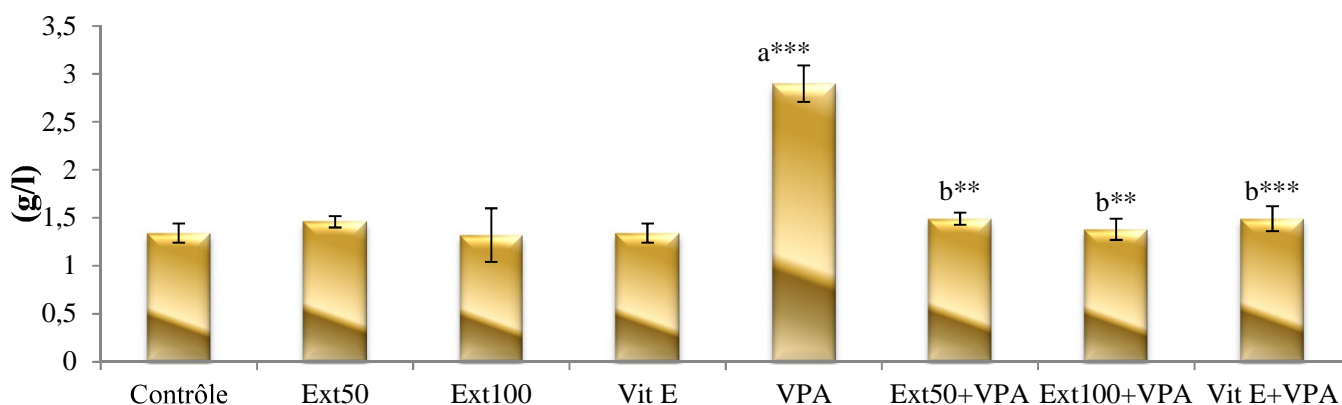


Figure 41 : L'effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50 ,100mg/kg) et de la Vit. E sur la concentration du glucose dans le plasma. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de student* : *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin,

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.1.3. L'effet sur la concentration de la créatinine

L'administration de l'acide valproïque aux rats a induit une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration plasmatique de la créatinine comparant aux rats témoins. En revanche, une diminution significative ($p < 0.01$) de la concentration de la créatinine dans le plasma des rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) par rapport aux rats traités par l'acide valproïque (Figure 42).

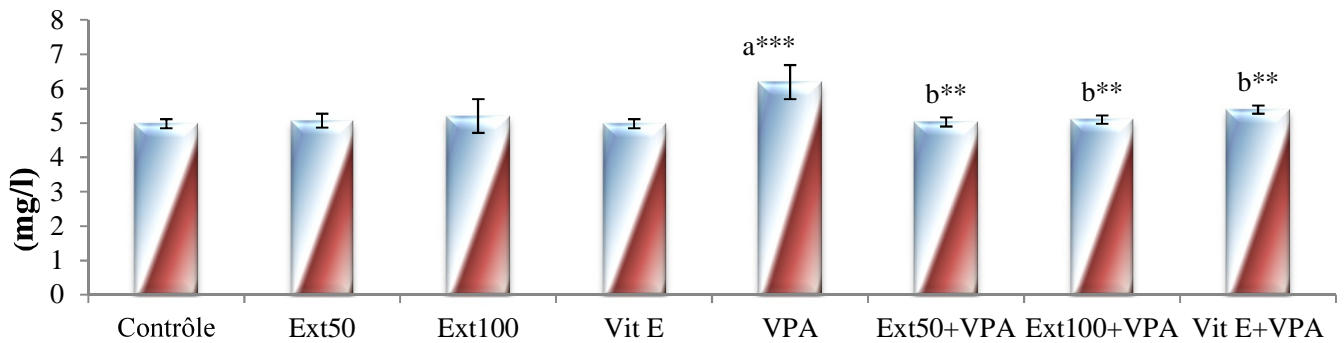


Figure 42 : L'effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100mg/kg) et de la Vit. E sur la concentration plasmatique de la créatinine. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student*. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.1.4. L'effet sur le taux du cholestérol et des triglycérides

Les résultats obtenus montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) des taux du cholestérol et triglycérides dans le plasma des rats traités par l'acide valproïque par rapport aux rats témoins. Concernant les rats prétraités par l'extrait butanolique à des doses(50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) on a remarqué une diminution significative ($p < 0.01$) du cholestérol par rapport aux rats traité par le VPA. Aussi bien, et comparant aux groupe traité par le VPA une diminution significative ($p < 0.01, p < 0.001$) des triglycérides a été enregistré chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg /kg) et la Vit. E (Figure43).

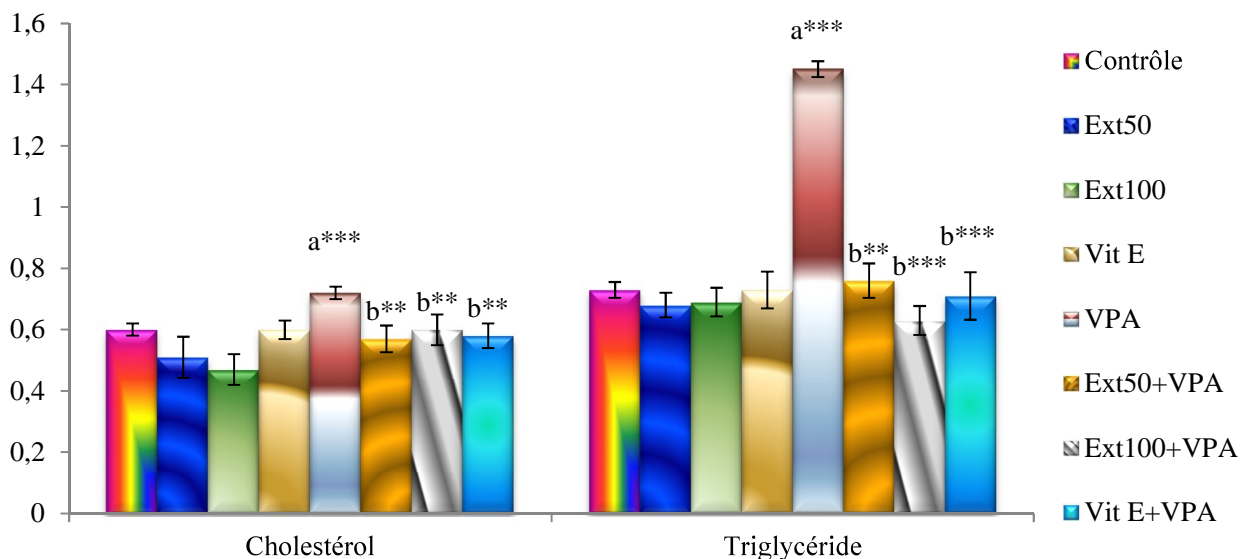


Figure 43 : L'effet de VPA, de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50, 100mg/kg) et de la Vit. E sur la concentration plasmatique du taux de cholestérol et les triglycérides. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student* : *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.2. L'effet préventif de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea sphaerocephala* sur les marqueurs du stress

2.2.1. L'effet sur le taux d'MDA au niveau du foie et des reins

D'après les résultats obtenus, on a remarqué une augmentation significative ($p < 0.01$) et ($p < 0.001$) du taux d'MDA au niveau du foie et les reins respectivement chez les rats recevant l'acide valproïque par rapport aux rats témoins. Par contre et comparant aux rats traités par le VPA, on a enregistré une diminution significative du taux du MDA chez les rats prétraités par l'extrait butanolique et la Vit. E (100mg/kg) au niveau du foie ($p < 0.01$) et au niveau des reins ($p < 0.001$). Mais et comparant aux rats traités par l'acide valproïque, on a enregistré une augmentation non significative du taux d'MDA au niveau du foie et des reins chez les rats prétraités par la dose (50mg/kg) de l'extrait butanolique (Figure 44).

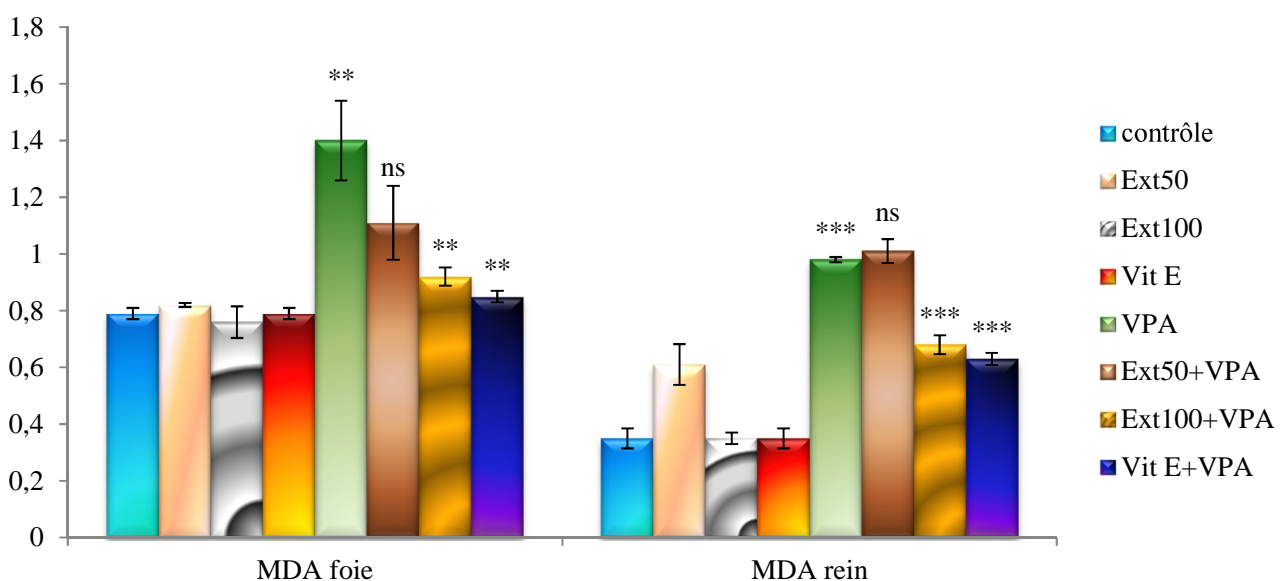


Figure 44 : L'effet du VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100mg/kg) et la Vit. E sur le taux d'MDA au niveau du foie et les reins. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student* *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: comparé au groupe témoin.

b: comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA.

2.2.2. L'effet sur le taux d'MDA au niveau du cerveau et des testicules

Le traitement des rats par l'acide valproïque a provoqué une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux d'MDA dans le cerveau et les testicules comparé aux rats témoins. En revanche, et comparant aux rats traité par le VPA une diminution significative ($p < 0.01$) et ($p < 0.001$) du taux d'MDA au niveau du cerveau a été enregistré chez les rats prétraité par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E(100mg/kg) respectivement. Ainsi qu'une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du taux d'MDA au niveau des testicules a été notée chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) comparant aux rats traités par le VPA (Figure 45).

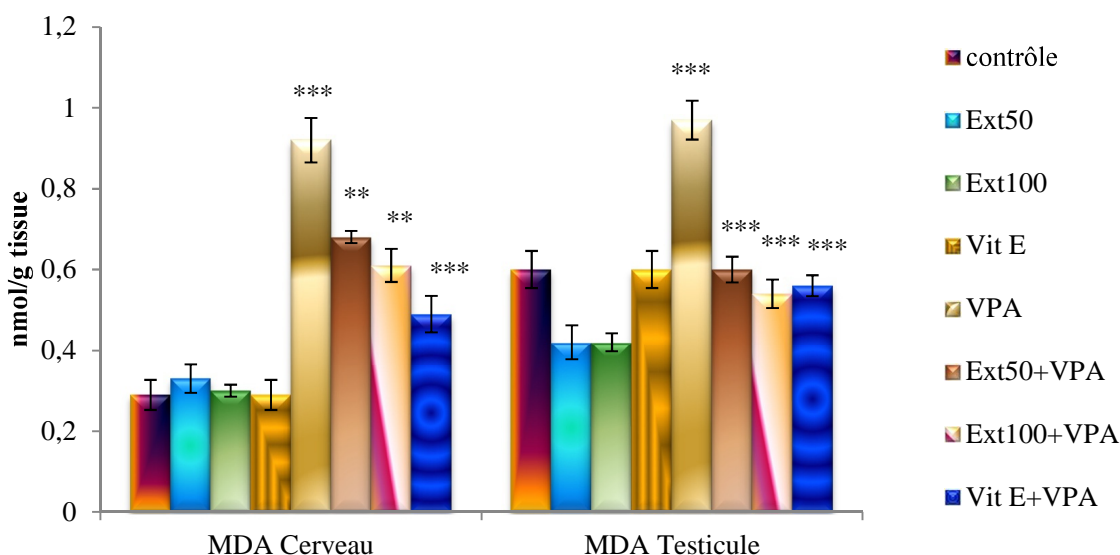


Figure 45 : L'effet de VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100 mg/kg) et la Vit. E sur le taux d'MDA au niveau du cerveau et les testicules. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student* : *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: comparé au groupe témoin.

b: comparé au groupe VPA. .

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.2.3. L'effet sur le taux du GSH au niveau du foie et des reins

La figure 48 montre une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de GSH au niveau du foie et les reins des rats traités par l'acide valproïque comparé aux rats témoins. Par ailleurs, on a enregistré une augmentation significative ($p < 0.05$ et $p < 0.01$), ($p < 0.01$) du taux de GSH au niveau du foie comparé aux rats traités par l'acide valproïque chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit E(100mg/kg) respectivement. Aussi bien, une diminution significative ($p < 0.001$ et $p < 0.05$), ($p < 0.001$) du taux de GSH a été observée au niveau des reins chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) respectivement comparant aux rats traités par le VPA (Figure 46).

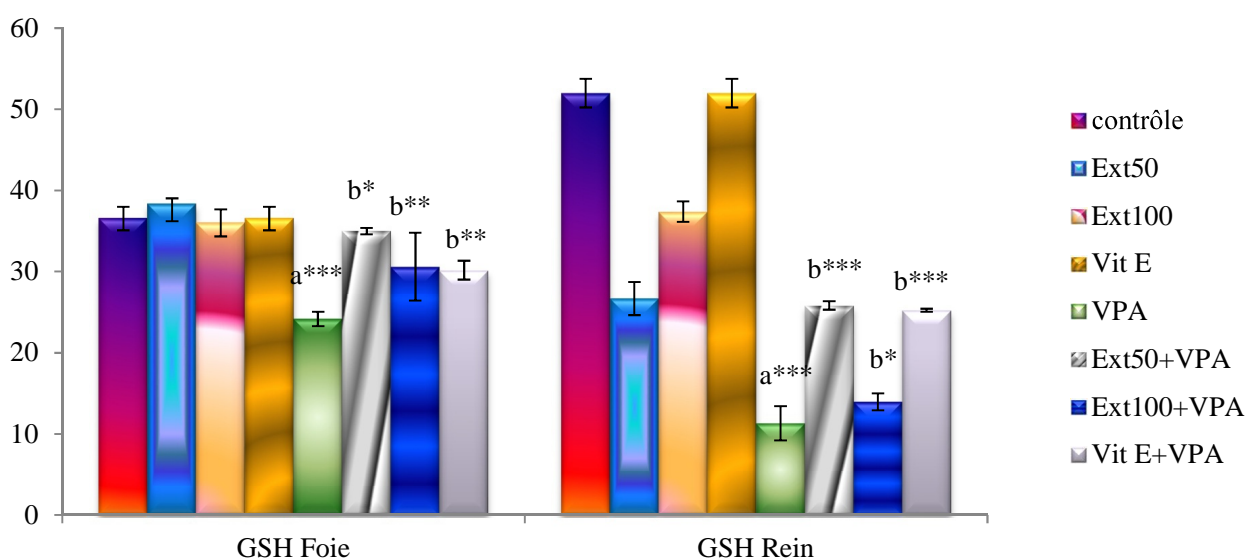


Figure 46 : L'effet de VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100mg/kg) et la Vit. E sur le taux du GSH dans le foie et les reins. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student* *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: comparé au groupe témoin.

b: comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.2.4. L'effet sur le taux du GSH au niveau du cerveau et des testicules

La Figure 47 indique que l'administration de l'acide valproïque aux rats a provoqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de GSH au niveau du cerveau et testicules par rapport aux rats témoins. En revanche on a remarqué une augmentation significative ($p < 0.001$ et $p < 0.01$), ($p < 0.001$) du taux de GSH au niveau du cerveau chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) respectivement comparant aux rats traités par le VPA. On a également enregistré au niveau des testicules une augmentation significative ($p < 0.05$), ($p < 0.01$) chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) respectivement par rapport aux traités par le VPA. Par contre et comparant aux rats traités par l'acide valproïque on a enregistré une augmentation non significative du taux de GSH au niveau des testicules chez les rats prétraités par l'extrait butanolique à la dose 100mg/kg a été enregistré.

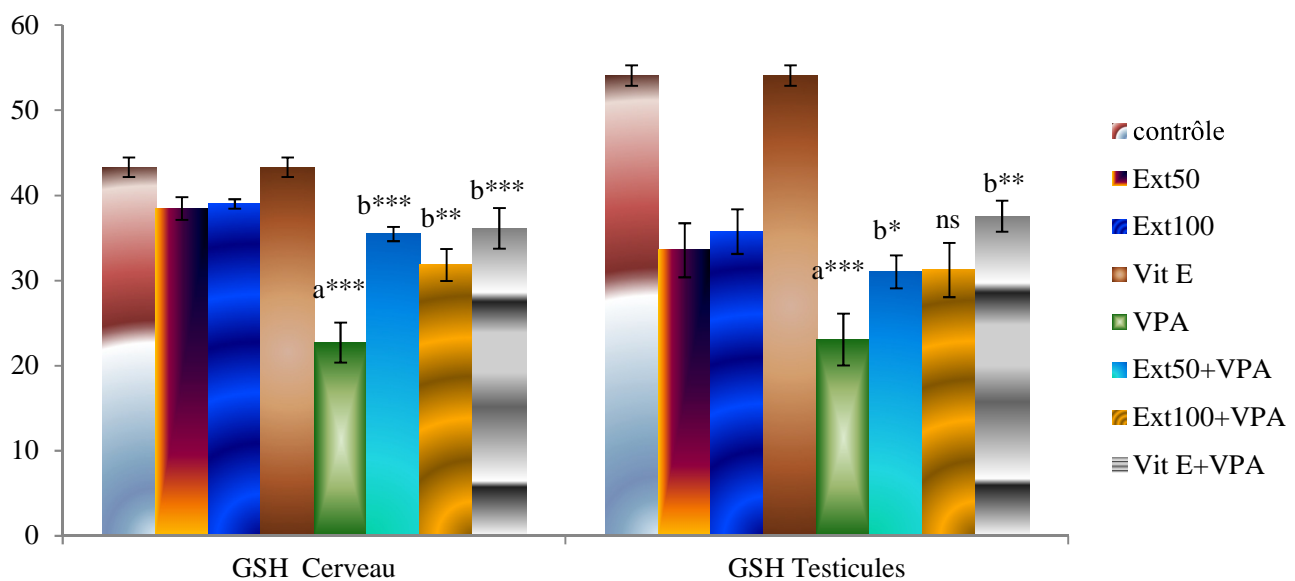


Figure 47 : L'effet de VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100 mg/kg) et la Vit. E sur le taux de GSH dans le cerveau et les testicules. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student*. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.2.5. L'effet sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du foie et des reins

Comparant aux rats témoins, le traitement des rats par l'acide valproïque a provoqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) dans le foie et les reins. Par contre et chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg /kg) on a noté une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité du GPx au niveau du foie par rapport aux rats traité par l'acide valproïque. On a aussi enregistré une augmentation significative ($p < 0.01$), ($p < 0.001$) de l'activité de cette enzyme au niveau des reins chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) respectivement comparant aux rats traités par le VPA (Figure 48).

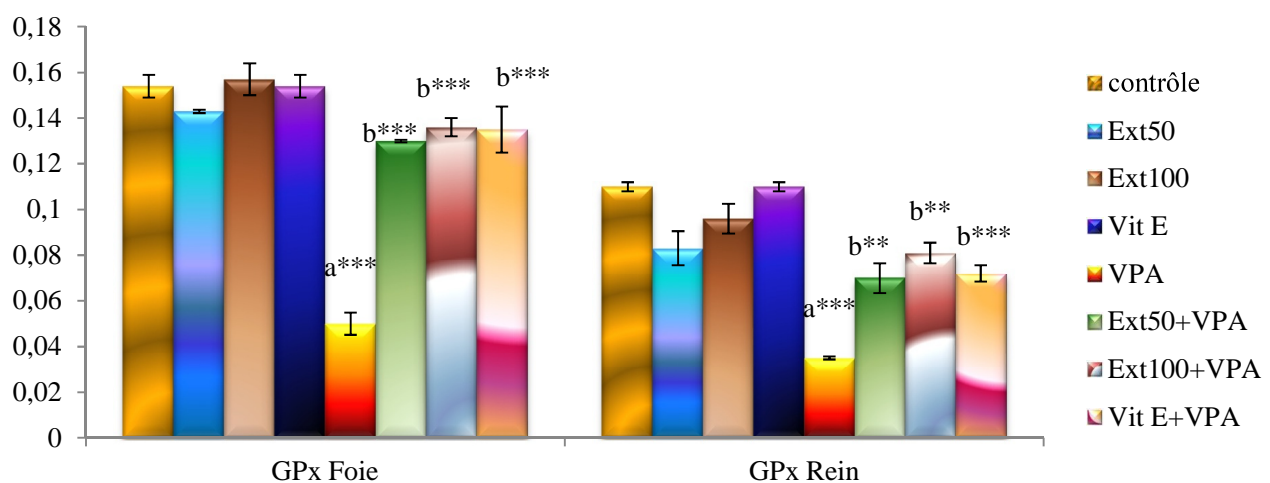


Figure 48 : L'effet de VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50,100mg/kg) et la Vit. E sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du foie et des reins. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student*. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.2.6. L'effet sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du cerveau et des testicules

Les résultats obtenus et illustrés dans la figure 49 indiquent qu'il y a eu une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) au niveau du cerveau et des testicules chez les rats recevant l'acide valproïque comparé aux rats témoins. Par contre et comparant aux rats traités par l'acide valproïque, on a enregistré une augmentation significative ($p < 0.01$), ($p < 0.001$) de l'activité de GPx au niveau du cerveau chez les rats prétraités par l'extrait butanolique de la plante (50,100mg/kg) et la Vit E (100mg/kg) respectivement. Ainsi qu'au niveau des testicules où une diminution significative ($p < 0.01$, $p < 0.05$), ($p < 0.001$) de cette enzyme a été notamment observée chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) respectivement par rapport aux rats traités par le VPA.

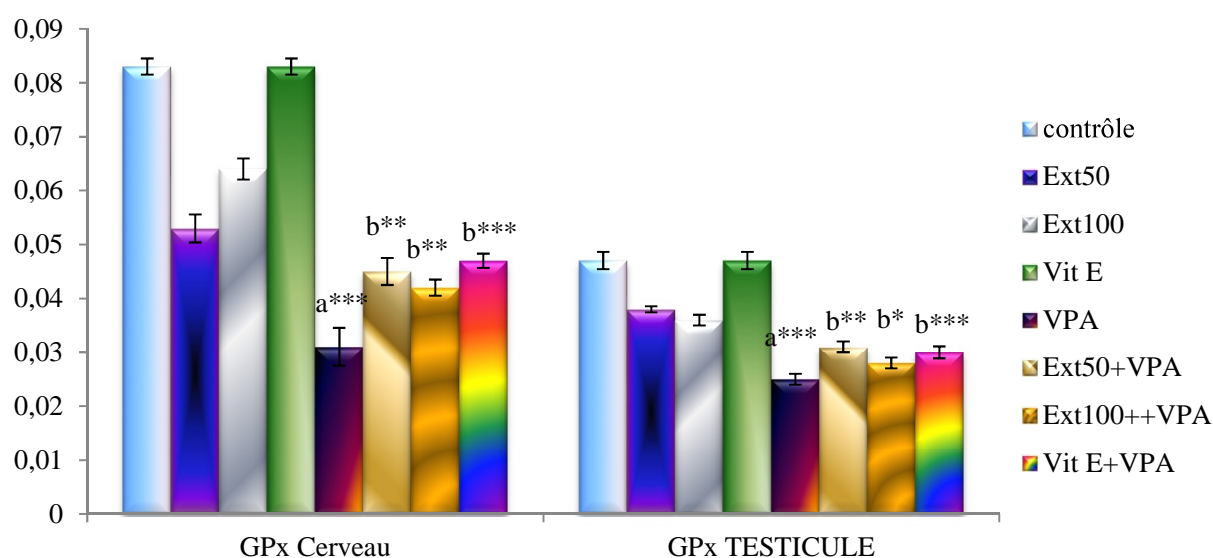


Figure 49 : L'effet de VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* et la Vit. E sur l'activité enzymatique du GPx au niveau du cerveau et des testicules. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student*. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

a: Comparé au groupe témoin.

b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

2.2.7. L'effet sur l'activité enzymatique de la catalase au niveau du foie et des reins

L'activité enzymatique de la catalase (CAT) a été significativement diminuée au niveau du foie et des reins ($p < 0.01$), chez les rats traités par l'acide valproïque comparant aux rats témoins. Par ailleurs, le prétraitement des rats par l'extrait butanolique (100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) a induit une augmentation significative ($p < 0.05$), ($p < 0.01$) respectivement de l'activité de la catalase au niveau du foie par rapport aux rats traités par l'acide valproïque. Par contre on a noté une augmentation non significative de cette enzyme chez les rats prétraités par l'extrait butanolique à la dose 50mg/kg par rapport aux rats traités par l'acide valproïque. Aussi bien on a enregistré une augmentation significative ($p < 0.01$) de l'activité de cette enzyme au niveau des reins chez les rats prétraités par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) et la Vit. E (100mg/kg) respectivement, comparant aux rats traités par le VPA (Figure 50).

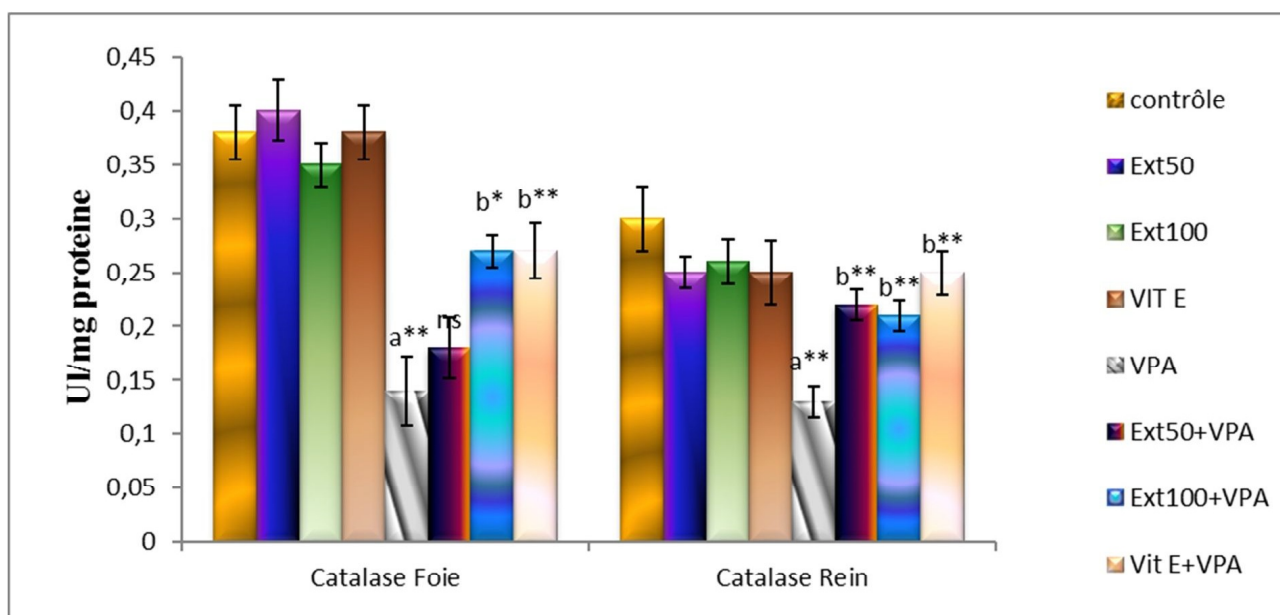


Figure 50 : L'effet de VPA, l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* et la Vit. E sur l'activité enzymatique de la catalase au niveau du foie et les reins. Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. *Test de Student*. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

a: Comparé au groupe témoin.

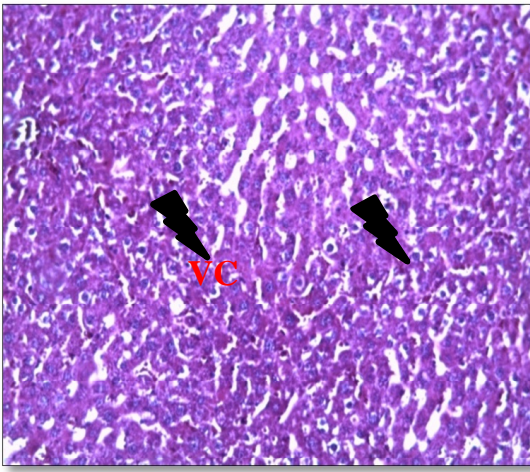
b: Comparé au groupe VPA.

ns : non significatif par rapport au groupe VPA

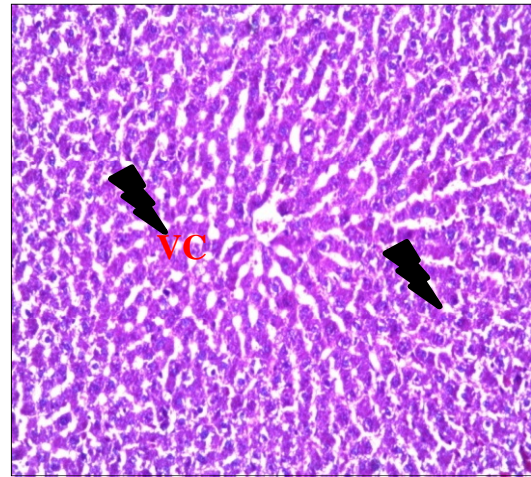
2.3. Etude histologique

2.3.1 Au niveau du foie :

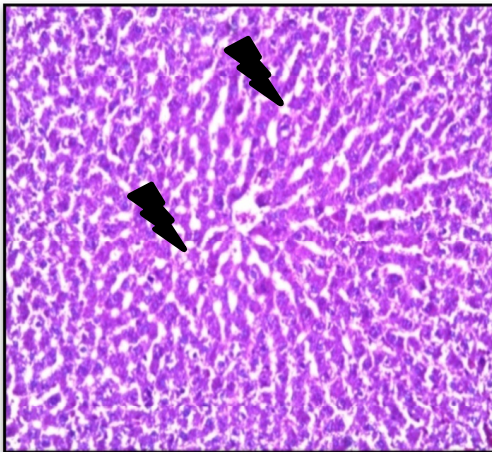
Le foie des rats témoins a montré une architecture histologique normale. Les lobules hépatiques ont montré des veines centrales à partir desquelles les hépatocytes rayonnaient sous forme de cordes. Ces cordons ont été séparés par des sinusoides sanguins (image A). On a noté chez les rats traités par la Vit E (100mg/kg) un parenchyme hépatique d'architecture conservée, hépatocyte de cytologie normale se disposant de façon radiaire au pourtour d'une veine centrolobulaire (image B). L'administration de l'extrait butanolique à la dose (50,100mg/kg) uniquement n'a pas eu comme conséquence des changements structuraux chez les rats. (Image C, D). Par contre l'histologie du foie des rats traités par l'acide valproïque (300mg/kg) révèle des changements histologiques caractérisés par une congestion vasculaire (image E, a), une stéatose (image E, b ; E, c) ainsi qu'une nécrose (E, c). Ces altérations graves de la structure affectent la fonction hépatique et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe. Tels dommages ont été améliorés (image F, G) après le traitement des rats par l'extrait butanolique (50,100mg/kg) ainsi que par la Vit E(100mg/kg) (image H) (Figure 51).



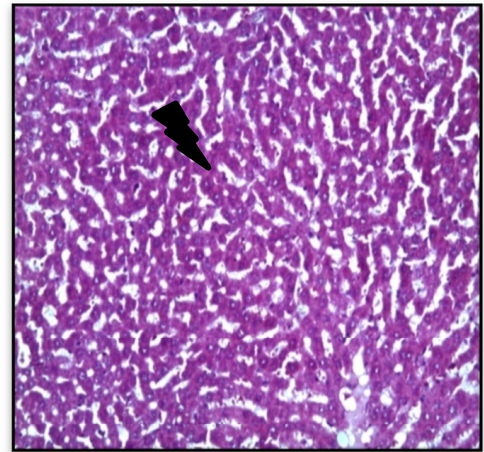
A : Foie d'un rat témoin (G X100).
Veine Centrolobulaire (VC)



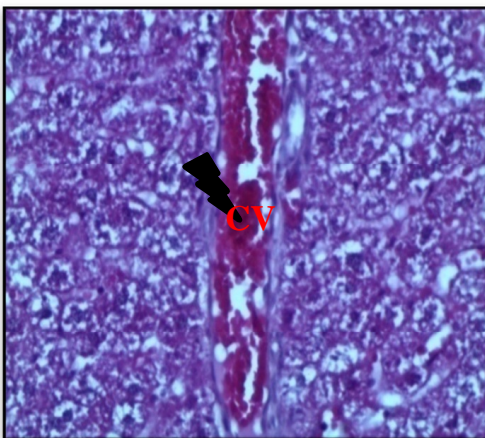
B : Foie d'un rat traité avec la Vit E
(100mg/kg) (G X100).



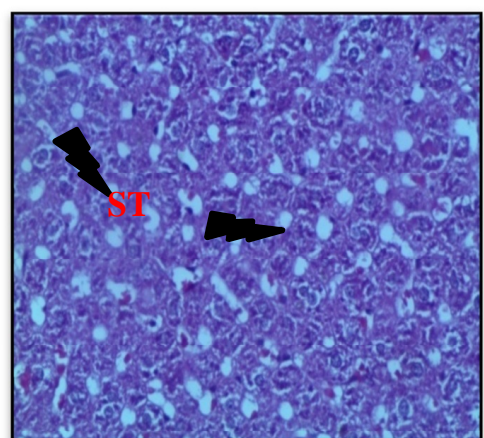
C : Histologie du foie de groupe
traité par l'extrait n-butanol
(50mg/kg) (G x 100).



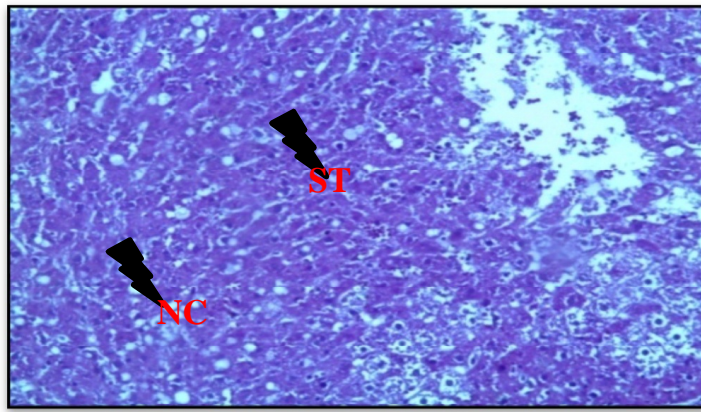
D : Histologie du foie de groupe
traité par l'extrait n-butanol
(100mg/kg) (G x 100).



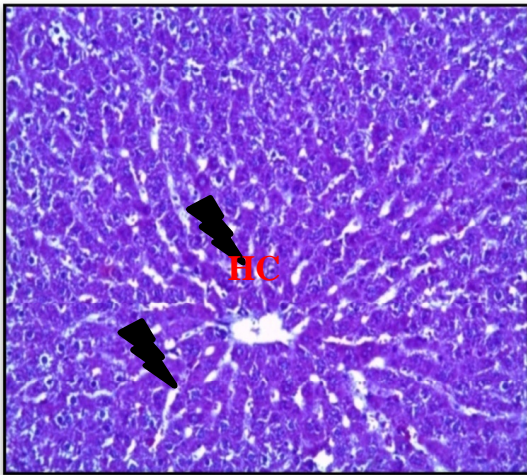
(E, a) : Histologie du foie traité par
VPA (congestion vasculaire(CV)) (G
x400).



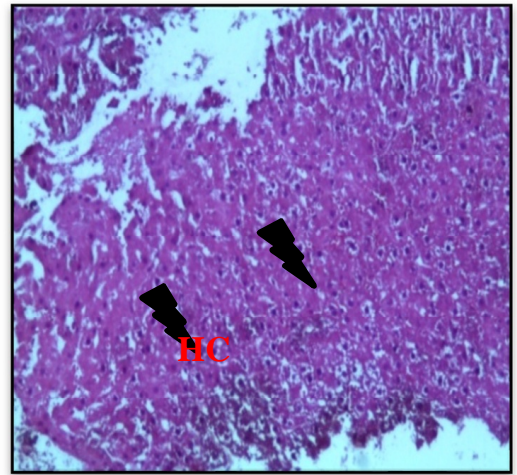
(E, b) : Histologie du foie traité par
VPA (Stéatose(ST)) (G x400).



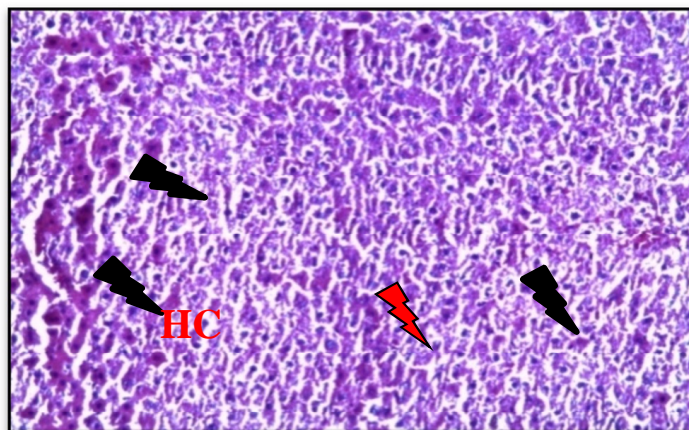
(E, c) : Histologie du foie traité par VPA (Stéatose(ST) et nécrose(NC)) (G \times 400).



(F) : Histologie du foie prétraité par l'extrait(50mg/kg) et VPA (300mg/kg). (Hépatocyte conservée(HC)) (G \times 400).



(G) : Histologie du foie prétraité par l'extrait (100mg/kg) et VPA (300mg/kg). (Hépatocyte conservée(HC)) (G \times 400).

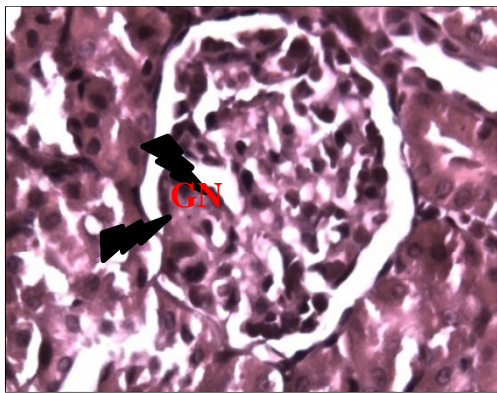


(H) : Histologie du foie prétraité par Vit E(100mg/kg) et VPA (300mg/kg) (Hépatocyte conservée(HC) en début de nécrose) (G \times 400).

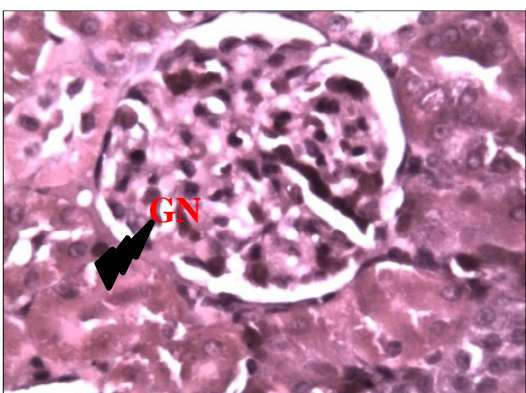
Figure 51 : Observation microscopique des coupes histologiques du foie des rats (G \times 100, \times 400).

2.3.2. Au niveau des reins

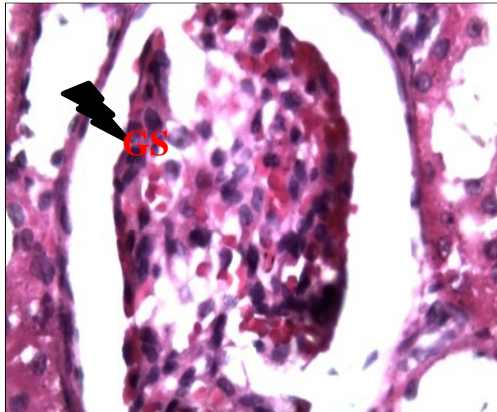
L'étude histologique des reins du groupe témoin et le groupe traité par la vitamine E a montré un aspect histologique bien conservé où on observe un glomérule normale (image A, B). La section rénale des rats traités par l'extrait n-butanol de la plante (50, 100mg/kg) a montré une image histologiques proche de celle du groupe témoin (image C, D). L'examen microscopique des coupes rénales des rats traités par le VPA (300mg/kg) a montré un début de nécrose (une liquéfaction) au niveau des tubes rénaux (image E), alors que le rein des rats traitées par le VPA et l'extrait (50 et 100 mg / kg) a révélé une régénération des tubules rénaux et des glomérules (image F, G), de même pour le rein des rats traitées par le VPA et la vitamine E (100 mg / kg) d'où une structure normale des tubules rénaux et des glomérules (image, H) (Figure 52).



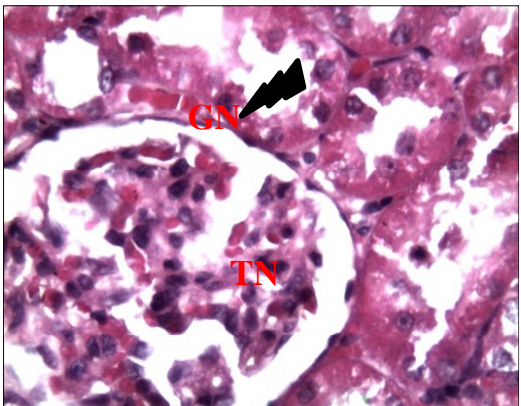
A : Rein d'un rat du groupe témoin (Glomérule normal (GN)). (G x400)



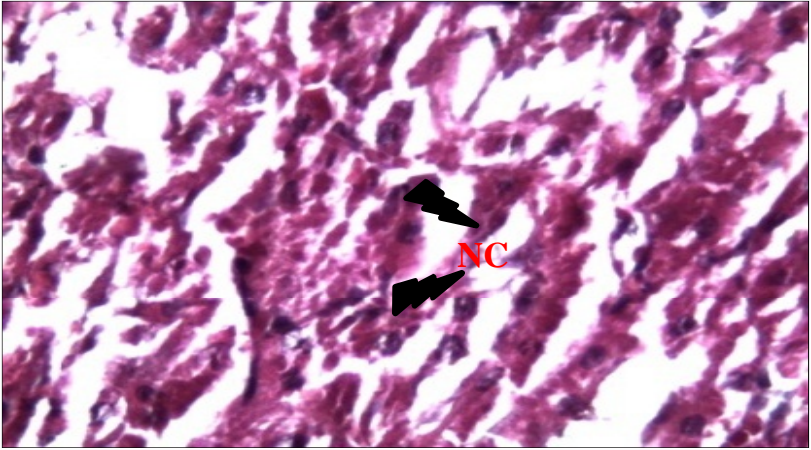
B : Rein d'un rat du groupe traité avec la vitamine E (100mg/kg) (Glomérule normal (GN)). (G x400)



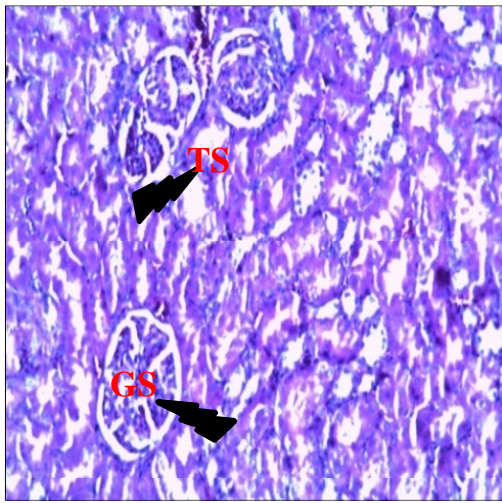
C : Rein d'un rat traité avec l'extrait *n*-butanol (100mg/kg) (Glomérule sain (GS)). (G x400)



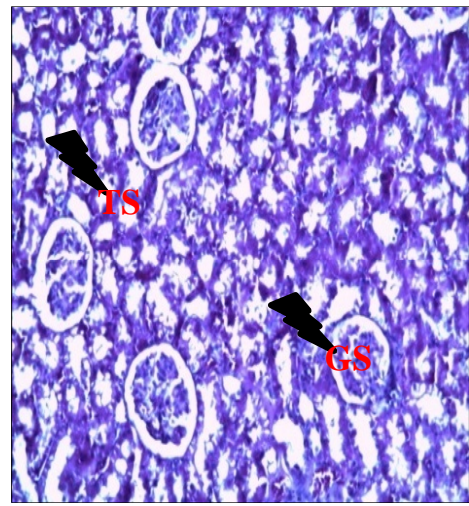
D : Rein d'un rat traité avec l'extrait *n*-butanol (50mg/kg) (Glomérule (GN) et tubes rénaux normal (TS)). (Gx400)



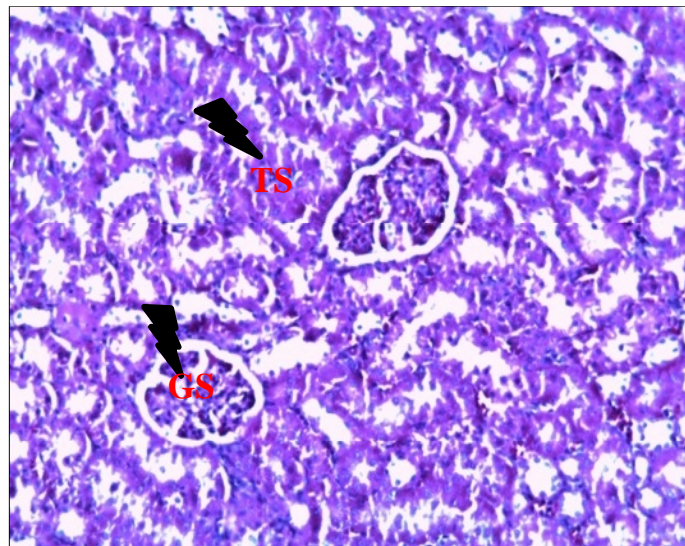
E : Rein d'un rat traité avec l'acide Valproïque (300mg/kg) (Début de nécrose (NC) au niveau des tubes rénaux (une liquéfaction)). (Gx400)



F : Rein d'un rat traité avec l'extrait *n*-butanol (50mg/kg) + VPA (300mg/kg) (Glomérule (GS) et tubes rénaux sains(TS)). (G x400)



G : Rein d'un rat traité avec l'extrait *n*-butanol (100mg/kg) + VPA (300mg/kg) (Glomérule (GS) et tubes rénaux sains (TS)). (G x400)

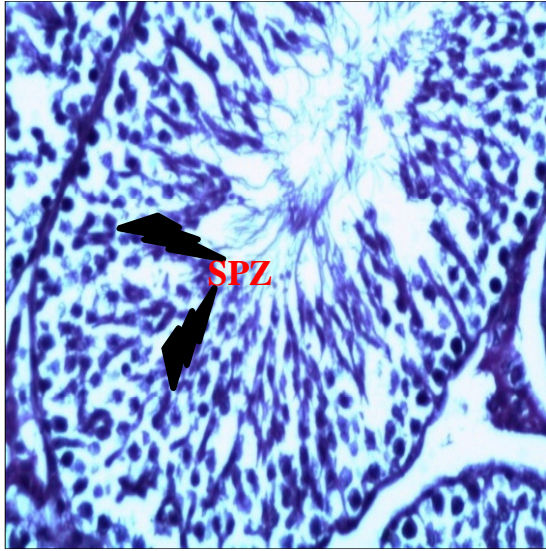


H : Rein d'un rat traité avec la vitamine E (100mg/kg) + VPA (300mg/kg) (Glomérule(GS) et tubes rénaux sains(TS)). (Gx400)

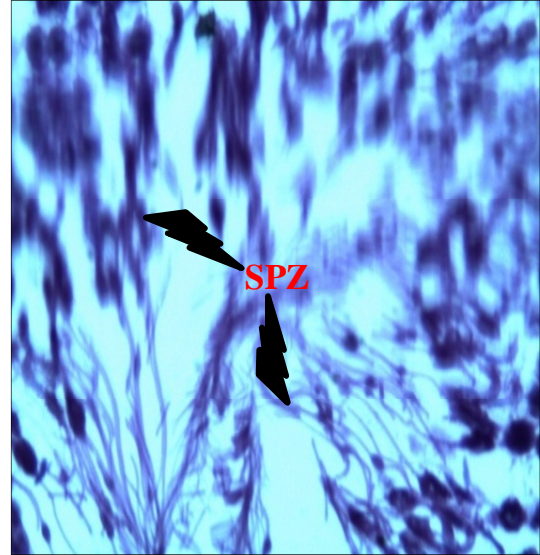
Figure 52 : Observation microscopique des coupes histologiques des reins des rats (G x400).

2.3.3. Au niveau des testicules

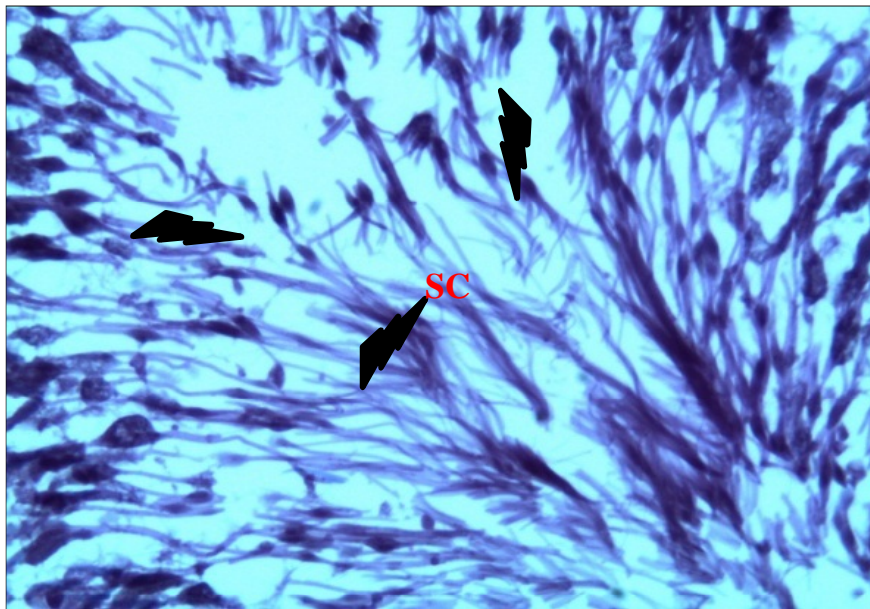
L'examen histologique des testicules des rats témoins (image A) montre des tubes séminifères avec spermatogénèse conservé jusqu'à maturation : stade de spermatozoïdes et des spermatozoïdes avec tête lancéolée et flagelle (image B) ainsi que chez les rats traités par la vitamine E (100mg/kg) où on observe des tubes séminifères avec spermatogénèse conservé (image C). Aussi bien Chez les rats traités par l'extrait *n*-butanol (50et 100mg/kg) on observe des Tubes séminifères avec spermatogénèse bien conservé (image D, E). Par contre les testicules des rats traités par le VPA (300mg/kg) montrent des malformations des spermatozoïdes (flagelle court) (image F) avec une absence totale des spermatozoïdes (image G). Le traitement des rats avec l'extrait *n*-butanol (50 et 100 mg / kg) (image H, I) et par la vitamine E (100mg/kg) (image J) en concomitance avec le VPA a grandement amélioré les lésions testiculaires où on remarque des tubes séminifères avec spermatogénèse presque conservé (Figure 53).



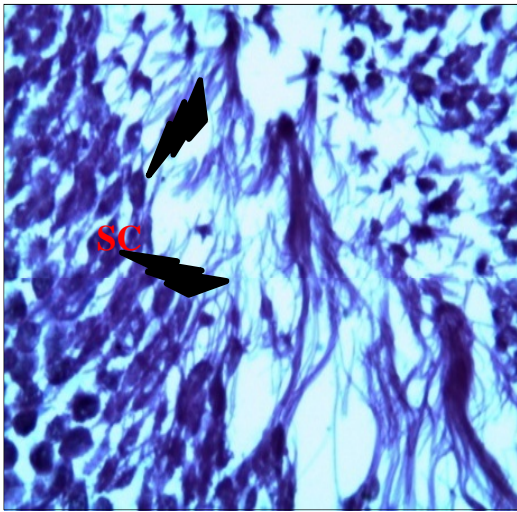
A : Testicule du groupe témoin (tubes séminifères avec spermatogenèse conservée jusqu'à maturation : stade de spermatozoïdes(SPZ)) (G× 100)



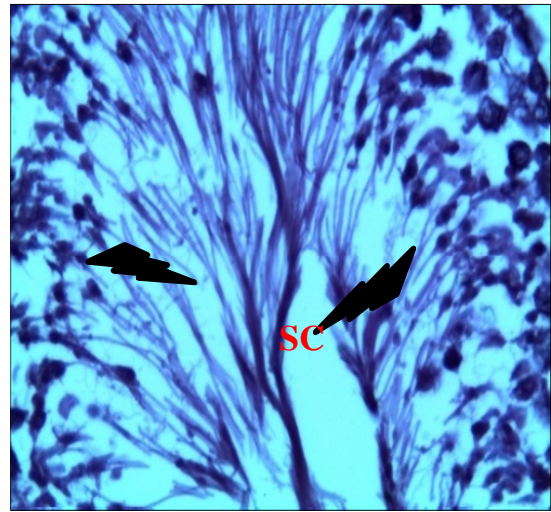
B : Testicule du groupe témoin (détail des spermatozoïdes avec tête lancéolée et flagelle (SPZ)) (G× 400)



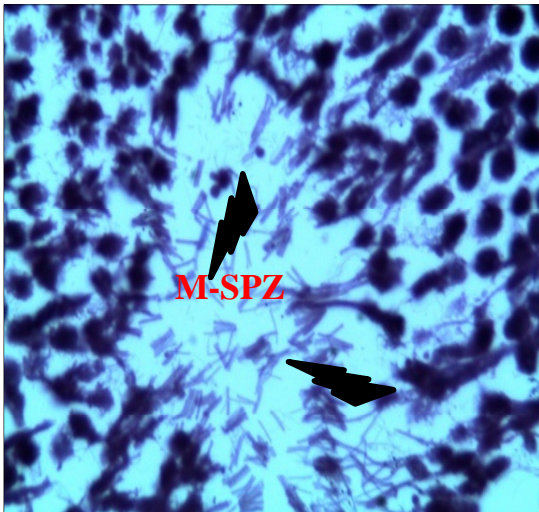
C : Testicule du groupe traité avec la Vit E (100mg/kg) : tubes séminifères avec spermatogenèse Conservée (SC) (G× 400).



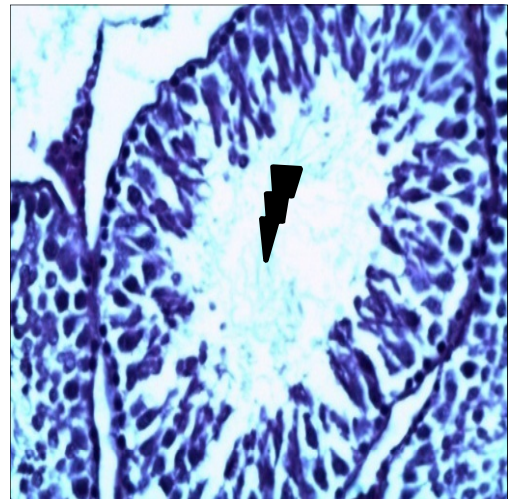
D : Testicule du groupe traité par l'extrait *n*-butanol à la dose (50mg/kg) (Tubes séminifères avec spermatogenèse bien conservée (SC). (G×400)).



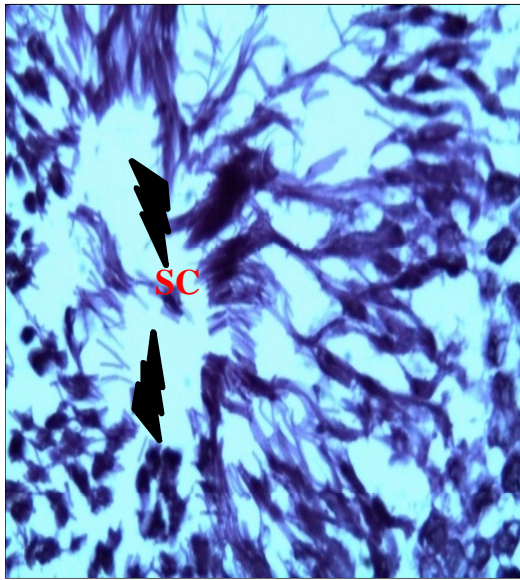
E : Testicule du groupe traité par l'extrait *n*-butanol à la dose (100mg/kg) (Tubes séminifères avec spermatogenèse bien conservée (SC). (G×400)).



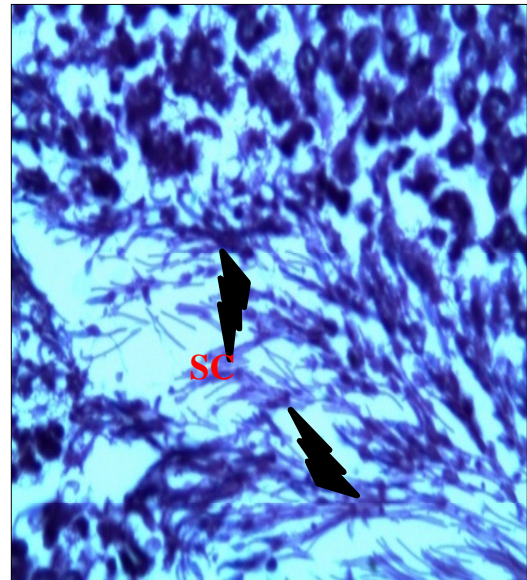
F : Testicule du groupe traité avec VPA (300mg/kg) : Malformation des spermatozoïdes (M-FPZ) (flagelle court) (G×400).



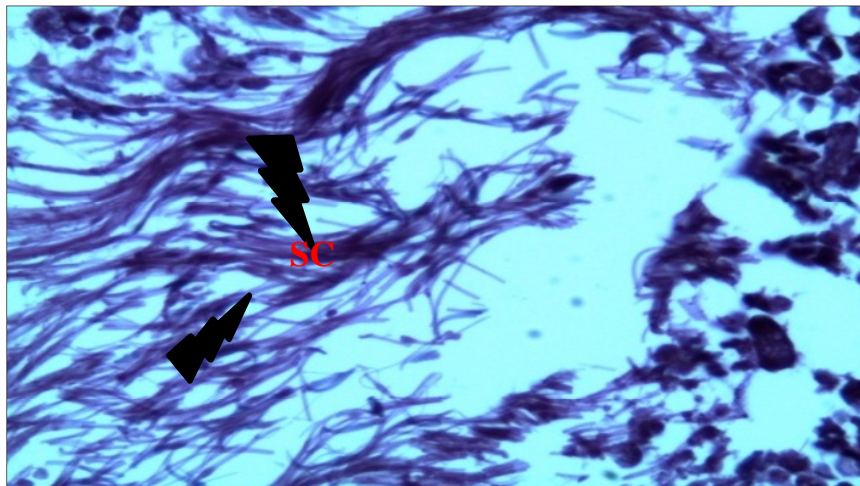
G : Testicule du groupe traité avec VPA (300mg/kg) Absence totale des spermatozoïdes. (G×100).



H : Testicule du groupe traité avec l'extrait (50mg/kg) + VPA (300mg/kg) : Tubes séminifères avec spermatogenèse presque conservée (SC) (G×400).



I : Testicule du groupe traité avec l'extrait (100mg/kg) + VPA (300mg/kg) : Tubes séminifères avec spermatogenèse presque conservée (SC). (G×400).



J : Testicule du groupe traité avec la vit E (100mg/kg) + VPA (300mg/kg) : Tubes séminifères avec spermatogenèse presque conservée (SC) (G×400).

Figure 53 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats (G x100, x400).

3. Discussion de l'étude expérimentale in vivo

L'acide valproïque a été utilisé dans le monde entier comme un médicament antiépileptique à large spectre avec des indications spécifiques pour de nombreuses formes d'épilepsie (Silva *et al.*, 2008). Néanmoins, avec les effets souhaités, le traitement par l'acide valproïque peut induire des effets secondaires tels que l'hépatotoxicité qui se caractérise par une stéatose (Eadie *et al.*, 1988 ; Natarajan *et al.*, 2006 ; Said et El-Agamy, 2010 ; Aires *et al.*, 2010) et une nécrose (Tong *et al.*, 2005 ; Kiang *et al.*, 2010), Atrophie testiculaire et anomalie du sperme (Nishimura *et al.*, 2000 ; Sveberg Roste *et al.*, 2002), hyperammonémique, pancréatite et tératogénicité (Perruca, 2002 ; Lheureux et Hantson, 2009) ainsi qu'une neurotoxicité (Gravemann *et al.*, 2008).

Il est admis que le VPA est presque uniquement métabolisé par le foie qui est l'organe cible dominant de la toxicité du valproate. Le sort métabolique du VPA est très complexe et conduit à la production de plus de 50 métabolites différents (Abbott et Anari, 1999).

L'un des indicateurs les plus sensibles et dramatiques de la lésion des hépatocytes est la libération d'enzymes intracellulaires telles que AST, ALT. L'augmentation des activités de ces enzymes dans le sérum pendant l'administration de VPA est donc révélatrice d'un dommage hépatocellulaire (Raza *et al.*, 2006). En effet l'évaluation de son risques toxicologiques est considérée une source de souci principal et doit prendre une très grande importance. Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea sphaerocephala* sur la toxicité provoquée par ce médicament (l'acide valproïque) au niveau du foie, rein, cerveau et testicules des rats.

Pour évaluer la toxicité engendrée par le VPA, le médicament est administré par voie orale à une dose de 300 mg/kg pendant 14 jours pour assurer une toxicité chronique chez les rats. Ce qui a causé une lésion hépatique, démontrée par une augmentation significative des taux plasmatiques des transaminases AST et ALT ($p < 0.001$) par rapport au groupe témoins et qui est donc révélatrice d'un dommage hépatocellulaire. Ceci pourrait aussi être due à l'hépatotoxicité qui mène à l'altération de la membrane plasmatisque. Donc la fuite des enzymes du tissu vers le plasma (Abdel-Reheim *et al.*, 2015). L'augmentation de l'activité enzymatique de ces enzymes est en accord avec les résultats de plusieurs recherches (Salli *et al.*, 1991 ; Tong *et al.*, 2003 ; Raza *et al.*, 2006). L'acide valproïque augmente généralement les taux de cholestérol total et des triglycérides (vidya et Subramanian, 2006). En effet, dans notre étude nous avons enregistré une augmentation significative ($p < 0.001$) du cholestérol et des triglycérides au niveau de plasma des rats traités par le VPA comparant aux rats témoins.

L'acide valproïque a également été documenté comme une cause majeure entraînant des changements dégénératifs dans les reins (Chang *et al.*, 2016). La créatinine est l'un des marqueurs de la fonction rénale qui est utilisés pour diagnostiquer des maladies rénales aiguës et chroniques (El-Shenawy *et al.*, 2016). Les résultats obtenus montrent qu'il y a eu une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux sérique en créatinine chez les rats traités par le VPA par rapport aux témoins. Cette augmentation est éventuellement liée à la toxicité de l'acide valproïque qui a induit des lésions rénales (El-Shenawy *et al.*, 2016). Ces effets sont semblables aux observations rapportées par Fukuda *et al.*, 1996 et Watanabe *et al.*, 2005. Puisqu'ils ont remarqué des anomalies de la créatinine chez les animaux et les patients recevant l'acide valproïque et que ce dernier à causer des dommages et un dysfonctionnement du rein.

D'après nos résultats on note que la concentration du glucose a été augmentée significativement ($p < 0.001$) après le traitement des rats par l'acide valproïque comparant aux témoins. Les travaux de recherche d'Amrani *et al.*, 2013 ont également démontré que l'administration de l'acide valproïque a provoqué une augmentation significative du glucose.

Le mécanisme exact de la toxicité induite par le VPA reste une source de débat (Tong *et al.*, 2005). Ces effets secondaires de VPA ont été démontrés dans de nombreuses études, mais les mécanismes cellulaires impliqués dans cet effet toxique n'ont pas encore été complètement élucidés (Binek *et al.*, 1991 ; Davis *et al.*, 1994 ; Oyesanmi *et al.*, 1999 ; Hamza et Amin 2007 ; Sokmen *et al.*, 2012).

Un certain nombre de recherche ont étudié la possibilité que le traitement par le VPA soit associé à un stress oxydatif chez les patients et dans les modèles animaux (Raza *et al.*, 1997) en raison de la surproduction d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui, à leurs tours, constituent un facteur de risque important pour les lésions tissulaires, le dysfonctionnement organique et la capacité antioxydantes compromise (Pippenger *et al.*, 1991 ; Pourahmad *et al.*, 2012). En plus de nombreuses recherches sur le métabolisme du VPA ont été stimulées par l'hypothèse selon laquelle son hépatotoxicité résulte de la formation de métabolites réactif toxique (Tang et Abbott, 1996) y compris 4-ene-valproate qui est catalysé par le CYP450 (Sadeque *et al.*, 1997; Kiang *et al.*, 2010) ainsi que N-acétylcystéine connu sous le nom de (E) -2,4-diène-VPA (Tang et Abbott, 1996 ; Kinag *et al.*, 2011; Surendradoss *et al.*, 2012) qui sont capable de diminuer la teneur en GSH dans le foie des rats (Kassahun *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1995 ;Gopaul *et al.*, 2000) et qu'ils sont éliminés dans les urines (Gopaul *et al.*, 2000). Ceci conduit à une déficience en antioxydants (Kassahun *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 2004 ; Vidya et Subramanian, 2006). Cet effet est prouvé par les résultats obtenus. Cependant on a observé une diminution significative des niveaux du GSH et

des activités enzymatiques du GPx et catalase ce qui explique l'augmentation significative ($p < 0.01$) du taux en MDA dans le foie des rats recevant l'acide valproïque par rapport aux rats témoins. Cette augmentation montre bien que l'acide valproïque est capable de promouvoir la formation excessive des radicaux libre qui se traduit par la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques (Raza *et al.*, 1997). Ce constat est susceptible d'expliquer les modifications histopathologiques et la fuite des transaminases hépatiques (ALT, AST) et leur passage dans le sang. Ces observations sont en accord avec plusieurs études (Na *et al.*, 2003 ; Defoort *et al.*, 2006 ; Fu *et al.*, 2010). De même (Sokmen *et al.*, 2012) ont rapportés que l'acide valproïque provoque une augmentation de la peroxydation lipidique et un appauvrissement du GSH dans le foie des rats (Tong *et al.*, 2005) (Yuksel *et al.*, 2001 ; Hamed *et al.*, 2004) ont rapporté une augmentation des taux plasmatiques de LPO chez les enfants et les adultes épileptiques qui avaient un traitement par le VPA, aussi Cengiz *et al.*, 2000 ont proposé que la thérapie par l'acide valproïque chez les enfants atteints d'épilepsie a été associée avec une diminution modérée des taux de GSH dans les érythrocytes. En plus, sur la base de rapports initiaux chez des patients traités par le VPA, l'accumulation des ROS a été proposé comme un mécanisme potentiel d'hépatotoxicité associée au VPA, indiquant une diminution des activités des enzymes antioxydantes (Exp., Glutathion peroxydase) (Pippenger *et al.*, 1991) et des niveaux réduits des oligo-éléments (Exp., Le sélénium) qui servent comme cofacteurs pour les enzymes antioxydantes (Liu *et al.*, 1998 ; Wilder et Hurd, 1991).

Le stress oxydatif cellulaire rénal se produit souvent lors de l'apparition du déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants (Sung *et al.*, 2013). La peroxydation lipidique est probablement le produit le plus largement considéré créer par les radicaux libres et qui est donc considéré comme un excellent biomarqueur du stress (Messaoudi *et al.*, 2009). Durant l'exposition des rats à l'acide valproïque, nos résultats révèlent que ce médicament a provoqué une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux en MDA au niveau des reins ainsi qu'une diminution dans le taux des antioxydants (GSH et l'activité enzymatique du GPx et CAT). Cette augmentation est liée éventuellement avec la toxicité de l'acide valproïque qui induit des troubles rénaux caractérisés par la production du MDA et l'épuisement du GSH. Ces données sont compatibles avec des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques reconnus suite à l'induction de l'acide valproïque chez le rat et l'homme (Nau *et al.*, 1992 ; Kassahun *et al.*, 1994). En effet, les travaux de Raza *et al.*, 1997 ont montré que le taux du MDA a été augmenté dans les reins des rats males après le traitement par l'acide valproïque avec une diminution du niveau de GSH. Tabatabaei et Abbott ,1999 ont rapporté que l'activité cytotoxique de l'acide valproïque est le

résultat de la génération de peroxyde d'hydrogène et de la production de radicaux hydroxyles hautement réactifs, cela pourrait être la raison de l'augmentation du niveau de LPO et de la diminution de l'activité enzymatique (SOD, CAT et GPx) et la capacité antioxydantes totale des rats.

Le cerveau est particulièrement sensible au stress oxydatif car il utilise la plus grande quantité d'oxygène par rapport aux autres organes corporels. Le cerveau contient également des concentrations élevées d'acides gras polyinsaturés qui sont susceptibles d'être la cause de la peroxydation lipidique qui est également une cause importante de dommages neuronaux. Il est aussi riche en fer, ce qui peut catalyser la formation de radicaux hydroxylés et qui est faible dans l'activité CAT (Halliwell, 1999 ; Jellinger, 2003 ; Mariani *et al.*, 2005 ; Pederzolli *et al.*, 2010). L'augmentation des radicaux libres dans cet organe pourrait aussi provoquer une dégénérescence neuronale par la peroxydation des lipides membranaires (Cengizu *et al.*, 2000). Nos résultats ont montré une augmentation significative du taux en MDA ($p < 0.001$) dans le cerveau des rats suite au traitement par l'acide valproïque comparativement aux témoins. Cette augmentation peut être attribuée à l'inactivation d'enzymes antioxydantes dans le cerveau qui est due au stress oxydatif. Ces résultats sont en concordance avec les résultats de (Leipnitz *et al.*, 2010 ; Chaudhary et Parvez, 2012). Ils ont constaté que les acides gras polyinsaturés provoquaient une induction significative des contenus LPO dans le cervelet ainsi que dans le cortex cérébral du cerveau des rats.

Les testicules étant particulièrement sensibles au stress oxydatif (Tomascik-Cheeseman *et al.*, 2004). L'administration à long terme de l'acide valproïque est connue pour favoriser une déficience reproductive médiée par l'augmentation du stress oxydatif testiculaire et une anomalie du sperme (Nishimura *et al.*, 2000 ; SvebergRoste *et al.*, 2002). Le VPA peut aussi provoquer une toxicité des cellules germinales qui est associée aux lésions de l'ADN du sperme et au stress oxydatif au niveau des testicules (Khan *et al.*, 2011).

Les testicules et les spermatozoïdes sont très riches en acides gras polyinsaturés, ce qui augmente leur susceptibilité à l'attaque par des espèces réactives d'oxygène (ROS) et par conséquent des dommages oxydatifs (Agarwal *et al.*, 2006 ; Aitken et Baker, 2006 ; Aitken et Roman, 2008). Dans la présente étude, nous avons noté une augmentation significative du taux en MDA testiculaire ($p < 0.001$) après l'administration du VPA par rapport aux témoins. Ces résultats concordent avec ceux de nombreuses autres études (Sakr *et al.*, 2014 ; Vidya et Subramanian, 2006 ; Hamza et Amin, 2007) qui ont démontré que le traitement des rats par l'acide valproïque a entraîné une augmentation significative du Malondialdéhyde et une diminution significative des taux d'antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase [SOD], CAT et

glutathion peroxydase [GPx]) et non enzymatiques (glutathion [GSH]) au niveau des testicules, ce qui suggère que ces dommages induits chez les rats peuvent être attribués au stress oxydatif généré par le VPA. De même, il a été décrit que l'effet négatif du VPA sur le système reproducteur masculin est associé au stress oxydatif, ce qui est clairement une des principales causes de la fonction défectueuse du sperme et de la stérilité masculine (Aitken et Roman, 2008 ; Kao *et al.*, 2008).

Il existe un certain nombre d'études suggérant que la génération excessive d'intermédiaires de radicaux libres est associée au VPA, éventuellement en conséquence de la biotransformation de VPA, des altérations de l'homéostasie du glutathion (Tang *et al.*, 1995 ; Seckin *et al.*, 1999) et / Ou l'épuisement des cofacteurs requis pour la défense antioxydantes (Graf *et al.*, 1998).

Il est bien connu que GSH est impliqué dans la protection et la fonction de la structure cellulaire normale en maintenant l'homéostasie redox, en éteignant les radicaux libres et en participant à des réactions de désintoxication (Cakmak *et al.*, 2015). Cette étude montre que l'acide valproïque provoque une diminution significative ($p < 0.001$) des niveaux du GSH dans les organes : foie, rein, cerveau et testicules chez les rats par rapport aux témoins.

L'épuisement significatif du taux du GSH confirme le potentiel de l'acide valproïque d'induire un stress oxydant dans les différents organes. Des résultats similaires ont été également rapportés dans les différents organes suite à l'exposition au VPA (Aycicek *et al.*, 2007 ; Rani et Chandravadana, 2008 ; Bairy *et al.*, 2010 ; Kiang *et al.*, 2011 ; Saber *et al.*, 2014 ; Amrani *et al.*, 2013 ; Amrani *et al.*, 2016 ;).

Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de la défense cellulaire contre les différentes espèces oxydantes. Ces enzymes regroupent plusieurs familles, parmi lesquelles figurent GPx et la CAT.

La plupart des enzymes antioxydantes deviennent inactives en raison de l'exposition au VPA (Kiang *et al.*, 2011), la diminution de ces enzymes peut augmenter la vulnérabilité des tissus au stress oxydatif en raison du déséquilibre entre les antioxydants et les oxydants.

Dans notre travail l'évaluation du système enzymatique antioxydant a mis en évidence une diminution significative de l'activité du GPx ($p < 0.001$) dans les organes foie, rein, cerveau et testicules ainsi que dans l'activité du CAT au niveau du foie et des reins ($p < 0.01$) respectivement après l'exposition au VPA chez les rats comparativement aux témoins, ce qui montre l'effet perturbateur de l'acide valproïque sur le système enzymatique antioxydant dans les différents organes. Nos résultats sont en accord avec les autres rapports publiés (Baran *et al.*

,2004 ;Chaudhary et Parvez, 2012 ; El-Shenawy et Hamza, 2016 ;, Al-Amoudi, 2016) qui indiquent que la diminution de l'activité du GPx et CAT est corrélée avec le traitement par l'acide valproïque.

Des résultats obtenus par (Cotariu *et al.*, 1990) ont montré que l'administration de l'acide valproïque par voie intra péritonéale (100-750m /kg) a provoqué une diminution de l'activité du GPx dans l'homogénat du foie des rats, aussi (Oktay *et al.*, 2015) ont signalé une diminution de l'activité du GPx chez des patients traités par le VPA.

Dans notre étude, on a également noté des changements histologiques du foie des rats recevant l'acide valproïque caractérisés par une congestion vasculaire, stéatose ainsi qu'un phénomène de nécrose cellulaire comparativement aux témoins. L'installation de changement de l'histoarchitecture du foie pourrait être due essentiellement à un effet toxique de l'acide valproïque qui touche la structure des hépatocytes. Ces études sont en accord avec d'autres qui ont montré des changements histopathologiques des hépatocytes après exposition au VPA (Khan *et al.*, 2005 ; Isharwal *et al.*, 2009 ; Al-Amoudi, 2016 ;). Les études de (Raza *et al.*, 2000) ont rapportés que le traitement des souris avec de l'acide valproïque induit une dégénérescence graisseuse des hépatocytes, un gonflement et un nombre accru de cellules kupffer.

L'acide valproïque a également causé des changements histologiques marqué dans le rein des rats par rapport aux témoins. Les signes les plus importants étaient le début de nécrose au niveau des tubes rénaux ainsi qu'une liquéfaction. Des résultats similaires ont été décrits par (Galaly *et al.*, 2016). Il a été également observé une perturbation tubulaire surtout dans les tubules proximaux, la nécrose dans les zones glomérulaires et tubulaires, l'accumulation de fibres de collagène dans les zones nécrotiques et l'infiltration de cellules mononucléaires dans le tissu rénal de rats traités avec le VPA (500 mg/kg / jour) pendant 15 jours (Gezginci-Oktayoglu *et al.*, 2016).

Cette étude a également montré une anomalie de l'histologie des testicules chez les rats traités par l'acide valproïque comparativement aux témoins. En effet, une diminution du nombre de spermatozoïdes et augmentation des anomalies de la tête du sperme a été observée ainsi qu'une diminution significative des tubules séminifères et leurs diamètres de hauteurs épithéliales a été enregistrés. Ces données concordent avec les études cliniques indiquant que le traitement par le VPA à long terme est associé à une mauvaise qualité du sperme chez les humains, en particulier la motilité altérée (Ourique *et al.*, 2016) (Bairy *et al.*, 2010). Une autre étude a conclu que le valproate de sodium provoque une modification réversible de la motilité du sperme, du nombre de spermatozoïdes, de la morphologie et de la cytoarchitecture des testicules.

En revanche, le traitement des rats par l'extrait butanolique de la plante *Centaurea Sphaerocephala* a entraîné une amélioration des effets délétère de ce médicament notamment la

variation des paramètres biochimiques, paramètres de stress ainsi que l'histoarchitecture des différents organes étudiés chez le rat.

Dans nos conditions expérimentales, l'addition de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) aux rats traités par l'acide valproïque a engendré une diminution significative de l'activité de l'AST et l'ALT comparant aux rats traités par le VPA ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) respectivement. En effet, l'extrait butanolique de la plante a pu stabiliser la membrane cellulaire hépatique contre les effets toxiques de l'acide valproïque. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par (Rani et Chandravadana, 2008) qui ont montré que le traitement par la plante *Spirulina fusiformis* a considérablement diminué l'activités des transaminases dans le sérum des rats en diminuant les niveaux de peroxydation des lipides dans le plasma. Suggérant qu'elle offre une protection en préservant l'intégrité structurale de la membrane hépatocellulaire contre l'hépatotoxicité et le stress oxydatif provoqués par l'acide valproïque. Les travaux de recherche de (Jassim, 2013) ont montré l'effet hepatoprotecteur de *Petrose linumcrispum* vis-à-vis la toxicité induite par le VPA. Une amélioration significative a été notée dans les taux de cholestérol et triglycéride chez les rats traités par l'extrait butanolique de la plante (50mg/kg et 100mg/kg). Ces résultats concordent avec les travaux de (Vidya et Subramanian, 2006).

L'administration de l'extrait butanolique de la plante aux rats traités par le VPA a restauré la concentration plasmatique de la créatinine. Ce résultat peut être due, soit à l'activité antioxydante remarquable de cette plante, soit à ces actions bénéfiques au niveau des reins. En effet, l'extrait butanolique de la plante a pu protéger les reins des rats contre les effets néfastes de l'acide valproïque. Ces résultats sont en accord avec l'étude de (Al-Amoudi, 2016).

D'après les résultats obtenus, l'administration de l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) a réduit de manière significative le taux du MDA dans les différents organes des rats : foie, rein, cerveau et testicules comparativement aux rats traités par le VPA. Cela révèle la capacité de la plante administrée simultanément avec le VPA d'atténuer les dommages causés par l'acide valproïque. Ces observations sont en bon accord avec d'autres recherches où il a été prouvé l'effet protecteur des différents extraits des plantes contre les dommages oxydatifs causés par le VPA. En effet, (Abdel-Wahab et Metwally, 2011) ont montré le rôle de l'extrait de la plante *Ginkgo biloba* avec les deux doses (25 et 50mg/kg) dans la prévention du stress oxydatif qui est due au traitement par le VPA à la dose 200mg/kg. Cet effet est caractérisé par une diminution du taux d'MDA et une augmentation des niveaux du GSH et l'activité du GPx au niveau du cerveau des rats. Les travaux de Saber *et al.*, 2014 ont expliqué qu'un extrait du safran (*Crocus sativus*L) entraîne une diminution significative du taux d'MDA et

une augmentation significative des enzymes antioxydantes dans les testicules des rats recevant l'acide valproïque.

Après le traitement des rats par l'extrait butanolique de la plante *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) le taux du GSH est nettement augmenté dans tous les organes étudiés comparativement aux rats traités par le VPA. Cette amélioration de la teneur en GSH en présence de l'extrait butanolique est en accord avec l'étude de (Said et El-Agamy, 2010) qui a été réalisé pour évaluer la capacité du Curcumin et resveratrol à prévenir l'hépatotoxicité induite par le VPA.

L'activité enzymatique de GPx et CAT a été également amélioré dans les différents organes des rats recevant l'extrait butanolique de la plante (50mg/kg, 100mg /kg) comparativement aux rats traités par le VPA. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Morsy *et al.*, 2017) qui ont révélé que le traitement par l'extrait de *Nigella Sativa* a amélioré significativement les niveaux élevés de biomarqueurs neurotoxiques et hépatotoxiques qui ont été élevés en raison de l'administration de VPA. En outre, le traitement par l'extrait de NSO a amélioré la concentration antioxydante non enzymatique, la concentration de peroxydation des lipides et des lipides hépatiques (LPO), le glutathion (GSH), l'activité enzymatique antioxydante et la catalase(CAT) du foie et du cerveau.

Nos résultats ont prouvé que l'addition de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100 mg /kg) aux rats traités par le VPA a entraîné une amélioration significative dans l'histoarchitecture des organes étudiés : foie, rein et testicules. Cette amélioration est due vrai semblablement à l'effet protecteur de l'extrait de la plante contre la toxicité du VPA. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Raza *et al.*, 2006) qui ont expliqué le rôle bénéfique de la Timoquinone qui est le principal constituant actif de l'huile volatile obtenue à partir de différentes espèces de *Nigella sativa* contre les dommages toxiques causé par le VPA et qui ont indiqué que la Timoquinone se comporte comme un antioxydant et protège le foie contre les effets néfastes de ce médicament.

Un tel résultat a été signalé aussi par (Rani et Chandravadana, 2008) et leurs collaborateurs qui ont montré l'effet protecteur des algues bleue *Spirulina fusiformis* contre l'hépatotoxicité et le stress oxydatif provoqués par le VPA chez les rats.

L'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. sphaerocephala* est attribué à la présence des phénols et flavonoïdes, ce qui permet d'avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes.

Afin de surmonter l'effet nocif potentiel des radicaux libres et de réduire les dommages causés par l'acide valproïque, de nombreuses substances naturelles ont été essayées comme antioxydants.

La vitamine E représente l'une des ressources naturelles les plus fascinantes qui ont le potentiel d'influencer un large éventail de mécanismes sous-jacents à la santé humaine et à la maladie (Catalgol et Ozer, 2012). En outre, la Vit E peut minimiser efficacement le stress oxydatif, la peroxydation lipidique et les effets toxiques des espèces réactives d'oxygène dans les systèmes biologiques (Claycombe et Meydani, 2001).

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que le prétraitement des rats par la Vit E (100mg/kg) a réduit de manière significative l'activité enzymatique de l'AST et l'ALT ($p < 0.001$) par rapport aux rats traité par le VPA. Ces résultats concordent avec la recherche de Abdou *et al.*, 2014. On a également noté un rétablissement par une diminution significative du taux de cholestérol et triglycérides ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) respectivement chez les rats prétraités par la Vit E(100mg/kg) comparativement aux rats recevant le VPA, cet effet a été également enregistré au niveau de la créatinine où nous avons noté une diminution significative ($p < 0.01$) comparativement aux rats traités par le VPA. Il a été aussi démontré que la Vit E (100mg/kg) a diminué significativement ($P < 0.001$) la concentration du glucose par rapport aux rats traités par l'acide valproïque.

Nos résultats montrent également que le prétraitement des rats par la Vit E(100mg/kg) a diminué le taux du MDA au niveau du foie ($p < 0.01$), rein, cerveau et testicules ($p < 0.001$) comparativement aux rats traités par le VPA. En effet, Les antioxydants protègent les cellules des dommages causés par les radicaux libres qui sont des sous-produits naturels du métabolisme de l'oxygène. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Baran *et al.*, 2004 ; Aly *et al.*, 2009) qui ont montré l'effet protecteur de la Vit E contre la toxicité induite par le VPA.

Les niveaux de GSH étaient significativement augmentés chez les rats prétraités par la Vit E (100mg/kg) dans les différents organes comparativement aux rats traités par le VPA (Na *et al.*, 2003 ; Spaniol *et al.*, 2003) ont expliqué que la toxicité du VPA peut être diminuer ou même disparu, en raison de l'utilisation d'un agent antioxydant comme la Vit E.

Le prétraitement des rats la Vit E (100mg/kg) a amélioré l'activité enzymatique de GPx et CAT dans les différents organes étudiés.

L'étude actuelle a révélé que la Vit E (100mg/kg) a pu protéger les différents organes des rats des changements morphologiques observés chez les rats traités par l'acide valproïque. Ces résultats concordent avec la recherche de (Baran *et al.*, 2004 ; Aktas *et al.*, 2010).

Conclusion :

Dans la présente étude l'extrait *n*-butanol et acétate d'éthyle de la plante *Centaurea sphaerocephala* révèlent des propriétés antioxydantes puissantes due à la présence d'un contenu élevés des polyphénols et flavonoïdes. Ces composés s'avèrent d'un pouvoir anti cancéreux et anti radicalaire important comparés à la vitamine C.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Le traitement des rats par l'acide valproïque a provoqué :

- ✓ Une augmentation significative de la peroxydation lipidique signalée suite à une détermination du taux d'MDA tissulaire ainsi qu'une diminution significative du taux de GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, GPx).
- ✓ des changements notables des paramètres biochimiques caractérisés surtout par une élévation de la concentration de la créatinine et la glycémie ainsi que le taux de cholestérol, des triglycérides. Aussi bien on a constaté une augmentation de l'activité des aminotransferase (AST, ALT) qui sont libérés une fois que les cellules hépatiques lésées et leurs membranes perforées.
- ✓ Des altérations tissulaires des différents organes étudiés (foie, rein et testicules). C'est-à-dire l'histoarchitecture des différents tissus étudiés : hépatique, rénale et testiculaire.

-Le prétraitement des rats par l'extrait butanolique de la plante a permis de :

- ✓ Rétablir les paramètres biochimiques à leurs valeurs normales.
- ✓ Améliorer les paramètres antioxydants.
- ✓ Réduction du pourcentage des changements morphologiques provoqué par le VPA.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références :

Abay G., Altun M., Koldas S., Tufekci AR., Demirtas I. (2015). Determination of Antiproliferative Activities of Volatile Contents and HPLC Profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb. Chem. High T. Scr.* 5: 453-463.

Abdella EM., Galaly SR., Mohammed HM., Khadrawy SM. (2014). Protective role of vitamin E against valproic acid-induced cytogenotoxicity and hepatotoxicity in mice. *The Journal of Basic & Applied Zoology*; 67:127–139.

Abdel-Reheim ESM., Ahmed OM., Ashour MB., Ahmed WH. (2015). The chemopreventive effects of onion and garlic oils against valproic acid-induced toxicity. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences* ;3: 036-046.

Abdel-Wahab BA., Metwally ME. (2011). Ginkgo biloba enhances the anticonvulsant and neuroprotective effects of sodium valproate against kainic acid induce seizures in mice. *Journal of pharmacology and toxicology*; 6(8): 679-690.

Abdou SF., El -Wakeel M., El-Said MH. (2014). Protective effect of *Silymarin* and Vitamine E in hepatotoxicity induced by valproic acid in albino's rats. *J. Med.Sci*;14(6-8):290-296.

Abbott FS., Anari MR. (1999). Chemistry and biotransformation. *Milestones in Drug Therapy-Valproate*, ed. by W. Loscher; 47-75.

Aclinou P., Boukerb A., Bouquant J., Massiot G. (1982). Le Men-Olivier, L. Plantes des Aures: constituants des racines de *Centaurea incana*. *Plant. Med. Phytother.*; 16: 303-309.

Agarwal A., Gupta S., Sikka S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18, 325-332.

Aguirre L., Portillo MP, Hijona E., Bujanda L. (2014). Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* ; 20(23): 7366–7380.

Aires CCP., IJlst L., Stet F., Prip-Buus C., Almeida IT., Duran M., Wanders RJA., Silva MFB. (2010). Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochemical Pharmacology*; 79: 792–799.

Aitken RJ., Roman SD. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell Longev*; 1: 15-24.

Aitken RJ., Baker MA. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol. Cell Endocrinol* ;250: 66-69.

Aktas A., Nergiz Y., Akkus M., Nasir Y. (2010). The effects of valproic acid on renal corpuscle of pregnant rats and protective role of folic acid and vitamin E. *African Journal of Biotechnology*; 9(34): 5605-5610.

- Al-Amoudi WM. (2016).** Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*.pp :1-10.
- Alapetite GP. (1981).** *Flore de la Tunisie*. Tunis : Imprimerie Officielle de la République Tunisienne : p. 1060
- Albayra S., Atasagun B., Aksoy A. (2017).** Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. obtained by three extraction techniques. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 1-8.
- Altunbasak S., Yldızdas D., Anarat A., Burgut HR. (2001).** Renal tubular dysfunction in epileptic children on valproic acid therapy. *Pediatr Nephrol*; 16:256-9.
- Aly FA., Hassan NH., Farghaly AA., Elsherbiny KM., Salman AS. (2009).** Antimutagenesis of vitamin AD3E mixture to mutations induced by flouroquinolone drug ciprofloxacin on mice. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 7 (1), 35–43.
- Amawi H., Ashby CRJ., Samuel T., Peraman R., Tiwari AK. (2017).** Polyphenolic Nutrients in Cancer Chemoprevention and Metastasis: Role of the Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) Pathway. *Nutrients*; 9 (911):1-23.
- Ambrogini P., Betti M., Galati C., Palma MD, Lattanzi D., Savelli D., Galli F., Cuppini R., Minelli A. (2016).** Tocopherol and Hippocampal Neural Plasticity in Physiological and Pathological Conditions. *Int. J. Mol. Sci*; 17:1-32.
- Amrani A., Benaissa O., Boubekri N., Biod K., Djabbari R., Beroal N, Zama D., Benayache F., Benayache S. (2016).** Impact of *Chrysanthemum fontanesii* extract on sodium valproate mediated oxidative damage in mice kidney. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 6 (04); 067-071.
- Amrani A., Benaissa O., Boubekri N., Zama D., Benayache F., Benayache S. (2013).** Valproic acid induced liver toxicity and oxidative damage in pregnant mice: The protective effect of *n*-butanol extract from flowers of *Chrysanthemum* antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine*.2001 ; 8(2) :125-132.
- Amrani A. (2013).** L'effet Protecteur Des Vitamines E, C Et Des extraits Butanolique Des Deux Plantes *Chrysanthemum fontanesii* et *Rhantherium suaveolens* vis-à-vis d'une Toxicité Provoquée par Valproate de Sodium Chez Les Souris en Gestation. Etude In Vivo et In Vitro. Thèse de doctorat Université Mentouri Constantine.
- Apostolova N., Victor V.M. (2015).** Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxid. Redox Signal*;22(8) :686–729.
- Arif R., Küpeli E., Ergun F. (2004).** The biological activity of *Centaurea* L. species (Review). *GU J. Sci*; 17(4): 149-164.
- Ayala A, Muñoz MF., Argüelles S. (2014).** Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal; 2014:1-31.
- Aycicek A., Iscan A. (2007).** The Effects of Carbamazepine, Valproic Acid and Phenobarbital on the Oxidative and Antioxidative Balance in Epileptic Children. *Eur Neurol*; 57 :65–69.

- Azzouzi D. (2017).** Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae). Thèse présentée à la Faculté des Sciences Exactes Département de Chimie Pour l'Obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences En Chimie Organique.
- Baba M., Karakaş M., Aksungur VL. (2003).** The anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*;17(4):399–401.
- Bairy L., Paul V., Rao Y. (2010).** Reproductive toxicity of sodium valproate in male rats. *Indian J Pharmacol* ;42 :90-94.
- Banerjee A., Dasgupta N., De B. (2005).** In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*; 90: 727–733.
- Baran P., Yıldırım A., Akkuş M. (2004).** The protective role of folic acid and vitamin E against toxicological effects of valproic acid on liver tissue during period of gestation. *Dicle tıp dergisi*; 31(4): 17-23.
- Barrera G. (2012).** Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology* ;2012 :1-21.
- Basli A., Soulet S , Chaher N ., Mérillon JM ., Chibane M. , Monti J.P., Richard T .(2012).** Wine Polyphenols: Potential agents in neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev* ; 2012: Article ID 805762, 14 pages.
- Bastos MS., Kijjoa A., Cardoso JM., Gutiérrez AB., Herz W. (1990).** Lignans and other constituents of *Centaurea sphaerocephala ssp. polyacantha*. *Planta Med*; 56:403-405.
- Bayer E., Buttler KP., Finkenzeller X., Grau J. (1989).** *Plantas del Mediterráneo*. Barcelona:Omega. ISBN 84-7031-629- X.
- Baytop T. (1999).** Türkiyé de Bitkilerile Tedavi (*Geçmişteve Bugün*). Istanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: p. 316.
- Bédry R., Parrot F. (2004).** Intoxication graves par l'acide valproïque. *Service de réanimation* ;13 :324-333.
- Begrice K., Massart J., Robin MA., Borgne-Sanchez A., Fromenty B. (2011).** Drug- induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol*; 54: 773–794.
- Begrice K., Igoudjil A., Pessayre D., Fromenty B. (2006).** Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*; 6: 1–28.
- Belcastro V., D'Egidio C., Striano P., Verrotti A. (2013).** Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment. *Epilepsy Res* ;107 :1–8.
- Bensouna A. (2014).** Composition chimique et propriétés biologiques de l'huile essentielle *Centaurea acaulis L* (Nagour). Thèse de master en chimie, pp :44.

- Bentamene A., Baz M., Boucheham R., Benayache S., Creche J., Benayache F. (2008)**. Flavonoid aglycones from *Centaurea sphaerocephala* L. Chem. Nat. Compd; 44(2): 234-235
- Bentamene A., Boucheham R., Baz M., Benayache S., Creche J., Benayache F. (2010)**. Flavonoid glucosides from *Centaurea sphaerocephala* L. Chem. Nat. Compd; 46(3): 452-453
- Bergmeyer HU., Scheibe P., Wahlefeld AW. (1978)**. Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Clin. Chem;24: 58-73.
- Bernardy CCF., Zarpelon AC., Pinho-Ribeiro FA., Calixto-Campos C., Carvalho TT., Fattori V., Borghi SM., Casagrande R., Verri JWA. (2017)**. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice .BioMed Research International: 15 pages.
- Berson A., De Beco V., Lettéron P., Robin MA., Moreau C., El Kahwaji J., Verthier N., Feldmann G., Fromenty B., Pessayre D. (1998)**. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. Gastroenterology; 114(4):764-774.
- Bhattacharya S. (2015)**. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. Springer India, pp.17-29.
- Bhullar KS., Vasantha Rupasinghe HP. (2013)**. Polyphenols: Multipotent Therapeutic Agents in Neurodegenerative Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity; 2013:1-18.
- Bi C., Ma Y., Wu Z., Yu YT., Liang S., Lu K., Wang XF. (2017)**. Arabidopsis ABI5 plays a role in regulating ROS homeostasis by activating catalase1 transcription in seed germination. Plant Mol Biol ; 94 :197–213.
- Bicha S. (2011)**. Isolement et détermination de métabolites secondaires à activité biologique potentielle de plantes de la famille des composés.
- Binek J., Hany A., Heer M. (1991)**. Valproic-acid-induced pancreatitis: Case report and review of the literature. J. Clin. Gastroenterol. 13, 690–693.
- Birben E., Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012)**. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J; 5:9–19.
- Bolanos JP., Medina JM. (1997)**. Effect of valproate on the metabolism of the central nervous system. life Sici; 60:1993-1942.
- Bonnet C., Alamigeon F., Micheels P. (2010)**. Guide complet des soins esthétiques : du côté de ma vie. Edition Eyrolles, p 14.
- Braca A., De Tommasi N., Di Bari L., Pizza C., Politi M., Morelli I. (2001)**. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. Journal of Natural products. 64:892-895.
- Brandt C., Gastens AM., Sun MZ., Hausknecht M., Loscher W. (2006)**. Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. Neuropharmacology ;51, 789–804.

- Bruno M, Fazio C, Passananti S, Paternostro MP., Herz W. (1994).** Sesquiterpene lactones from *Centaurea sphaerocephala* ssp. *Phytochemistry*; 35(5):1371-1372.
- Cakmak HN, Yanardag R. (2015).** Edaravone, a free radical scavenger, protects liver against valproic acid induced toxicity. *J. Serb. Chem. Soc*; 80 (5) 627–637.
- Candas D., Li JJ. (2014).** MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. *Antioxid. Redox Signal* ;20: 1599–1617.
- Cansu A., Ekinci O., Serdaroglu A., Gulsen S., Ekinci O., Erdogan D., Coskun Z K., Tunc L. (2011).** Effects of chronic treatment with valproate and oxcarbazepine on testicular development in rats. *Seizure*;20: 203–207.
- Carballal S., Bartesaghi S., Radi R. (2015).** Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta*; 1840(2):1-32.
- Cárdenas-Rodríguez N., Coballase-Urrutia E., Rivera-Espinosa L., Romero-Toledo., Sampieri A., Ortega-Cuellar D., Montesinos-Correa H., Floriano-Sánchez E., Carmona-Aparicio L. (2013).** Modulation of Antioxidant Enzymatic Activities by Certain Antiepileptic Drugs (Valproic Acid, Oxcarbazepine, and Topiramate): Evidence in Humans and Experimental Models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2013:1-8.
- Case AJ. (2017).** On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*; 6(4): 82.
- Cassidy A., Minihane AM. (2017).** The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr*; 105 :10–22.
- Catalgol B., Ozer NK. (2012).** Protective effects of vitamin E against hypercholesterolemia-induced age-related diseases. *Genes Nutr*; 7: 91–98.
- Cengiz M., Yukcel A., Seven M. (2000).** The effects of carbamazepine and valproic acid on the erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children. *Pharmacol. Res* ; 41 : 423–425.
- Chabory E. (2009).** Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II ; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I.
- Chang R., Chou MC, Hung LY, Wang ME., Hsu MC, Chiu CH. (2016).** Study of Valproic Acid-Enhanced Hepatocyte Steatosis. *BioMed Research International*. PP: 1-11.
- Chang T.K.H., Abbott F.S. (2006).** Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev*, 38: 627–639.
- Chateauvieux S., Eifes S., Morceau F., Grigorakaki C., Schnekenburger M., Henry E., Dicato M., Diederich M. (2011).** Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway. *Biochemical Pharmacology*; 81 :498–509.

- Chateauvieux S., Morceau F., Dicato M., Diederich M. (2010).** Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J Biomed Biotechnol*; 479-364.
- Chaudhary S., Ganjoo P., Raiusddin S., Parvez S.(2015).** Nephroprotective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid. *Protoplasma*; 252:209–217.
- Chaudhary S., Parvez S. (2012).** An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience*; 225 :258–268.
- Chen AY., Lü JM., Qizhi Y., Changyi C. (2016).** Entacapone is an Antioxidant More Potent than Vitamin C and Vitamin E for Scavenging of Hypochlorous Acid and Peroxynitrite, and the Inhibition of Oxidative Stress-Induced Cell Death. *Med Sci Monit*; 22: 687-696.
- Chen J., Lan J., Dongle L., Backman LJ., Zhang W, Zhou Q., Danielson.P. (2017).** Ascorbic Acid Promotes the Stemness of Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells and Accelerates Epithelial Wound Healing in the Cornea. *Stem cells translational medicine*; 6:1356–1365.
- Claiborne A. (1985).** Catalase activity In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed. Greenwald RA, pp. 283–284.
- Claycombe KJ., Meydani SN. (2001).** Vitamin E and genome stability. *Mutat. Res*; 475: 37–44.
- Clugston RD., Blaner WS. (2014).** Vitamin A (Retinoid) Metabolism and Actions: What We Know and What We Need to Know About Amphibians. *Zoo Biol*; 33(6): 527–535.
- Codoner-Franchp., Valls-Belles V., Arilla-Codoner A.,Alonso-Iglesias E.(2011).**oxidant mechanisms in childhood obesity:the link between inflammation and oxidative stress.*Translational Research* ;158(6):369-384.
- Comhair SAA., Erzurum SC. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ;283(2): 246-255.
- Cotariu D., Evans S., Zaidman JL., Marcus O. (1990).** Early changes in hepatic redox homeostasis following treatment with a single dose of valproic acid. *Biochem. Pharmacol* ;40: 589–593.
- Coyle TE., Bair AK., Stein C., Vajpayee N., Mehdi S., Wright J. (2005).** Acute leukemia associated with valproic acid treatment: a novel mechanism for leukemogenesis. *Am. J. Hematol*; 78: 256– 260.
- Cuyper A.,Hendrix S.,DosRei RA, De Smet S., Deckers J, Gielen H., Jozefczak M., Loix C., Vercampt H, Vangronsveld J., Keunen E.(2016).** HydrogenPeroxide,Signalingin Disguise during Metal Phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*; 7:1-27.
- Daglia M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol* ; 23:174–181.
- Dash B., Phillips TD. (2013).** Molecular Characterization of a Catalase from *Hydra vulgaris*.*Gene*; 501(2): 144–152.

- Davis R., Peters DH., Mctavish D. (1994).** Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 47: 332–372.
- Defoort EN., Kim PM., Winn LM. (2006).** Valproic Acid Increases Conservative Homologous Recombination Frequency and Reactive Oxygen Species Formation: A Potential Mechanism for Valproic Acid-Induced Neural Tube Defects. *Molecular Pharmacology*; 69:1304- 1310.
- Dey A., Lakshmanan J. (2013).** The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Funct*; 4:1148–1184.
- Dhillon AS., Hagan S., Rath O., Kolch W. (2007).** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*; 26:3279–3290.
- Dutta S., Dey P., Saha MR, Sarkar I., Sarkar R., Mardi JA., Barman J., Sen A., Chaudhuri TK. (2017).**Differential interaction with O₂ and N₂ free-radicals, phytochemical fingerprinting and molecular docking reveals potent antioxidant activities of three major recreational foods of the Indian subcontinent. *Journal of Functional Foods*; 39 :112-122.
- Dwarka D., Thaver V., Naidu M., Baijnath H. (2017).** New insights into the presence of bilirubin in a plant species *STRELITZIA NICOLAI*(STRELITZIACEAE). *Afr J Tradit Complement Altern Med*; 14 (2):253-262.
- Eadie MJ., Hooper WD., Dickson RG. (1988).** Valproate-associated hepatotoxicity and its biochemical mechanisms. *Med Adverse Drug Exp*; 3(2):85-106.
- El Ridi R., Tallima H. (2017).** Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *Journal of Advanced Research* ;8: 487-493.
- Ellman GL. (1959).** Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry and Biophysics*; 82: 70-77.
- El-Shenawy NS., Hamza RZ. (2016).** Nephrotoxicity of sodium valproate and protective role of l-cysteine in rats at biochemical and histological levels. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* ; 27(5):497-504.
- Erenler R., Sen O., Sahin Yaglioglu A., Demirtas I. (2016).** Bioactivity guided isolation of antiproliferative sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Comb. Chem. High Throughput Screen*;19 (1): 66-72.
- Eskandari S., Arshosaz JV., Minaiyan M., Majid T. (2011).** Brain delivery of valproic acid via intranasal administration of nanostructured lipid carriers: in vivo pharmacodynamic studies using rat electroshock model. *Int J Nanomed*; 6: 363–371.
- Fadili K., Zerkani H., Amalich S., Zair T. (2017).** Etude phytochimique et evaluation de l'activite antioxydante des feuilles et des fruits du *Capparis spinosa* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. ISSN 2429-5396.
- Fakhfakh JA., Damak M. (2007).** Sesqueneolignans from the flowers of *Centaurea furfuracea*, Coss. et Dur. (Asteraceae). *Nat. Prod. Res*; 21(12): 1037-1041.

- Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Frajese GV., Tresoldi I, Modesti A., Bei R.(2015).** *In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. Int. J. Mol. Sci*; 16: 9236-9282.
- Farh M., Kadil Y. Tahri EH. Abounasr M., Riad F., El Khasmi M., Tazi A. (2017).** Évaluation des effets anxiolytiques, antidépresseurs et mnésiques de l'huile des graines de la nigelle chez le rat. *Phytothérapie*, pp1-9.
- Farkas V., Szabo M., Renyi I., Kohlheb O., Benninger C. (2000).** Temporary pure red-cell aplasia during valproate monotherapy: clinical observations and spectral electroencephalographic aspects. *J Child Neurol* ;15 :485–7.
- Favier A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Bio Clin* ; 55(1) : 9-16.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique Review. *L'actualité chimique*, pp : 108-115.
- Fleeger JL., Flipse IJ. (1964).** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci* ;47 (5) : 535-8.
- Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Biol Clin*; 64(6): 390-6.
- Figueira I., Menezes R., Macedo D., Costa I., Santos CNd. (2017).** Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. *Current Neuropharmacology*; 15:562-594.
- Flohé L.,Gunzler WA. (1984).** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* ; 105 :114–121.
- Fossati P., Prencipe L. (1982).** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*;28(10):77-80.
- Fu J., Shao CJ, Chen FR., Ng HK., Chen ZP.(2010).**Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines. *Neuro Oncol*;12 (4):32-40.
- Fukai T., Ushio-Fukai M. (2011).** Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal*; 15(6): 1583–1606.
- Fukuda Y., Watanabe H., Ohtomo Y., Yabuta K., (1996).** Immunologically Mediated Chronic Tubulo-Interstitial Nephritis Caused by Valproate Therapy. *72:328–329.*
- Fukushima A., Iwasa M., Nakabayashi R., Kobayashi M., Nishizawa T., Okazaki Y, Saito Kand., Kusano M. (2017).** Effects of Combined Low Glutathione with Mild Oxidative and Low Phosphorus Stress on the Metabolism of Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*; 8 :1-20.
- Galaly SR., Abdella EM., Mohammed HM., khadrawy SM. (2014).** Effects of royal jelly on genotoxicity and nephrotoxicity induced by valproic acid in albino mice. *Beni - suief University journal of basic and applied sciences*; 3: 1 – 5.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003).** Espèces Réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique* : 91-96.

- Geppert B., Drozd B., Kielczewski M., Holub M. (1983).** Isolation of sesquiterpene lactones from *Centaurea* L. species. *Acta Soc. Bot. Pol.*; 52: 23-34.
- Gezginci-Oktayoglu S., Turkyilmaz I., Ercin Yanardag R., Bolkent S. (2016).** Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and antifibrotic properties. *Protoplasma*; 253:127–135.
- Ghozzi H., Hakim A., Sahnoun Z. (2011).** Relationship between plasma concentrations of valproic acid and hepatotoxicity in patients receiving high doses. *Rev Neurol*; 167:600- 606.
- Girish C., Shweta O., Raj V., Balakrishnan S., Varghese RG. (2014).** Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol* ;58 :416-422.
- Gopaul SV., Farell K., Abbott FS. (2000).** Identification and characterization of N– acetylcysteine conjugates of valproic acid in humans and animals. *Drug Metab Disp*; 28(7):823- 32.
- Goyal M., Gupta A., Sharma M., Mathur P., Bansal N. (2016).** Fetal Valproate Syndrome with Limb Defects: An Indian Case Report. *Case Reports in Pediatrics*.pp:1-4.
- Graf WD., Oleinik OE, Glauser TA., Maertens P., Eder DN., Pippenger CE. (1998).** Altered antioxidant enzyme activities in children with a serious adverse experience related to valproic acid therapy. *Neuropediatrics*, Aug ;29(4) : 195-201.
- Grait B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse de doctorat . Université –Joseph Fourier – Grenoble1.
- Gravemann U., Volland J., Nau H. (2008).** Hydroxamic acid and fluorinated derivatives of valproic acid: anticonvulsant activity, neurotoxicity and teratogenicity. *Neurotoxicol Teratol*; 30:390–394.
- Grosso S., Mostardini R., Piccini B., Balestri P. (2009).** Body mass index and serum lipid changes during treatment with valproic acid in children with epilepsy. *Annals of Pharmacotherapy*;43(1):45–50.
- Gul MZ., Farhan A., Anand KK., Qureshi IA., Ghazi IA. (2013).** Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts - an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 13: 53.
- Gupta M., Yogendra KG, Sarita A., Satinder A., Kamlesh K (2004).** A randomized, doubleblind, placebo controlled trial of melatonin add-on therapy in epileptic children on valproate monotherapy: effect on glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymes. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 58: 542–547.
- Hah YS., Chung HJ, Sontakke SB., Chung IY., Ju S., Seo SW, Yoo JM., Kim SJ. (2017).** Ascorbic acid concentrations in aqueous humor after systemic vitamin C supplementation in patients with cataract: pilot study. *BMC Ophthalmology*; 17(121):1-5.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*; 62(10): 628-638.

- Halliwell B. (1999).** Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res*; 31: 261–272.
- Hamed SA., Abdellah MM., El-Melegy N. (2004).** Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J. Pharmacol. Sci*;96: 465–473.
- Hamza RZ., El-Shenawy NS. (2017)** .The beneficial effects of L-cysteine on brain antioxidants of rats affected by sodium valproate; *Hum Exp Toxicol*; 36(11):1212-1221.
- Hamza RZ., Ismail HAA., Khaled HE, El-Shenawy NS. (2015).**Antioxidant effect of L-cysteine on sodium valproate-induced oxidative stress in rat liver: biochemical and ultrastructure approaches. *Toxicol Environ Chem*; 97(8): 1041–1056.
- Hamza AA., Amin A. (2007).** *Apium graveolens* modulates sodium valproate-induced reproductive toxicity in rats. *J. Exp. Zool A Ecol. Genet. Physiol*;307: 199–206.
- Hamza AA., El Hodairy F., Badawi AM. (2015).** "Safranal ameliorates SodiumValproate-induced liver toxicity in rats by targeting gene expression, oxidative stress and apoptosis". *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*; 4(6):46-60.
- Hamza AA., EL hodairyb F., Elwy HM. (2016).** *Apium Graveolens* and *Rosmarinus Officinalis* Protect from Liver Toxicity Induced by Sodium Valproate in Rats and Potentiate its Anticonvulsant Activity on Pentylenetetrazol-Treated Rats. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*; 30(3):163-180.
- Handoko KB., Souverein PC., Van Staa TP., Meyboom RH., Leufkens HG., Egberts TC. (2006).** Risk of aplastic anemia in patients using antiepileptic drugs. *Epilepsia*; 47:1232–6.
- Hatton C., Riker RR., Gagnon DJ. (2016).** Free serum valproate concentration more reliable than total concentration in critically ill patients. *Resuscitation*; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resuscitation.2016.05.027>.
- Hebert SA., Bohan TP., Erikson CL., Swinford RD. (2017).** Thrombotic microangiopathy associatedwith Valproic acid toxicity. *BMC Nephrology*; 18(262):1-4.
- Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B., Kehm R., König J., Grune T.,Castro JP.(2017).** Happily, (n) ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox biology*; 11:482-501.
- Honda Y., Kessoku T., Sumida Y., Kobayashi T., Kato T., Ogawa Y., Tomeno W., Imajo K., Fujita K., Yoneda M., Kataoka K., Taguri M., Yamanaka T., Seko Y., Tanaka S., Saito S., Ono M., Oeda S., Eguchi Y., Aoi W., Sato K., Itoh Y., Atsushi Nakajima. (2017).** Efficacy of glutathione for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an open-label, single-arm, multicenter, pilot study. *BMC Gastroenterology* ;17 (96) :1-8.
- Hopfner M., Schuppan D., Scherubl H. (2008).** Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J. Gastroenterol* ;14:1–14.

Hostetler GL, Riedl KM., Schwartz SJ. (2012). Endogenous Enzymes, Heat, and pH Affect Flavone Profiles in Parsley (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*) and Celery (*Apium graveolens*) during Juice Processing. *J Agric Food Chem*; 60(1):1-18.

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Centaurea>.

Huang BK., Sikes HD. (2014). Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biology*; 2:965-962.

Hussein RRS., Soliman RH., Abdelhaleem AAM., Tawfeik MH., Abdelrahim ME. (2013). Effect of antiepileptic drugs on liver enzymes. *BJBAS*; 2:14-9.

Iamsaard S., Arun S., Burawat J., Sukhorum W., Boonruangsri P., NAMKING M., Uabundit N., Nualkaew S., Sripanidkulchai S. (2015). Phyllanthusemblica L. branch extract ameliorates testicular damage in valproic acid induced rats. *Int. J. Morphol*; 33(3):1016-1022.

Ibrahim MA, Abdel-Karim RI, Tamam HG, Mohamed AA, Wani FA. (2017). Protective effect of silymarin and ascorbic acid in valproic acid-induced hepatic toxicity in male albino Rats. *Mansoura J. Forens. Med. Clin. Toxicol*; 25(2):33-49

Imran M., Ahmad N., Anjum FM., Khan MK, Mushtaq Z., Nadeem M., Hussain S. (2015). Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition Journal* ;14(71):1-7.

Isharwal S., Kortenhorst MS., van Diest PJ., Chowdhury WH., Marlow C., Carducci MA., Rodriguez R., Veltri RW. (2009): Valproic acid causes dose- and time-dependent changes in nuclear structure in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther*; 8 (4): 802–808.

Islam T., Manna M., Reddy MK. (2015). Glutathione Peroxidase of *Pennisetum glaucum* (PgGPx) Is a Functional Cd²⁺ Dependent Peroxiredoxin that Enhances Tolerance against Salinity and Drought Stress. *Plos one*; 10(11):1-18.

Isojärvi JL., Löfgren E., Juntunen KS., Pakarinen AJ., Päivänsalo M., Rautakorpi I. (2004). Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology* ;62:247-53.

Jain P., Bhatla SC. (2014). Signaling role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) accompanying sensing of NaCl stress in etiolated sunflower seedling cotyledons. *Plant Signaling & Behavior*; 9: 12, e977746.

Jassim AM. (2013). Protective Effect of *Petroselinum crispum* (parsley) extract on histopathological changes in liver, kidney and pancreas induced by Sodium Valproate- In male Rats. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences*; 4 (1) :20-27.

Jellinger KA. (2003). General aspects of neurodegeneration. *J. Neurol. Transm*; 65:101-44.

Jessberger S., Nakashima K., Clemenson GD., Mejia E., Mathews E., Ure K., Ogawa S., Sinton CM., Gage FH., Hsieh J. (2007). Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J. Neurosci*; 27: 5967–5975.

Jezequel J., Gauthier N., Alluin A., Desmaretz JL., Guenault N., Desaintfuscién E., Canevet C., Bonenfant C. (2010). Intoxication grave à l'acide valproïque : place du traitement antidotique et de l'épuration extracorporelle. *Réanimation* ; 19 : 587-592.

Jingquan G., Wu H., Cao Y., Liang S., Sun C., Wang P., Wang J., Sun H., Wua L. (2016). Maternal DHA supplementation protects rat offspring against impairment of learning and memory following prenatal exposure to valproic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 35 :87-95.

Kakuta Y., Okumi M., Isaka Y., Tsutahara K., Abe T., Yazawa K., Ichimaru N, Matsumura K, Hyon SH, Takahara S, Nonomura N. (2011). Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. *Transpl Int*; 24 (5):514-22.

Karadag F., Sengul CB., Enli Y., Karakulah K., Alacam H., Kaptanoglu B., Kalkanci O., Herken H. (2017). Relationship between Serum Bilirubin Levels and Metabolic Syndrome in Patients with Schizophrenia Spectrum Disorders. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*;15(2):153-162.

Kassahun K., Farrel K., Abbott F. (1991). Identification and characterization of the glutathion and N-acetylcystein conjugates of (E)-2- propyl-2,4-pentadienoic acid, a toxic metabolite of valproic acid, in rats and humans. *Drug. Meta. Dispos*; 19(2):525-35.

Kassahun K., Hu P., Grillo MP., Davis MR., Jin L., Baillie TA. (1994). Metabolic activation of unsaturated derivatives of valproic acid. Identification of novel glutathione adduct formed through co-enzyme. A dependent and independent processes. *Chem Biol Interact* ; 90(3) : 253–75.

Kehili N., Saka S., Aouacheri O. (2017). L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. *Phytothérapie*, pp 1–10.

Khan SG., Katiyar SK., Agarwal R., Mukhtar H. (1992). Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: Possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res* ;52: 4050-4052.

Khan SK., Shakoor KA., Jan MA., Khattak AM., Shah SH. (2005). Study of histopathological changes in the liver of albino rats, induced by toxic dose of valproic acid. *Gomal J. Med. Sci*; 3:5–18.

Khan M., Khattak ST, Elahi M. (2011). Gross hepatic changes in developing albino rats exposed to valproic acid. *J Ayub Med Coll Abbottabad* ;23(2):48-50.

Kiang TKL., Teng XW., Karagiozov S., Surendradoss J., Chang TKH., Abbott FS. (2010). Role of Oxidative Metabolism in the Effect of Valproic Acid on Markers of Cell Viability, Necrosis, and Oxidative Stress in Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes. *Toxicological sciences*, 118(2): 501–509.

Kiang TKL., Teng X W., Surendradoss J., Karagiozov S., Abbott FS., Chang T. KH. (2011). Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 252: 318–324.

- Klaassen CD., Reisman SA. (2010).** Nrf2 the rescue: Effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; 244: 57–65.
- Knights M., Thekkekkara T., Morris A., Finlay E. (2016).** Sodium valproate-induced Fanconi type proximal renal tubular acidosis. *BMJ Case Rep.* doi:10.1136/bcr-2015-213418.
- Knights MJ., Finlay E. (2014).** The effects of sodium valproate on the renal function of children with epilepsy. *Pediatr Nephrol*; 29 (7):1131-8.
- Kobayashi J., Sasaki D., Hara K.Y., Hasunuma T., Kondo A. (2017).** Enzymatic improvement of mitochondrial thiol oxidase Erv1 for oxidized glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*; 16(44):1-9.
- Komulainen T., Lodge T., Hinttala R., Bolszak M., Pietilä M., Koivunen P., Hakkola J., Poulton J., Morten KJ., Uusimaa J.(2015).** Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology*; 4 (33):47-56.
- Koldaş S., Demirtas I., Ozen T., Demirci M.A., Behçet L. (2015).** Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage *J. Sci. Food. Agric*; 95(4): 786-798.
- Korgaa A., Józefczyk A., Zgórkab G., Homaa M., Ostrowskac M., Franciszek Burdand Dudkaa J. (2017).** Evaluation of the phytochemical composition and protective activities of methanolic extracts of *Centaurea borysthena* and *Centaurea daghestanica* (Lipsky) Wagenitz on cardiomyocytes treated with doxorubicin. *Food & Nutrition Research*; 61:1-11.
- König SA., Knolle J., Friedewald S., Koelfen W., Longin E., Lenz T., Hannak D. (2003).** Effects of valproic acid, carbamazepine, and phenobarbitone on the fatty acid composition of erythrocyte membranes in children. *Epilepsia*; 44(5):708–11.
- Korkmazer N., Vurucu S., Demirkaya E., Unay B., Kul M., Akin R., Gokcay E. (2006).** Serum and liver tissue biotinidase enzyme activity in rats which were administrated to valproic acid. *Brain and Development*;28: 515–520.
- Kreuz S, Fischle. (2016).** Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics* .8(6):843–862.
- Kumar J., Teoh SL., Das S., Mahaknaukrah P. (2017).** Oxidative Stress in Oral Diseases:understanding its relation with other systemic diseases. *Frontiers in Physiology* ;8 :1-5.
- Kumar S, Pandey AK. (2013).** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*;2013.
- Kumar S., Yadav A., Yadav M., Yadav J.P. (2017).** Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Res Notes*; 10(60) :2-12.
- Ladoh Yemeda CF., Dibon SD., Nyegue MA., Djembissi Talla RP., Lenta Lagace DC., O'Brien WT., Gurvich N., Nachtigal MW., Klein PS. (2004).** Valproic acid:how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research*: 4 215–225.

- Laguerre MM., Lecomte J., Villeneuve P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res*; 46(5): 244-82.
- Larsen EP., Ostergaard JR. (2014).** Valproate-induced hyperammonemia in juvenile ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *Seizure* 23: 429–434.
- Lee WM. (2003).** Drug-induced hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med*; 349: 474–485.
- Lefaki M., Papaevgeniou N., Chondrogianni N. (2017).** Redox regulation of proteasome function. *Redox Biology*; 13 :452-458.
- Leipnitz G., Amaral AU., Zanatta A., Seminotti B., Fernandes CG., Knebel LA., Vargas CR., Wajner M. (2010).** Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. *Life Sci* ;87:275–280.
- Leo CH., Woodman OL. (2015).** Flavonols in the Prevention of Diabetes-induced Vascular Dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*;65(4)297–298.
- Levy RH., Mattson RH, Meldrum BS., Perucca E. (2002).** Antiepileptic drugs (5th ed), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 849.
- Lheureux PE, Hantson P. (2009).** Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity; *Clin Toxicol (Phila)*; 47(2):101-11.
- Lheureux PER., Penaloza A., Zahir S., Gris. (2005).** Science review: Carnitine in in the treatment of valproic acid-induced toxicity – what is the evidence? *Critical Care*; 9:431-440.
- Li An-Na., Li Sha., Zhang YJ., Xu XR, Chen YM., Li HB. (2014).** Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*; 6: 6020-6047.
- Li M., Fukagawa NK. (2010).** Age-related changes in redox signaling and VSMC function. *Antioxid Redox Signal*;12(5):641-655.
- Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang ZJ, Lao L, Wong CW., Yibin F. (2015).** The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences* ;16 :26087–26124.
- Lipinski B. (2011).** Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2011 :1-9.
- Liu CS., Wu HM., Kao SH., Wei YH. (1998).** Serum trace elements, glutathion, copper /zinc super oxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic pations with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin. Neuropharmacologie*, 21(1) :62-4.
- Liu Y., Liu X., Liu Y., Liu G., Ding L., Lu X. (2017).** Construction of a highly sensitive non-enzymatic sensor for superoxide anion radical detection from living cells. *Biosensors and Bioelectronics* ;90 :39-45.
- Lloyd K.A. (2013).** A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons*; 6.

Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL., Randal RJ. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*;15: 265-275.

Lu S C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* ;1830(5): 3143-3153.

Lucey BP., Nelson-Rees WA., Hutchins GM. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch. Pathol. Lab. Med*; 133(9): 1463-1467.

Magosso E.,Ansari MA.,Gopalan Y.,Shuaib IL.,Wong JW.,Khan NA.,Abu Bakar MR.,Ng BH.,Yuen KH.(2013).Tocotrienols for normalization of hepatic echogenic response in nonalcoholic fatty liver:a randomised placebo-controlled clinical trial. *Nutr.j*;12(1):166.

Mahrous DM., Abdel Hakeem GL., Abdel Aziz RAS., Higazi AM. (2016). Assessment of Subclinical Pancreatitis in Epileptic Children with Different Treatment Modalities. *Child Neurology Open*; 3: 1-6

Mallet L., Babin S., Morais JA. (2004). Valproic acid-induced hyperammonemia and thrombocytopenia in an elderly woman. *Ann Pharmacother*; 38(10): 1643-7.

Manosroi J., Boonpisuttinant K., Manosroi W., Manosroi A. (2012). Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *J Ethnopharmacol* ;142 (2) :422- 431.

Mariani E., Polidori M.C., Cherubini A., Mecocci P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular disease: an overview. *J. Chromatogr. B* ;827 :65-75.

Martin S., Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* ;51 : 304–315.

Masri W., Hdhili A., Amamou M. (2016). Defaillances hepatiques au cours des intoxications. *International Journal of Innovation and Applied Studies* ; 17 : 615-626.

Mattera R., Benvenuto M., Giganti MG., Tresoldi I., Pluchinotta FR, Bergante S., Tettamanti G., Masuelli L., Manzari V., Modesti A., Bei R. (2017). Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes; 9 (523):1-43.

Mazaheri M., Samaie A., Semnani V. (2011). Renal tubular dysfunction measured by N-acetyl beta glucosaminidase/ creatinine activity index in children receiving antiepileptic drugs: a randomized controlled trial. *Ital J Pediatr*; 37(21):1-4.

Mc Evoy GK. (1997). AHFS Drug information. Bethesda: American society of health system pharmacists: 1663 -8.

Medjakovic S., Mueller M., Jungbauer A. (2010). Potential Health-modulating Effects of Isoflavones and Metabolites via Activation of PPAR and AhR. *Nutrients*; 2:241-279.

Messaoudi I., El Heni J., Hammouda F., Saïd K., Kerkeni A (2009). Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. *Biol Trace Elem Res*; 130:152–161.

- Metzler MA., Sandell LL. (2016).** Enzymatic Metabolism of Vitamin A in Developing Vertebrate Embryos. *Nutrients*; 8(812):1-21.
- Meunier H., Carraz G., Meunier Y., Eymard P., Aimard M. (1963).** Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Thérapie*; 18:435-8.
- Miara MD., Ait Hammou M., Hadjadj Aoul S. (2013).** Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). *Phytothérapie* ;11:206-218.
- Mitchell C., Robin MA., Mayeuf A., Mahrouf-Yorgov M., Mansouri A., Hamard M., Couton D., Fromenty B., Gilgenkrantz H. (2009).** Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice. *Am J Pathol*; 175(5):1929-1937.
- Mishra A., Kumar S., Pandey AK. (2013).** Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 292934.
- Mock CM., Schwetschenau KH. (2012).** Levocarnitine for valproic-acid-induced hyperammonemic encephalopathy. *Am J Health Syst Pharm*; 69(1):35–9.
- Mony TJ., Lee JW., Dreyfus C., DiCicco-Bloom E., Lee HJ. (2016).** Valproic Acid Exposure during Early Postnatal Gliogenesis Leads to Autistic-like Behaviors in Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*; 14(4): 338–344.
- Mor A., Koh E., Weiner L., Rosenwasser S., Sibony-Benyamini H., Fluhr R. (2014).** Singlet Oxygen Signatures Are Detected Independent of Light or Chloroplasts in Response to Multiple Stresses. *Plant physiology*; 165: 249–261.
- Morris CJ., Earl JR., Trenam CW., Blake DR. (1995).** Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*; 27: 109-122.
- Morsy BM., safwat GM., Hussein DA., Samy RM. (2017).** The protective effect of *Nigella Sativa* oil extract against neurotoxicity induced by Valproic acid. *International Journal of Bioassays*. pp. 5474-5484.
- Mouhid L., Corzo-Martínez M., Torres C., Vázquez L., Reglero G., Fornari T., Ramírez AM. (2017).** Improving *In Vivo* Efficacy of Bioactive Molecules: An Overview of Potentially Antitumor Phytochemicals and Currently Available Lipid-Based Delivery Systems. *Journal of Oncology*.pp:34.
- Mut-Salud N., Álvarez PJ., Garrido JM., Carrasco E., Aránega A., Rodríguez-Serrano1 F. (2016).** Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2016, Article ID 6719534, 19 pages
- Na L., Wartenberg M., Nau H., Hescheler J., Sauer H. (2003).** Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. *Birth Defects Res A Clin Mol Terato*, 167:174–180.
- Naito HK. (1984).** Cholesterol, in *Clinical Chemistry: Theory. Analysis and Correlation*, Kaplan L.A. and Pesce A.J. (eds.) St. Louis, MO: C.V. Mosby Co. P127.

- Natarajan SK., Eapen CE., Pullimood AB., Kunissery A. (2006).** Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *Journal of gastroenterology and hepatology*; 21(8):1240-1249.
- Nau H., Loscher W., Wahnschaffe U., Honack D., Wiltfoht W. (1992).** Effect of valproate and E-2-en-valproate on functional and morphological parameters of rat liver; I. Biochemical histopathological and pharmacokinetic studies. *Epilepsy Res*; 13(3): 187–98.
- Ndjakou B., Mpondo E., Yinyang J., Wansi JD. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of applied Bioscience*; 84: 7636-7643.
- Neuman MG., Shear NH., Jacobson-Brown PM., Katz GG., Neilson HK., Malkiewicz IM. (2001).** CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem*; 34:211–8.
- Nishimura T., Sakai M., Yonezawa H. (2000).** Effects of valproic acid on fertility and reproductive organs in male rats. *Toxicol Sci*; 25:85–93.
- Njoya EM., Munvera AM., Mkounga P., Nkengfack AE., McGaw L J. (2017).** Phytochemical analysis with free radical scavenging, nitric oxide inhibition and antiproliferative activity of *Sarcocephalus pobeguunii* extracts. *Complementary and Alternative Medicine*; 17:199.
- Ogungbenro K., Aarons L. (2014).** A physiologically based pharmacokinetic model for valproic acid in adults and children. *Eur. J. Pharm. Sci*;63; 45–52.
- Oke-Altuntas F, Demirtas I, Tufekci AR, Koldas K, Gul F, Behcet L, Gecibesler HI. (2016).** Inhibitory effects of the active components isolated from *Satureja boissieri* Hausskn. Ex Boiss. on human cervical cancer cell line. *J. Food Biochem* ; 40: 499-506.
- Oktay S., Alev B., Tunali S., Emekli-Alturfan E., Tunali-Akbay T., Koc-Ozturk L., Yanardag R., Yarat A.(2015).** Edaravone ameliorates the adverse effects of valproic acid toxicity in small intestine. *Human and Experimental Toxicology* ;34(6):655-661.
- Ordenez AAL., Gomez JD., Vattuone MA., Isla MI. (2006).** Antioxidant activities of *Sechiumedule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*;99: 452–458.
- Ourique GM., Saccol EMH., Pés T.S., Glanzner WG., Schiefelbein S.H., Woehl VM., Baldisserotto B., Pavanato MA., Gonçalves PBD., Katia BP. (2016).** Protective effect of vitamin E on sperm motility and oxidative stress in on in valproic acid treated rats *Food and Chemical Toxicology* ;95: 159-167.
- Ourique GM., Pêsa TS., Saccol EMH., Finamor IA., Glanzner WG., Bernardo B., Pavanato MA., Gonçalves PBD., Barreto KP. (2016).** Resveratrol prevents oxidative damage and loss of sperm motility induced by long-term treatment with valproic acid in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*; pp:9.
- Oyesanmi O., Kunkel EJ., Monti DA. and FIELD HL. (1999).** Hematologic side effects of psychotropics. *Psychosomatics* ;44 : 414–421.

- Ozenda P. (1958).** Flore du sahara sptentrional et central Centre National de la Recherche Scientifique(CNRS), Paris :450-454.
- Pan H., Chen J., Shen K., Wang X., Wang P., Fu G, Meng H, Wang Y, Jin B. (2015).** Mitochondrial modulation by Epigallocatechin 3-Gallate ameliorates cisplatin induced renal injury through decreasing oxidative/nitrative stress, inflammation and NF-kB in mice. *PloS One* ;10 (4): e0124775.
- Paiva CN., Marcelo BT. (2014).** Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxidants & redox signaling*; 20(6) :1000-1037.
- Panche AN., Diwan AD., Chandra SR. (2016).** Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*; 5(47): 1 – 15.
- Pederzoli CD., Mescka CP., Zandona´ BR., De Moura Coelho D., Sgaravatti AM., Sgarbi MB., De Souza Wyse AT., Duval Wannmacher CM., Wajner M., Vargas CR., Dutra-Filho CS. (2010).** Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats. *Metab Brain Dis*; 25:145–154.
- Peng A., Ye T., Rakheja D., Tu Y., Wang T., Du Y., Zhou JK., Vaziri ND., Hu Z., Mohan C., Zhou XJ. (2011).** The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int*; 80 (6):601–11.
- Perucca E. (2002).** Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drug*; 16: 695-714.
- Pessayre D., Mansouri A., Haouzi D., Fromenty B. (1999).** Hepatotoxicity due to 700 mitochondrial dysfunctions. *Cell Biol. Toxicol*; 15: 367–373.
- Petiz LL., Girardi CS., Bortolin RC., Kunzler A., Gasparotto J., Rabelo TK, Matté C., Moreira JCF., Gelain DP. (2017).** Vitamin A Oral Supplementation Induces Oxidative Stress and Suppresses IL-10 and HSP70 in Skeletal Muscle of Trained Rats. *Nutrients*; 9 (353):1-16.
- Pham-Huy LA., Hua H., Pham-Huy C. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*; 4(2):89–96.
- Phaniendra A., Jestadi DB., Periyasamy L.(2015).** Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem*; 30(1):11–26.
- Pippenger CE., Meng XZ., Rothner AD., Cruse RP., Erenberg G., Solano R., (1991).** Free radical scavenging enzyme activity profiles in risk assessment of idiosyncratic drug reactions. In: Levy, R.H., Penry, J.K. (Eds.), *Idiosyncratic reactions to valproate: clinical risk patterns and mechanisms of toxicity*. Raven Press, New York, pp. 75–88.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A.(2017).** Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp.13.
- Potter WZ., Ketter TA. (1993).** Pharmacological issues in the treatment of bipolar disorder, focus on mood-stabilizing compounds. *Can J Psychiatry*, 38(2): 51 – 6.

Pourahmad J., MR Eskandari., Kaghazi A., Shaki F., J Shahraki., Fard JK. (2012). A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: Involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicology in Vitro*; 26: 545–551.

Powers S., Jackson M. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev*;88: 1243-1276.

Priester TC., Khoo K., Fernández-Pérez ER., Regner KR., Tracy JA., Mitchell S., Summar ML., Babovic-Vuksanovic D. (2009). Hyperammonemia from a urea cycle disorder presenting in adulthood. *The Open Critical Care Medicine Journal*;2: 9-12.

Prior RL., Cao G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* ; 27(11-12) : 1173-81.

Quezel P., Santa,S.(1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales : Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Paris, Tome II,pp :1032.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegou L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* ;50(3) :586-621.

Ragusa A., Centonze C., Grasso ME., Latronico MF., Mastrangelo PF. Sparascio F., Fanizzi FP., Maffia M. (2017). A Comparative Study of Phenols in Apulian Italian Wines. *Foods*; 6 (24):1-10.

Rahal A., Kumar A., Singh V.,Yadav B., Tiwari Ruchi., Chakraborty S, Dhama K.(2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*; 2014: 1-19.

Ramos S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res* ;52: 507–526.

Rani TS., Chandravadana Y. (2008). Influence of *spirulina fusiformis* on the sodium valproate induced hepatotoxicity and oxidative stress. *Pharmacologyonline*; 2: 265-281.

Rauchenzauner M., Laimer M., Luef G., Kaser S., Engl J., Tatarczyk T., Ciardi C., Tschoner A., Lechleitner M., Patsch J., Ebenbichler CF. (2008). Adiponectin receptor R1 is upregulated by valproic acid but not by topiramate in human hepatoma cell line, HepG2. *Seizure*;17: 723-726.

Ray S., Khamrui S., Kataria M., Biswas J., Saha Sum. (2015). Valproic Acid-Induced Severe Acute Pancreatitis with Pseudocyst Formation: Report of a Case *Cureus* ;7(8): e297. DOI 10.7759/cureus.297.

Ribaldo PD., Souza DS., Biswas SK., Block K., Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. (2009). Green tea (*Camellia sinensis*) attenuates nephropathy by downregulating Nox4 NADPH oxidase in diabetic spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* ;139(1) :96–100.

Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux. *Physiologie et Biochimie*. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes : 322-323.

RAZA M., AL-BEKAIRI AM., AGEEL AM., QURESH SI. (1997). Biochemical basis of sodium valproate hepatotoxicity and renal tubular disorder: time dependence of peroxidative injury. *Pharmacological Research*; 35(2) :154-157.

Raza M., Alghasham A., Alorainy MS., El-Hadiyah TM. (2006). Beneficial Interaction of Thymoquinone and Sodium Valproate in Experimental Models of Epilepsy: Reduction in Hepatotoxicity of Valproate. *Scientia Pharmaceutica (Sci. Pharm.)*, 74: 159-173.

Raza M., Al-Shabanah OA., Al-Bekairi AM., Qureshi S. (2000). Pathomorphological changes in mouse liver and kidney during prolonged valproate administration. *Int. J. Tissue React* ; 22 : 15–21.

Rebey IB., Bourgou S., Saidani Tounsi M., Fauconnier ML., Ksouri R. (2017).

Reichel F-X. (2010). Guide pratique de toxicologie. 2e édition. De Boeck, Bruxelles ; 202,203, 148.

Reinisalo M., Kårlund A., Koskela A., Kaarniranta K., Karjalainen RO. (2015). Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2015:1-24. reproductive organs in male rats. *J Toxicol Sci*; 25:85-93.

Ríos-Arrabal S., Artacho-Cordón F., León J., Román-Marinetto E., Salinas-Asensio MDM., Calvente I., Núñez MI. (2013). Involvement of free radicals in breast cancer. *Springer open journal*; 2(404):1-12.

Rodrigo R., Bosco C. (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*; 142:317–327.

Rodrigo R., Miranda A., Vergara L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta*;412: 410–424.

Roste LS., Tauboll E., Haugen TB., Bjornenak T., Saetre ER., Gjerstad L. (2003). Alterations in semen parameters in men with epilepsy treated with valproate or carbamazepine monotherapy. *Eur J Neurol*; 10:501–6.

Russo A., Izzo AA., Cardile V., Borrelli F., Vanella A. (2011). Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine*; 8: 125-132.

Sabers A., Bertelsen FCB., Scheel-Krüger J., Nyengaard JR., Møller A. (2014). Long-term valproic acid exposure increases the number of neocortical neurons in the developing rat brain. A possible new animal model of autism. *Neuroscience Letters* ;580 :12-16.

Sadeque AJM., fisher MB., korzekwa KR., Gonzalez FJ., Retie AE. (1997). Human CYP2C9 and CYP2AC mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *Pharmacol.Exp. Ther*;283(2): 689-703.

Sahin K., Tuzcu M., Gencoglu H., Dogukan A., Timurkan M., Sahin N., Aslan A., Kucuk O. (2010). Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci*; 87(7–8):240–5.

Samet I., Han J., Jlaiel L., Sayadi S., Isoda H. (2014). Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. *Oxid. Med. Cell. Longev*;2014. Article ID 927619, 16 pages.

Said SAA., El-Agamy DS. (2010). Prevention of sodium valproate-induced hepatotoxicity by curcumin, rosiglitazone and N-acetylcysteine in rats. *Arzneimittelforschung* ;60(11):647-53.

Sakr SA., Zowail ME., Marzouk AM. (2014). Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on sodium valproate induced cytogenetic and testicular alterations in albino rats. *Anat Cell Biol*; 47:171-179.

Salam GA., Allam OAA. (2015). The Effects of Valproic Acid on the Skeletal Development and the Ameliorative Effects of Combined Use of Folic Acid and Vitamin E in Pregnant Albino Rats. *International Journal of Clinical and Developmental Anatomy*; 1(3): 70-78.

Saleh DAA., Ismail MA., Ibrahim AM. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease, insulin resistance, dyslipidemia and atherogenic ratios in epileptic children and adolescents on long term antiepileptic drug therapy. *Pak. J. Biol. Sci*; 15 (2): 68–77.

Sallie R, Tredger JM, Willam R. (1991). Drugs and the Liver. *Biopharmaceutical Drug Dispos*; 12: 251-259.

Sanchez C. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. pp :1-10.

Santana MM., Gonzalez JM., Cruz C. (2017). Nitric Oxide Accumulation: The Evolutionary Trigger for Phytopathogenesis. *Frontiers in Microbiology* ; 8 : 1-13.

Savina P. (2014). Le Curcuma, un agent naturel de lutte contre le vieillissement cutané. *Biologie et Biotechnologie*. 3-18.

Savini I., Catani MV., Evangelista D., Gasperi V., Avigliano L. (2013). obesity associated oxidative stress; strategies finalized to improve redox state. *I J Mol Sci*;14(5):10497-10538.

Schmitt B., Martin F., Critelli H., Molinari L., Jenni OG. (2009). Effects of valproic acid on sleep in children with epilepsy. *Epilepsia*. 50(8):1860–1867.

Schrader M., Fahimi HD. (2006). Review Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*; 1763(12):1755–66.

Seckin S., Basaran-Kucukgergin C., Uysal M. (1999). Effect of acute and chronic administration of sodium valproate on lipid peroxidation and antioxidant system in rat liver. *Pharmacol. Toxicol*; 85, 294–298.

Sedighi M., Bahmani M., Asgary S., Beyranvand F., Rafieian-Kopaei M. (2017). A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis Send to. *J Res Med Sci*;15:22-30.

- Senatore F., Landolfi S., Celik S., Bruno M. (2006).** Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp. *sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily. *Flavour Fragr. J.*; 21(2): 282-285.
- Shrestha S., Singh M., Shrestha U., Mishra A. (2014).** Palliative Effect of Piracetam on Valproate Induced Liver Injury. *RJPBCS*; 5(3):260-266.
- Silva MF, Aires CC, Luis PB. (2008).** Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis*; 31: 205-216.
- Singleton VL., Orthofer R., Lamuela- Raventos RM. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer L, editor. *Methods in enzymol: oxidant and antioxidants (part A)*, 299. San Diego, CA: Academic Pres; 152-78.
- So A., Thorens B. (2010).** Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*;120(6):1791-1799.
- Sokmen BB., Tunali S., Yanardag R. (2012).** Effects of vitamin U (S-methyl methionine sulphonium chloride) on valproic acid induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*; 50: 3562–3566.
- Spaniol M., Kaufmann P., Beier K., Wuthrich J., Torok M., Scharnagl H., Marz W., Krahenbuhl S. (2003).** Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethyl hydraziniumpropionate. *J. Lipid Res*;44: 144–153.
- Spierto FW., MacNeil ML., Burtis CA. (1979).** The effect of temperature and wavelength on the measurement of creatinine with the Jaffe procedure. *Clin Biochem*.12(1) :18-21.
- Spiller AH., Krenzelok EP., Klein-Schwarz W., Winter ML.,Weber JA., Sollee D.R. (2000).**Multicenter case series of valproic acid ingestion: serum concentrations and toxicity. *Clin Toxicol*; 38:755–60.
- Stadelmaier R, Nasri H, Deutsch CK., Bauman M, Hunt A, Stodgell CJ., Adams J, Holmes LB.(2017).** Exposure to Sodium Valproate during Pregnancy: Facial Features and Signs of Autism. *Birth Defects Res*; 109(14):1134-1143.
- Sung CC., Hsu YC., Chen CC., Lin YF., Wu CC. (2013).** Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative Med Cell Longev* ;2013(301982).
- Surendraddoss J., Chang TKH., Abbott FS. (2012).** Assessment of the role of in situ generated (E)-2,4-diene-valproic acid in the toxicity of valproic acid and (E)-2-ene-valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes *Toxicology and Applied Pharmacology*; 264: 413–422.
- Sveberg Roste LS., Tauboll E., Derner A., Berg KA., Aleksandersen M., Gjerstad L. (2001).** Morphological changes in the testis after long-term valproate treatment in male Wistar rats. *Seizure* ;10:559–565.
- Sztajnkrzyer MD. (2002).** Valproic acid toxicity: overview and management. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40, 789–801.
- Tabatabaei AR, Abbott FS. (1999).** Assessing the mechanism of metabolism- dependent valproic acid-induced in vitro cytotoxicity. *Chem Res Toxicol*; 12:323–30.

Tang W, Borel AG., Fujimiya T., Abbott FS. (1995). Fluorinated Analogs as Mechanistic Probes in Valproic Acid Hepatotoxicity: Hepatic Microvesicular Steatosis and Glutathione Status. *Chem. Res. Toxicol*;8 (5):671–682.

Tang W., Abbott FS. (1996). Bioactivation of a Toxic Metabolite of Valproic Acid,(*E*)-2-Propyl-2,4-pentadienoic Acid, via Glucuronidation.LC/MS/MS Characterization of the GSH-Glucuronide Diconjugates. *Chem. Res. Toxicol*; 9:517-526.

Tang W., Borel AG., Fujimiya T., Abbott FS. (1995). Fluorinated analogues as mechanistic probes in valproic acid hepatotoxicity:Hepatic microvesicularsteatosis and glutathione status. *Chem. Res. Toxicol*; 8:671–682.

Tang W., Jiang Y.F., Ponnusamy M., Diallo M. (2014). Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol*; 20:13079–13087.

Teodoro GR., Ellepola K., Seneviratne CJ., Koga-Ito CY. (2015). Potential Use of Phenolic Acids as Anti-Candida action. *Frontiers in Microbiology*; 6:1-11.

Teoh PL., Cheng A.Y.F., Liau M., Lem FF., Kaling GP., Chua FN., Cheong BE., (2017). Chemical composition and cytotoxic properties of *Clinacanthus nutans* root extracts *Pharm Biol*;55 (1): 394-401.

Thomes P., Alixis A. (2000). Epilepsies. 2ème édition: 197-225.

Tomascik-Cheeseman LM., Coleman MA., Marchetti F., Nelson DO., Kegelmeyer LM., Nath J., Wyrobek AJ.(2004). Differential basal expression of genes associated with stress response, damage control, and DNA repair among mouse tissues. *Mutat. Res*; 561: 1-14.

Tomson T., Battino D., Perucca E. (2016). Valproïque acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol*; 15(2): 210–218.

Tong V., Teng XW., Chang TKH., Abbott FS. (2005). Valproïque Acid II: Effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol Sci.*; 86: 436-443.

Tong V., Chang TKH., Chen J., Abbott FS. (2003). The effect of valproic acid on hepatic and plasma levels of 15-F2t-Isoprostane in rats. *Free radical biology and medicine*;34: 1435-1446.

Tong V., Teng XW., C3 TK., Abbott FS. (2005). Valproic acid I: time of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metablite level in rats. *Toxicol Sc*; 86 (2):427-435.

Tsai PY., Ka SM., Chang JM., Chen HC., Shui HA., Li CY., Hua KF., Chang WL., Huang JJ, Yang SS., Chen A. (2011). Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med*; 51(3):744-54.

Tsao R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols.*Nutrients* ; 2 :1231-1246.

- Twal M., Kiefer P., Salameh A., Schnabel J., Ossmann S., Von Salisch S., Krämer K, Sobiraj A, Kostelka M, Mohr FW, Dhein S. (2013).** Reno-protective effects of epigallocatechingallate in a small piglet model of extracorporeal circulation. *Pharmacol Res*; 67(1):68–78.
- Ubeda NU., Alonso-Apperte E., Varela-Moreiras G. (2002).** Acute Valproate Administration Impairs Methionine Metabolism in Rats. *J. Nutr* ; 132: 2737–2742.
- Uchida H., Nakajima Y, Ohtake K, Ito J., Morita M, Kamimura A., Kobayashi J. (2017).** Protective effects of oral glutathione on fasting-induced intestinal atrophy through oxidative stress Basic Study. *World J Gastroenterology*; 23(36): 6650-6664.
- Uchiyama M., Mihara M. (1978).** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*; 86: 271-278.
- Valente MJ., Carvalho, F., Bastos M., de Pinho PG., Carvalho M. (2012).** Contribution of oxidative metabolism to cocaine-induced liver and kidney damage. *Curr. Med. Chem*;19: 5601–5606.
- Vauzour D, Rodriguez-Mateos A., Corona G., Oruna-Concha MJ., Spence JP. E. (2010).** Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*;2(11): 1106–1131.
- Vázquez-Calvo Á., Jiménez de Oya N, Martín-Acebes MA., Garcia-Moruno E., Saiz JC. (2017).** Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus. *Frontiers in Microbiology*; 8 :1-8.
- Verrotti A., Scardapane A., Franzoni E., Manco R., Chiarelli F. (2008)** .Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid .*Epilepsy Research*; 78: 171-177.
- Verrotti A., Greco R., Pascarella R., Matera V., Morgese G., Chiarelli F. (2000).** Renal tubular function in patients receiving anticonvulsant therapy: a long-term study. *Epilepsia*; 41(11):1432-5.
- Vidya M, Subramanian S. (2006).** Effects of micro-ketoglutarate on antioxidants and lipid peroxidation products in rats treated with sodium valproate. *J Appl Biomed*; 4:141-6.
- Wang K., Wang E., Qin Z., Zhou Z., Geng Y., Chen D. (2016).** Effects of dietary vitamin E deficiency on systematic pathological changes and oxidative stress in fish. *Oncotarget* ;7 (51): 83869–83879.
- Watanabe T, Nakayasu K, Nagayama Y. (2005).** Autoimmune haemolytic anaemia and renal Fanconi syndrome caused by valproate therapy. *Eur J Pediatr*; 164:186–7.
- Watanabe T., Yoshikawa H., Yamazaki S., Abe Y., Abe T. (2005).** Secondary renal Fanconi syndrome caused by sodium valproate therapy. *Pediatr. Nephrol*;20: 814–817.
- Wilder BJ., Hurd RW.(1991).**Free radical scavenger deficiency and valproic acid. In: Levy RH, Penry JK, editors. *Idiosyncratic reactions to valproate: clinical risk patterns and mechanisms of toxicity*. New York: Raven press: 89-95.
- Wirrell EC. (2003).** Valproic acid-associated weight gain in older children and teens with epilepsy. *Pediatric Neurology*;28(2):126–129.

Wu XT., Hong PW ., Suolang DJ. , Zhou D. , Stefan H.(2017).Drug-induced hypersensitivity syndrome caused by valproic acid as a monotherapy for epilepsy: first case report in Asian population. *Epilepsy&Behavior Case Reports*; 8: 108–110.

Wu Y., Wang F., Zheng Q., Lu L., Yao H., Zhou C., Wu X., Zhao Y. (2006). Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *Journal of Biomedical Science*;13(4): 569–578.

Xiaotian X., Hengzhong Z., Yao X., Zhipan Z., Daoliang X., Yumei W. (2013). Effects of antiepileptic drugs on reproductive endocrine function, sexual function and sperm parameters in Chinese Han men with epilepsy.*J. Clin. Neurosci*;20: 1492-1497.

Xu DP., Li Y., Meng X., Zhou T., Zhou Y., Zheng J., Zhang JJ., Li HB. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci*; 18(96):1-32.

Yaglioglu Sahin A., Demirtas I., Goren N. (2014). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiformis* DC. *Phytochem Lett*; 8:213-219.

Yilmaza Y., Tasdemir HA, Paksua M.S. (2009). The influence of valproic acid treatment on hair and serum zinc levels and serum biotinidase activity. *European journal of paediatric neurology*; 13: 439–443.

Yin H., Xu L., Porter NA. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis.*Chemical Reviews*; 111:5944–5972.

Yoon SP., Maeng Y.H., Hong R., Lee BR, Kim CG., Kim HL., Chung JH., Shin BC .(2014).Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Acta Histochem* ; 116(8):1210–5.

Yuksel A., Cengiz M., Seven M., Ulutin T. (2001). Changes in the antioxidant system in epileptic children receiving antiepileptic drugs: two-year prospective studies. *J. Child Neurol.* 16:603–606.

Zaccara G., Tramacere L. (2011). Chapter7. Antiepileptic drugs. In Aronson J. K. *Side Effects of Drugs Annual33: A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions.* Oxford Ox1 ET2, UK, Elsevier, P 171.

Zamora-Ros R., Touillaud M., Rothwell JA, Romieu I.,Augustin S. (2014).Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies:current tools and applications and their limits. *Am J Clin Nutr*; 100:11–26.

Zeiler FA., Sader N.,Gillman LM.,West M. (2016).Levocarnitine induced seizures in patients on valproic acid: A negative systematic review.*Seizure*;36:36-39.

Zhang B., Wang X., Nazarali AJ. (2010). Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of Hoxa2 and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol.*; 30:137-148.

Zhao G., Han Y., Yunhui H., Wu X., Wang Y., Zhang X., Fu J., Zou X., Zhang J., Chen X., Jose PA., Lu X., Zeng C. (2016). Targeting HO-1 by Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Contrast-Induced Renal Injury via Anti-Oxidative Stress and Anti-Inflammation Pathways. *PLoS One*; 11(2): e0149032. doi:10.1371/ journal. pone.0149032.

Zhou J., Wang Q., Ding Y., Zou MH. (2015). Hypochlorous acid via peroxynitrite activates protein kinase C α and insulin resistance in adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*; 54:25–37.

Zhou P., Yu JF., Zhao CG., Sui FX., Teng X., Wu YB. (2013). Therapeutic potential of EGCG on acute renal damage in a rat model of obstructive nephropathy. *Mol Med Rep* ;7(4):1096–1020

Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *Centaurea sphaerocephala* (*C. sphaerocephala*) contre l'impact toxique de l'acide valproïque (VPA) associé au stress oxydatif sur les différents tissus des rats Wistar albinos. Pour atteindre cet objectif, l'extrait *n*-butanol à des doses (50 et 100 mg/kg) combiné à un traitement par le VPA (300mg/kg) ont été administrés par gavage aux rats males pendant 14jours. Les animaux sont sacrifiés et disséqués au 15ème jour. Une ablation suivie d'une homogénéisation des organes (foie, reins, cerveau et testicules) a été réalisées pour l'étude de la peroxydation lipidique et le dosage des antioxydants : catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réduit (GSH). Des petits morceaux de ces organes sont prélevés et utilisés pour l'étude histologique.

Le dysfonctionnement provoqué par le VPA s'exprime par une augmentation significative de la peroxydation lipidique signalée suite à une détermination du taux d'MDA tissulaire ainsi qu'une diminution significatif du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, GPx), accompagné aussi par des changements notables des paramètres biochimiques caractérisés surtout par une élévation de la concentration de la créatinine et la glycémie ainsi que le taux de cholestérol, des triglycérides et des aminotransférases (AST, ALT) qui sont libérés une fois que les cellules hépatiques lésées et leurs membranes perforées. Aussi bien, et sur le plan histologique, les résultats ont montré clairement des altérations de l'histoarchitecture des différents tissus étudiés : hépatique, rénale et testiculaire.

En revanche, le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol de *C. sphaerocephala* à des doses (50 et 100mg/kg) et la vitamine E à la dose (100mg/kg) a permis de rétablir les paramètres biochimiques à leurs valeurs normales et améliorer également les paramètres antioxydants ainsi que l'aspect histologique des différents tissus étudiés. On a enregistré l'absence totale des spermatozoïdes au niveau des testicules.

L'extrait *n*-butanol de la plante possède une action protectrice vis-à-vis du stress oxydatif résultants du traitement des rats par le VPA grâce à son effet antioxydant.

Les tests antioxydants *in vitro* (piégeage de radical DPPH, inhibition de LPO,) des extraits des différentes phases (éthyle acétate et butanolique) de la plante *C. Sphaerocephala* ont indiqué que les différents extraits jouent le rôle de scavenger des radicaux libres, de plus ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et phénols totaux qui sont relativement élevées.

Le test anticancéreux a été réalisé en utilisant une souche cellulaire (HeLa) en analysant les différentes doses de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. sphaerocephala*. Les résultats indiquent que l'extrait exerce un effet anticancéreux selon des concentrations dépendantes.

Les mots clés : *Centaurea sphaerocephala*, l'acide valproïque, stress oxydative, activités antioxydantes, composés phénoliques.

Abstract

This work is devoted to study the protective effect of n-butanol extract of *Centaurea sphaerocephala* (c. *sphaerocephala*) against the impact toxic of valproic acid (VPA) associated with oxidative stress on different tissues in male Wistar albino's rats. For that, *n*-Butanol extract of *C. sphaerocephala* (50mg/kg and 100mg/kg) and VPA (300mg/kg) were administered by gavage for 14days. At the end of the experiment or in the 15th day, animals were scarified, dissected and different organs (liver, kidney, brain and testicular) were removed, homogenized and used for determination of lipid peroxidation and antioxidant enzymes (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and the level of reduced glutathione (GSH)). A small species of these organs were used for histopathological examination.

The dysfunction caused by the VPA is expressed by a significant increase of lipid peroxidation reported by a determination of the level of tissues MDA and a significant decrease in GSH level and activity of enzymes antioxidant enzymes activities (catalase and GPx). This accompanied by a changes in biochemical parameters characterized especially by an increase in the concentration of creatinine, blood sugar, cholesterol levels, triglycerides and Aminotransferase (AST, ALT) which are released once that liver cells damaged and their membrane perforated.

As well, the histological' results showed clear alterations in the histoarchitecture of the different tissues studied: liver, kidney and testicular.

Indeed, the pretreatment of rats by *n*-butanolic extract of *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) and Vit E (100mg/kg) restored the biochemical parameters to their normal values and also improved the antioxidant parameters as well as the histological appearance of the different tissues studied.

n-butanol extract of this plant has a protective effect action against the oxidative stress resulting from the treatment of rats by the VPA due to its antioxidant effect.

The in vitro Antioxidant tests (scavenging the radical DPPH, inhibition of LPO,) of the extracts the different phases (ethyl acetate and *n*-butanol) of *C. Sphaerocephala* indicated that various extracts have the role of free radical's scavengers. In addition, these activities are strongly correlated with the levels of flavonoids and total phenols which are relatively high.

The anticancer test was carried out using (HeLa) cell line by analyzing the different doses of the *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* plant. The results indicate that the extract has an anti-cancer effect concentrations dependent.

Keywords: *Centaurea sphaerocephala*; oxidative stress; valproic acid; antioxidant activities; lipid peroxidation; plant extract; phenolic compounds

بينت هذه الدراسة الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للنبته *Centaurea sphaerocephala* اتجاه السمية المحرضة بواسطة دواء VPA عند الجرعة (300 mg/mg) المعطاة عن طريق الفم لمدة 14 يوم لذكور الجرذان من السلالة *Wistar albinos*. حيث اظهرت هذه التجارب الفعل السام لهذا الدواء على مستوى كل من النسيج الكبدي، الكلوي، الخصيتين والمخ ويتجلى ذلك من خلال ارتفاع في مستوى مؤشر التوتّر التأكسدي (MDA) وانخفاض في نشاط كل من الإنزيمات (GPx, catalase) كذلك انخفاض مستوى GSH

كما ادت معاملة ذكور الجرذان بنفس الجرعة إلى ارتفاع معنوي في نشاط المؤشرات البيو كيميائية للوظيفة الكبدية AST و ALT ، مؤشر الوظيفة الكلوية كريا تنين وكذلك ارتفاع في تركيز كل من الجلوكوز الكولسترول و الجلسيريدات الثلاثية في البلازما. إضافة إلى ذلك أظهرت الجرذان المعاملة بهذا الدواء تغير مورفولوجي على مستوى كل من النسيج الكبدي الكلوي أين نلاحظ تعرض الخلايا للنخر وعلى مستوى الخصيتين نلاحظ تشوه و غياب كلي للحيوانات المنوية.

أثبتت النتائج المتحصل عليها الدور الوقائي الذي يلعبه المستخلص البيتانولي لهذه النبته إذ ادت المعاملة بهذا المستخلص بالجرعتين (50ملغ/كلغ أو 100ملغ/كلغ) لجرذان معالجة بالجرعة (300ملغ/كلغ) دواء VPA إلى تعديل مستوى و نشاط كل من الإنزيمات المضادة للأكسدة (GPx, CAT) و مستوى GSH ، بالإضافة إلى انخفاض في مستوى مؤشر الأكسدة الفوقية للدهون (MDA). كما اظهرت الدراسة النسيجية إضافة إلى ذلك تغيرا معنويا في نسبة التحولات المورفولوجية الكبدية و الكلوية حيث نلاحظ غياب شبه كلي للخلايا التي تعرضت للنخر أما على مستوى الخصية فنلاحظ زيادة في عدد الحيوانات المنوية.

أما الاختبارات خارج العضوية، فتناولت هذه الدراسة الفعل المضاد للأكسدة للمستخلص البيتانولي و مستخلص اثيل اسيتات لهذه النبته حيث بينت النتائج أن كل من هذين المستخلصين يحتويان على كميات معتبرة من الفينولات و الفلافونيدات التي لها القدرة على اقتناص الجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية :

التوتّر التأكسدي، الفعل المضاد للأكسدة، المستخلص النباتي، المركبات الفينولية، الأكسدة الفوقية للدهون، *Centaurea sphaerocephala*، Acide Valproïque

Annexes

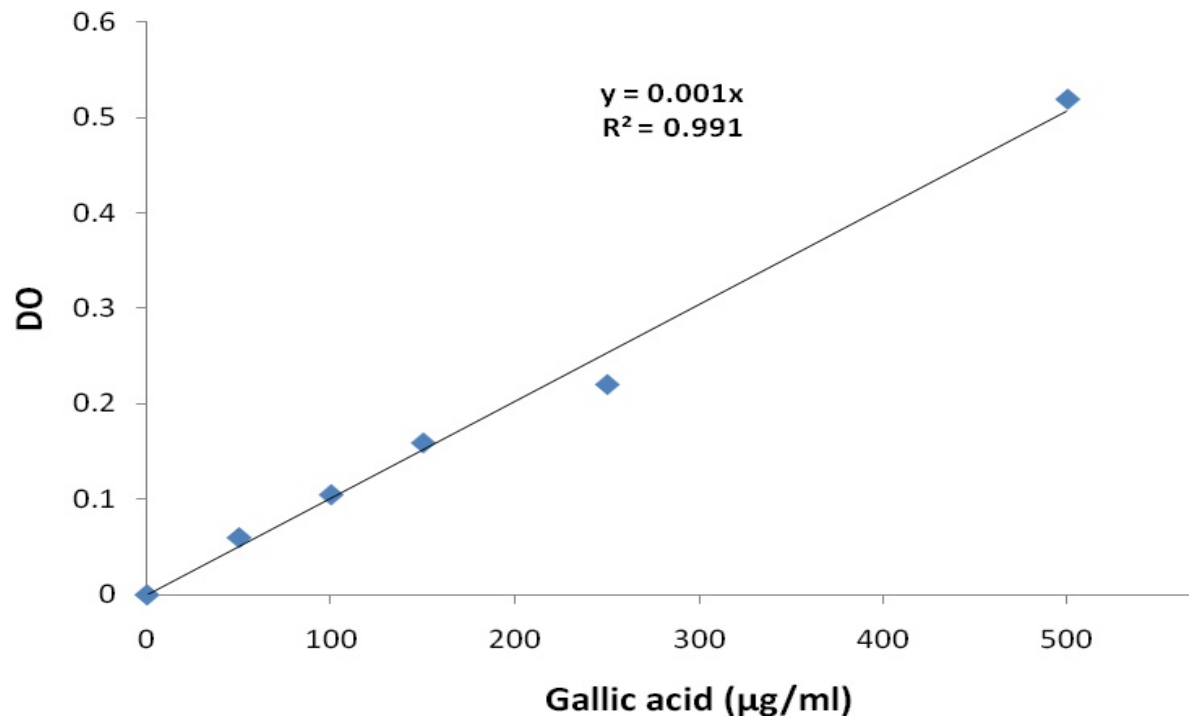


Figure 1 : Courbe étalon du dosage des phénols totaux (acide gallique comme standard)
(.Moyenne de 3 essais)

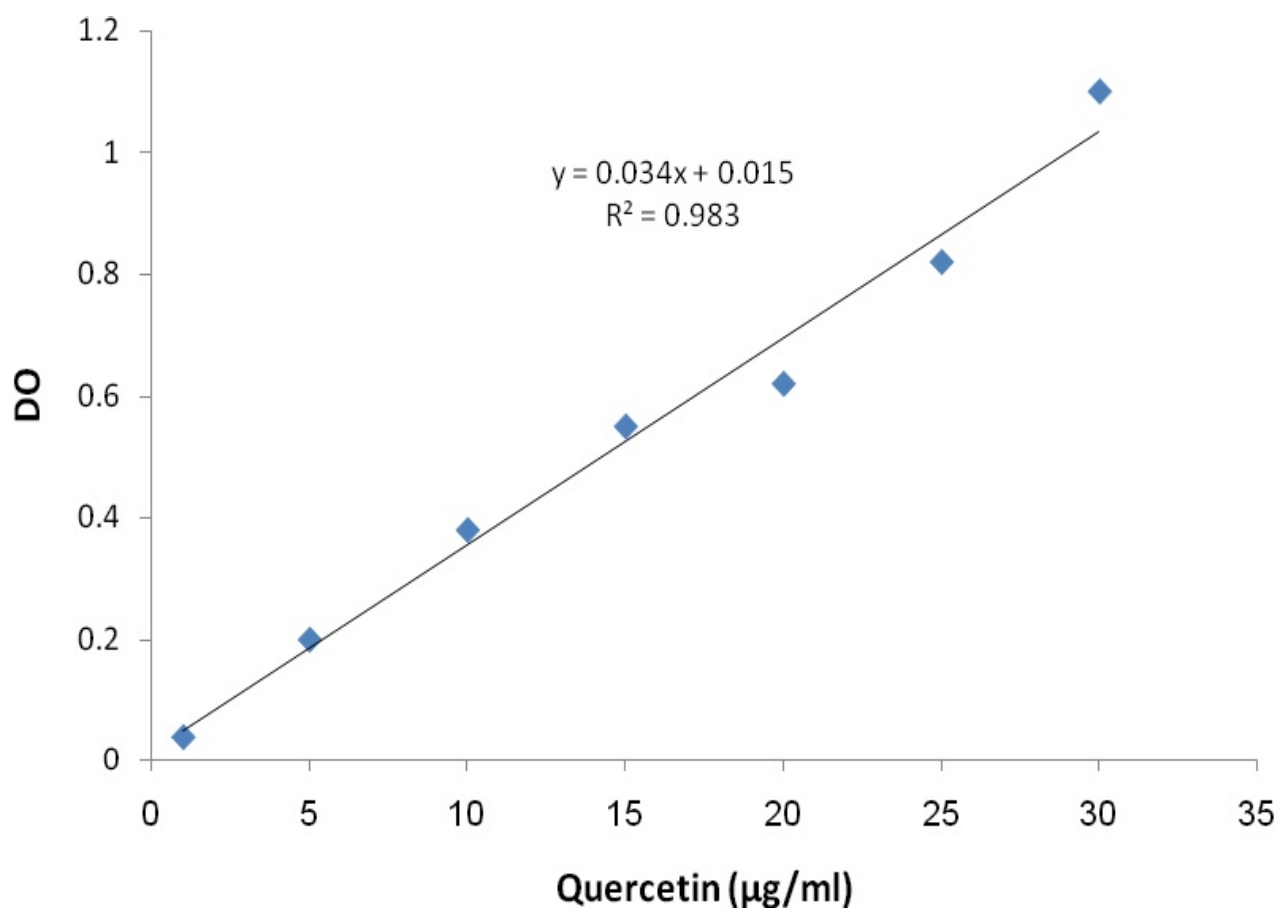


Figure 2 : Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (quercétine comme standard
(Moyenne de 3 essais)

Sodium Valproate-Induced Hepatic Dysfunction in Albino Rats and Protective Role of *n*-Butanol Extract of *Centaurea sphaerocephala* L.

Amina Maya Lahneche¹, Ratiba Boucheham², Nassima Boubekri¹, Sabah Bensaci³, Sabrina Bicha², Ali Bentammen², Fadila Benayache², Samir Benayache², Djamila Zama^{1,2*}.

¹Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, Route 'Aïn El Bey, Constantine, 25000, Algérie.

²Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Route Aïn El Bey, Constantine, Algérie.

³Service d'Anatomie Pathologique, EHS, Daksi Constantine, 25000, Algérie

Received: 14th Oct, 17; Revised 18th Oct, 17, Accepted: 18th Oct, 17; Available Online: 25th Oct, 17

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the protective effect of *n*-butanol extract of *Centaurea sphaerocephala* (*C.sphaerocephala*) and Vitamin E against sodium valproate-induced hepatotoxicity and oxidative stress in male rats. Male rats were divided into eight equal groups treated with plant extract (50mg/kg, 100mg /kg), Vit. E (100mg/kg) and VPA (300mg/kg). At the end of the experiment, animal were scarified and samples (blood and liver's tissue) were removed isolated for biochemical and histological study. VPA-treated rats showed hepatic injury characterized by a significant increase in biochemical parameters (serum transaminase, cholesterol and triglycerides). Also, VPA induced oxidative stress exhibited a significant increase in MDA level and significant decrease in GSH levels, CAT and GPx activities. These effects were accompanied by histopathological changes in liver. While the pretreatment by *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* reversed the alteration induced by VPA and reduced its toxic effects. The results showed a significant decrease in serum markers and liver's lipid peroxidation whereas GSH level and the activities of GPx, CAT enzymes were significantly increased. Histopathological observations correlated with the biochemical parameters. VPA-induced hepatotoxicity involved free radical production, the antioxidant and free radical scavenging property of *Centaurea sphaerocephala* would have provided the protection against hepatic damage.

Keywords: Valproic acid; *Centaurea sphaerocephala* L; Hepatotoxicity; Oxidative stress; Lipid peroxidation; protective effect.

INTRODUCTION

Valproic acid (VPA) is a well-established anticonvulsant drug used in the treatment of many forms of generalized epilepsy and psychiatric disorders to control epileptic seizures and regulate the mania associated with bipolar disorder^{1,2}. VPA is well tolerated at therapeutic doses and it has inherent toxicity³. Two types of serious side-effects limit the use of this drug: hepatotoxicity and teratogenicity⁴ However, Administration of VPA produced many metabolic and morphological aberrations in the liver⁵. Also, histopathological and biochemical studies indicated that VPA evoked hepatic necrosis, apoptosis and steatosis⁶.

Furthermore, VPA increased intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in several tissues, including liver, brain and small intestine⁷. But the mechanism by which VPA induces liver injury remains unknown⁸. A possible VPA biotransformation and/or alterations in natural antioxidants might contribute to the VPA associated complications.

However, the main cause of VPA hepatotoxicity was shown to be due to generate the free radical scavenger⁹.

Oxidative stress, as a result of compromised antioxidant capacity and/or increased production of reactive oxygen species (ROS) has been also proposed as one mechanism for VPA-induced hepatotoxicity¹⁰.

Lipid peroxidation may be involved as an additional mechanism of VPA-induced liver damage in rats¹¹. Injection a single dose of VPA to rats resulted in a dose-dependent elevation levels of lipid peroxidation in plasma and liver¹². However, antioxidants were the primary candidates to counteract such toxic effect. Glutathione (GSH) as a major antioxidant and redox regulator play an important role in the defense against oxidants and electrophiles¹³. Consequently, any mechanism which removes ROS or prevents hepatic GSH depletion or induce activation and production of GSH dependent enzymes may provide protection for hepatotoxicity in VPA-treated patient¹⁴. Also Cells can be protected from oxygen-derived radical injury by naturally occurring free- radical scavengers and antioxidant pathways, including vitamins A, C, E, SOD, catalase and glutathione peroxidase¹⁵. Moreover, many therapeutic studies are offered to plants

since plants are a natural source of antioxidants and hence reduce oxidative stress¹⁶.

The genus *Centaurea* (Asteraceae) contained more than 500 species. 45 species growing in Algeria, including 7 in the Sahara^{17,18}. Many species of the genus *Centaurea* have been used in traditional medicine to cure various ailments (diabetes, diarrhea, rheumatism, malaria, hypertension)¹⁹. To our knowledge, no traditional uses or pharmacological studies are reported so far for this species. So, as a part of our ongoing research program on beneficial health effects of plants and herbs^{20,21}, we investigate in the present study, the ability of the protective effect of *n*-butanol extract of *Centaurea sphaerocephala* an Algerian endemic plants and vitamin E on VPA-induced liver damage in male rats.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extraction procedure

Aerial parts of *C. sphaerocephala* were collected from the area of El Kala, Algeria (21 m, 36° 53' 44" N, 8° 26' 35" E) in May 2012 and authenticated on the basis of Quezel and Santa (1963)¹⁸ by Professor M. Kaabache, specialist in the identification of Algerian *Centaurea species* (Ferhat Abbas University, Setif 1, Algeria). A voucher specimen (CSA0512-EK-ALG-65) was deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, Frères Mentouri University Constantine 1.

The leaves and flowers (2000 g) of this plant were macerated for 24 h, three times with methanol-water (70:30, v/v) at room temperature. After filtration, the filtrate was concentrated under vacuum (up to 35 °C), the remaining solution (400 mL) was dissolved in distilled H₂O (800 mL) under magnetic stirring and maintained at 4 °C overnight to precipitate a maximum amount of chlorophylls. After filtration, the resulting solution was extracted successively with chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (*n*-BuOH). The organic solutions were dried with sodium sulfate (Na₂SO₄), filtered using common filter paper and concentrated in vacuum (up to 35 °C) to obtain the following extracts: CHCl₃ (5 g), EtOAc (4.94 g) and *n*-BuOH (34 g).

Animals and Treatment

Male Wistar albino rats weighing (150-200 g) were obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria). Animals were housed in plastic cages, with controlled laboratory conditions of light/dark cycle (12 h/12 h), temperature (22±2°C) and relative humidity, with food and tap water. Rats were adapted for 2 weeks before the indicated treatments. All experimental procedures were performed between 8–10 a.m. and care was taken to avoid stress full conditions. Also, all experimental assays were carried out in conformity with international guidelines for the care and use of laboratory animals. Animals were left for 10 days before being randomized into experimental groups of 8 animals and four animals per cage. The study protocol was approved by the Institutional Animal Ethical Committee. Rats were housed four per cage and were randomly divided into 8 groups (8 animals in each group):

Group 1, non-treated served as control; Group 2 and Group 3, received plant extract (50 mg/kg) and (100mg/kg) respectively; Group 4 treated with 300 mg/kg per day

sodium valproate; Group 5, rats received Vitamin E (100mg/kg); Groups 6, 7, 8 received respectively, plants extract (50 and 100mg/kg), vitamin E (100 mg/kg) 1 hour before treatment with VPA (300mg/kg). Treatments were given for 14 days by gavage.

After treatment, blood samples were drawn from the caudal vena cava, collected in test tubes containing EDTA, and centrifuged to obtain serum for analysis of biochemical parameters. The rats were sacrificed by decapitation after deep ether anesthesia; livers were isolated to measure the levels of antioxidant enzymes, MDA and histopathological studies.

Preparation of tissues samples

Livers were perfused with ice NaCl 0.9% solution to remove blood cells, removed quickly and placed in the same solution. After blotted on filter paper, weighed, and homogenized in ice-cold KCl 1.015% with the addition of 6 µl of 250 µM butylated hydroxytoluene to prevent the formation of new peroxides during the assay. The homogenization procedure was performed under standardized condition. Homogenates (20%) were centrifuged and the supernatant was kept on ice until assayed or conserved in freezer – 80°.

Lipid peroxidation determination

Lipid peroxidation (LPO) was determined by measuring the formation of TBRA using the colorimetric method of Uchiyama²². 3ml of phosphoric acid (1%) and 1ml of thiobarbituric acid (TBA, 0.67%), aqueous solution were added to 0.5 ml of liver homogenate (20%) pipetted into centrifuge tube. The mixture was heated for 45 min in a boiling water bath. Then the mixture was cooled at room temperature, and 4 ml of *n*-butanol was added and mixed vigorously. After centrifugation, the absorbance was measured at 532 nm. MDA was used as the standard.

Measurement of reduced glutathione

Reduced glutathione (GSH) content in the liver was measured chemically according to the method described by Elman²³ using Elman's reagent. This method is based on the reactive cleavage of 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) by sulfhydryl group to yield a yellow color with maximum absorbance at 412 nm against reagent blank.

Evaluation of GPx activity

GPx activity in the liver was measured chemically according to the method described by Flohe²⁴. This method is based on the reduction of H₂O₂ in the medium by GPx in the presence of GSH. Briefly 0.2ml supernatant obtained from tissues, 0.4ml GSH (0.1 mM), 0.2ml TBS solution (Tris 50mM, NaCl 150mM PH 7.4) were added to the tubes and mixed. After 5 min incubation at 25 °C, 0.2 ml of H₂O₂ (1.3mM) was added in the mixture. The reaction was stopped after 10 min by addition of 1 ml trichloroacetic acid (TCA 1%, w/v), and then the tubes maintained at 0-5°C in an ice bath for 30min. After centrifugation, 0.48ml supernatant was taken and added to each tube, and then 2.2 ml TBS solution and 0.32 ml DTNB (1mM) were added. The optical density was measured at 412 nm in the spectrophotometer after 5 min.

Evaluation of the catalase activity

The enzymatic activity of catalase was measured as described by (Claiborne, 1985)²⁵. The homogenate was

centrifuged at 10000 rpm for 45 min at 4° C; the final supernatant is the source used for the evaluation of the activity of catalase. The disappearance of H₂O₂ was determined spectrophotometrically at 240 nm. Catalase activity was expressed as U/mg of protein. In order to express the antioxidant enzyme (GPx, catalase) activities per gram of protein, total protein concentration was determined calorimetrically by using the method of (Lowry, 1951)²⁶.

Plasma biochemical analysis

The liver marker enzymes, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) also, total cholesterol and triglycerides were estimated using commercial kits (Spinreact, SPAIN).

Histopathological examination

For histopathological analysis, hepatic tissue fragments were taken and fixed in neutral formalin 10 % solution. The fixed specimens were then trimmed, washed and dehydrated in ascending grades of alcohol. These specimens were then embedded in paraffin, cut into 5µm thick sections and stained with Harris hematoxylin and eosin for microscopically examination²⁷.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD and statistical interferences were based on student's test for mean values comparing control and treated animals using Graph Pad Prism 5.01 Retail+5.02 Update, Version 5. The statistical significance was accepted at a level of P<0.05.

RESULTS

Impact of VPA, vitamin E and n-butanol extract of *Centaurea sphaerocephala* on serum transaminases levels.

As shown in Figure 1, the administration of toxic dose of VPA (300mg/kg) caused a significant increase in liver enzymes (AST and ALT) with the values 130.32±2.11U/l, 95.72±4.14U/l respectively. This increase was statistically significant (P<0.001) compared to control group 75.14±2.42U/l, 66.63±1.01U/l respectively. Animals pretreated with n-butanol extract (100mg/kg) and Vit. E (100mg/kg) showed a significant decrease (P<0.01, P<0.001) in these liver enzymes compared to VPA-treated animals. While, plasma levels of these enzymes in rats pretreated group with extract (50mg/kg) were significantly decrease (P<0.05) and (P<0.01) respectively.

The protective effect of n-butanol extract of *C. sphaerocephala* and vitamin E on cholesterol and triglycerides levels.

The VPA treated rats exhibited a significant increase (p<0.001) the cholesterol and triglyceride serum levels compared to control group. The pretreatment with both doses of plant extract and Vit. E (100mg/kg) decreased significantly (p<0.01) the total cholesterol compared to VPA-group. A significant reduction in triglycerides was observed in rats pretreated with n-butanol extract (50mg/kg, 100mg/kg) (p<0.01, p<0,001) and Vit E (p<0,001) compared to VPA-treated rats (Figure 2).

The protective effect of n-butanol extract of *C. sphaerocephala* and vitamin E on VPA- induced lipid peroxidation in liver

The administration of VPA induced a significant increase (P<0.01) in lipid peroxidation in liver tissue compared to control. While the pretreatment with n-butanol extract (100mg/kg) and Vit E (100 mg/kg) produced a significant decrease (P<0.01) in lipid peroxidation in liver compared to VPA group (Fig 3).

Effect of VPA, n-butanol extract of *C. sphaerocephala* and Vitamin E on liver GSH levels

As showed in Figure 4, a significant decrease in GSH levels of liver's tissue was observed in VPA group (P<0.001) compared to control or untreated rats. While co-administration of plant extract (100mg/kg) and vit E (100mg/kg) with VPA increased significantly (P<0.01) the level of GSH compared to VPA group, in the other side, group pretreated with 50mg/kg has significant decrease with (P<0.05) in GSH level.

Effect of VPA, n-butanol extract of *C. sphaerocephala* and Vitamin E on GPx activity in liver.

As illustrated in Figure 5, VPA induced significant decrease (P<0.001) in GPx activity compared to control or normal group. Furthermore, there was found a marked significant increase (P<0.001) in GPx activity after co-treatment with plant extract (100mg/kg, 50mg/kg) and VitE (100mg/kg) compared to VPA group (Figure5).

Effect of VPA, n-butanol extract of *C. sphaerocephala* and Vitamin E on Catalase activity in rats' liver

CAT activity was significantly decreased (P<0.01) in liver rat's tissue after administration of VPA (300mg/kg) compared to control. Furthermore, n-butanol extract of *C. sphaerocephala* (100mg/kg) and Vit E (100mg/kg) showed a significant increase (P<0.05; P<0.01) respectively in catalase activity compared to its activity in VPA group (Figure 6).

Histological examination

Effect of VPA and n-butanol extract of *C. sphaerocephala* on liver histology

As shown in Figure 7 (A) the liver of control or untreated rats showed normal histological architecture. Liver's VPA treated-rats (300mg/kg), showed dilatation and vascular congestion (D, a); steatosis (D, b) and hepatic necrosis (D, c). While the liver's section of plant extract treated rats showed a normal histological picture that closely approximate of the control group (Figure7 B, C).

Also, sections belonging to groups pretreated or co-administrated by VPA and Vit. E or VPA and n-butanol extracts showed relatively normal ultrastructure compared to VPA group (Figures 7, G, F and H).

DISCUSSION

The use of VPA as an anticonvulsant has been supported by clinicians, which was subsequently challenged due to its side-effects and induced toxicity²⁸. The most serious of those being hepatotoxicity²⁹, teratogenicity³⁰ and neurotoxicity³¹ which are associated with increased reactive oxygen species (ROS) formation³².

The mechanism of hepatic injury has been studied extensively but is still unclear. Some authors hypothesized that VPA aberrant metabolism with the formation of toxic metabolites or mediation of lipid peroxidation might be the underlying mechanism of serious hepatic reactions^{33,34}.

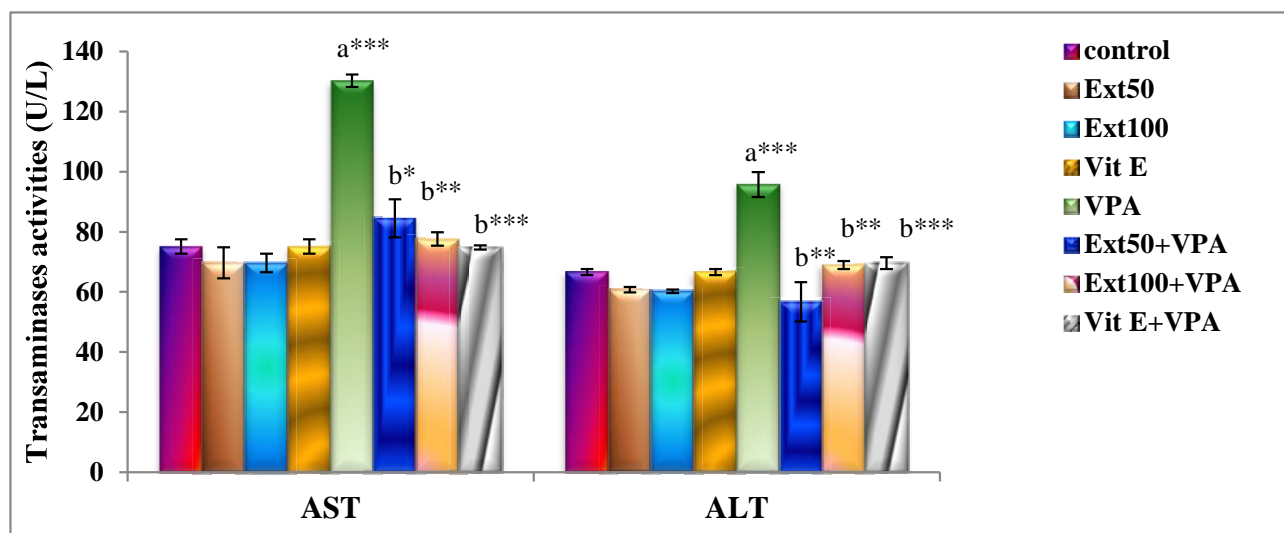


Figure 1: Effect of VPA (300mg/kg), Vit. E (100mg/kg) and *n*-butanol extract (50mg/kg, 100mg/kg) of *C. sphaerocephala* L. on serum aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels in experimental rats. Data are reported as means \pm SD. (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001). a: compared to control group, b: compared to VPA group.

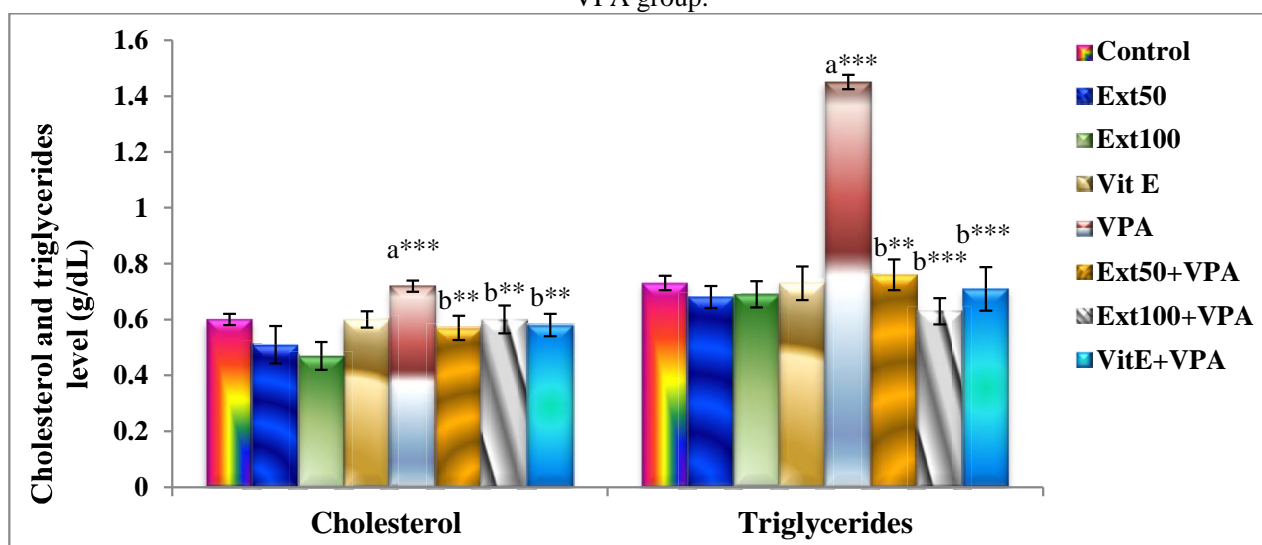


Figure 2: The protective effect of *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* (50mg/kg and 100mg/kg) and Vit E (100mg/kg) against VPA-induced toxicity. Effect on serum cholesterol and triglycerides levels in rat's liver. Data are reported as means \pm SD. a: group compared to control group, b: group compared to VPA group. (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001).

Lipid peroxidation is one of the excessive ROS consequences while causing cell damage. It was shown that VPA induced lipid peroxidation in rat hepatocyte cultures^{35,36}.

In the present study, administration of VPA to rats caused a significant increase of lipid peroxidation as indicated by the significant increase in MDA level compared to the control group; suggesting that VPA activated the formation of free radicals in hepatic tissue. These results confirmed by others findings which demonstrated that VPA exposure stimulated the generation of ROS^{37,38}. Also, study reported elevated serum LPO levels in epileptic children who had VPA therapy when compared to pretreatment group³⁹. Another study reported increased in plasma LPO levels in epileptic adults who were treated with VPA⁴⁰.

It is well known that reduced glutathione (GSH) is a major antioxidant and redox regulator, which is present in all cell types. Is the most abundant cellular thiol, and plays an important role in the defense against oxidants and electrophiles⁴¹. Also it is a substrate for glutathione peroxidase (GPx) and detoxifies foreign compounds and biotransformation drugs⁴². In our investigation, GSH level, CAT and GPx activities decreased in rats' liver of VPA-treated group compared to control animals. The increased production of ROS caused inactivation of antioxidant enzymes which reflects their consumption through the oxidative stress. In agreement with this finding, the significant decrease of GSH content in VPA-treated rats suggested that it might be due to exhaustion of GSH stores and increase in the oxidative stress. These results are in agreement with others studies^{43,44}.

Also, the activity of erythrocytes GPx decreased in patients

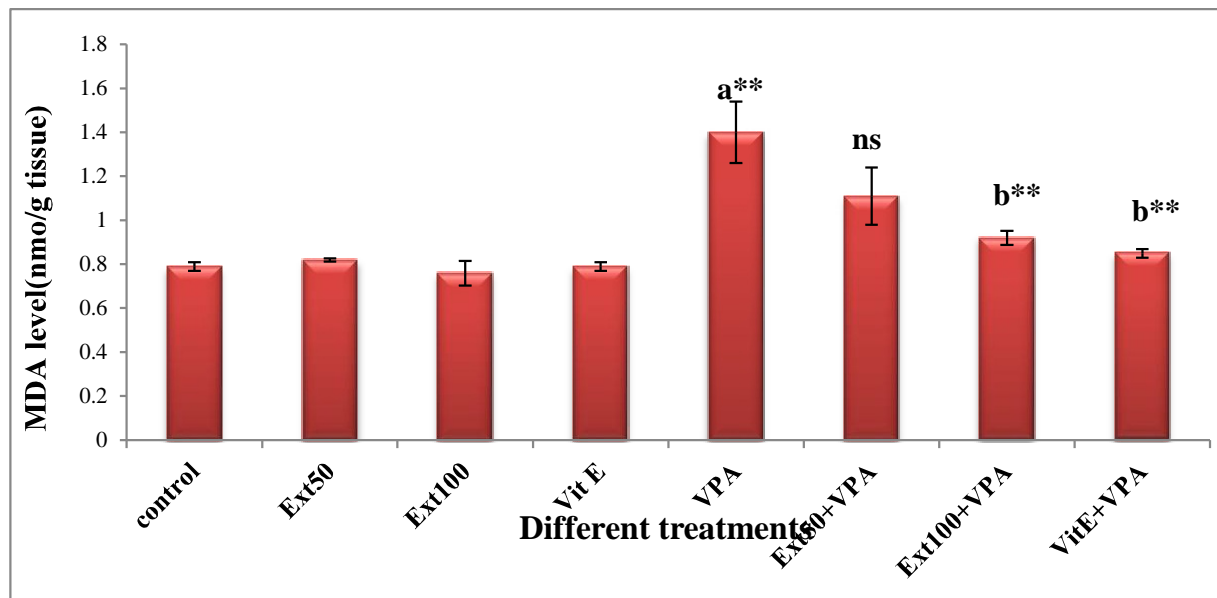


Figure 3: Effect of VPA (300mg/kg), *n*-butanol extract of a *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) and vitamin E (100mg/kg) on lipid peroxidation (TBARs content) in rat's liver. Data are reported as means \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.) ns: non-significant. a: compared to control group, b: compared to VPA group.

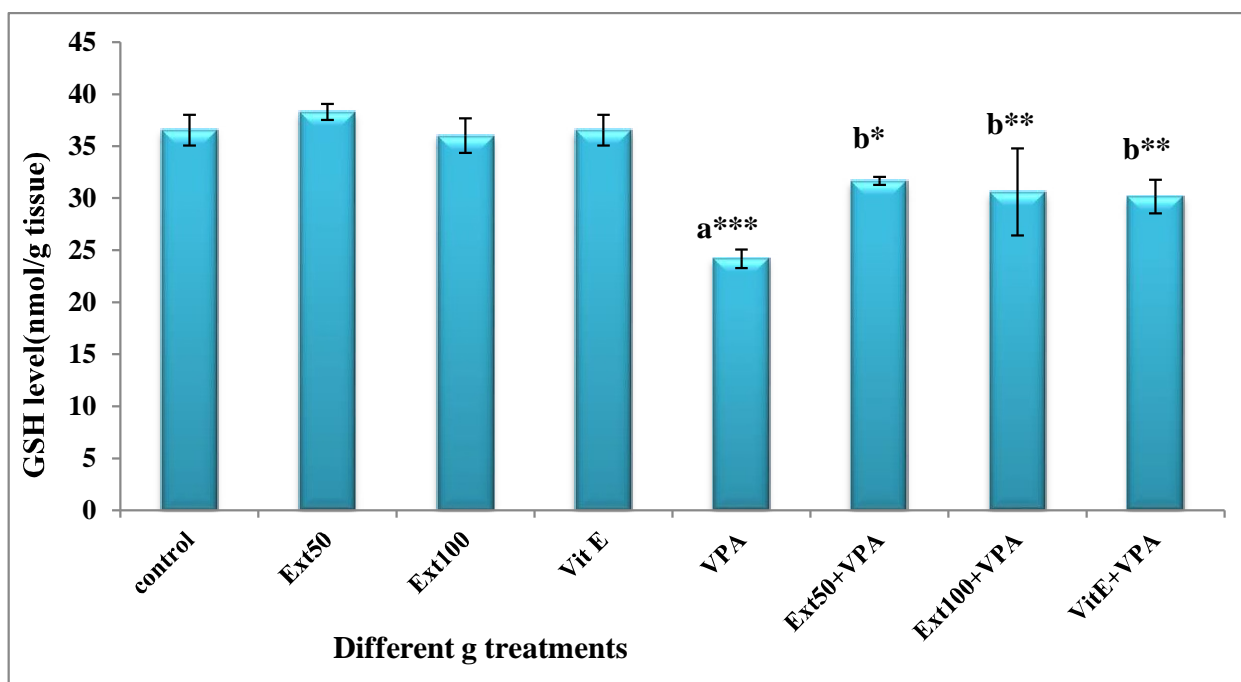


Figure 4: The effect of *n*-butanol extract of *C. Sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg), Vitamin E (100mg/kg) and VPA (300mg/kg) on GSH level in rat's liver. Data are reported as means \pm SD. a: group compared to control group, b: group compared to VPA group. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

treated with VPA⁴⁵ and in rats administered VPA intraperitoneally⁴⁶.

One of the most sensitive and dramatic indicators of hepatocyte injury is the release of intracellular enzymes such as AST, ALT after VPA administration. The elevated activities of these enzymes indicated a hepatocellular damage⁴⁷. Our results showed that VPA administration caused severe acute liver damage in rats, demonstrated by the significant elevation of plasma AST and ALT levels, suggesting that excessive VPA might cause critical injury to the organ. These findings concurred with the results of other studies^{48,49}. Also, in the current study; the VPA-treated rats exhibited significantly higher Cholesterol and

triglycerides levels than the control rats. This increase consistent with the finding of other study which reported that administration of VPA caused significant increase in the levels of lipid profile (cholesterol, triglycerides, phospholipids and free fatty acids)¹¹. Moreover, histological studies of VPA-induced toxicity have shown extensive factor lead to sever distortion of liver architecture, vascular congestion, microvesicular steatosis with and hepatic necrosis which is in agreement with other studies^{50,51}.

Plants produced significant amount of antioxidants such as polyphenols, phenols and flavonoids. These compounds scavenge a wide range of free radicals, including the most

active hydroxyl radical, which may initiate lipid peroxidation and prevent the loss of the lipophilic (α -tocopherol) and hydrophilic (ascorbate) antioxidants, by repairing tocopheryl and ascorbate radicals⁵².

In our study, administration of *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* (50mg/kg,100mg/kg) or vitamin E (100 mg/kg) simultaneously with VPA to male rats resulted in normalization of lipid peroxidation process as well as glutathione content, glutathione peroxidase and catalase activity in rats' livers. Permitting the prevention of hepatic dysfunction and maintaining the normal level of serum transaminases, cholesterol and triglycerides following inhibition of their hepatic leakage by preventing lipid peroxidation. So, the protective efficacy of *C. sphaerocephala* may be due to the presence of several

active components. These results are in agreement with other studies which demonstrated that the antioxidant and free radical scavenging property of medicinal plants extract would have provided the protection against hepatic damage caused by valproic acid^{53,54}. Also, in this study we showed that, treatment with *C. sphaerocephala* improved histological changes in the liver caused by VPA.

CONCLUSION

Results of this study showed that VPA administration reduced antioxidants and increased lipid peroxidation which leads to organ damage. Also, it was observed that *C. sphaerocephala* exerted significant protection against VPA-induced toxicity by its ability to ameliorate the lipid

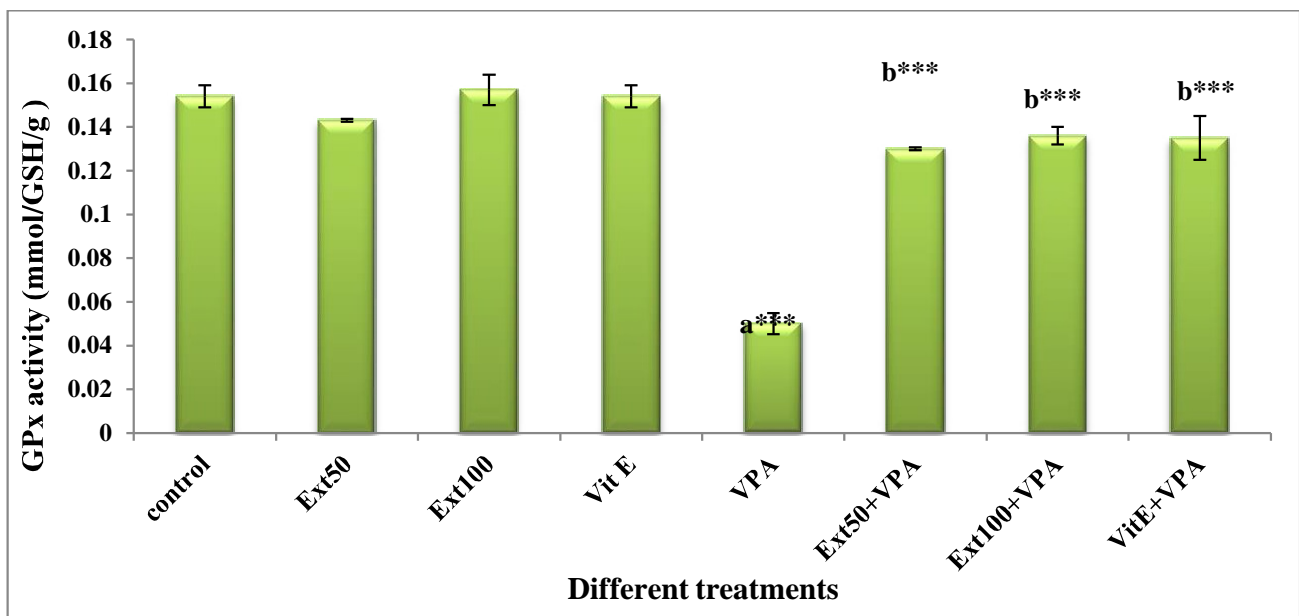


Figure 5: Effect of VPA (300mg/kg), *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) and vitamin E (100mg/kg) on GPx activity in liver's rats. Data are reported as means \pm SD; (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). a: compared to control group, b: compared to VPA group.

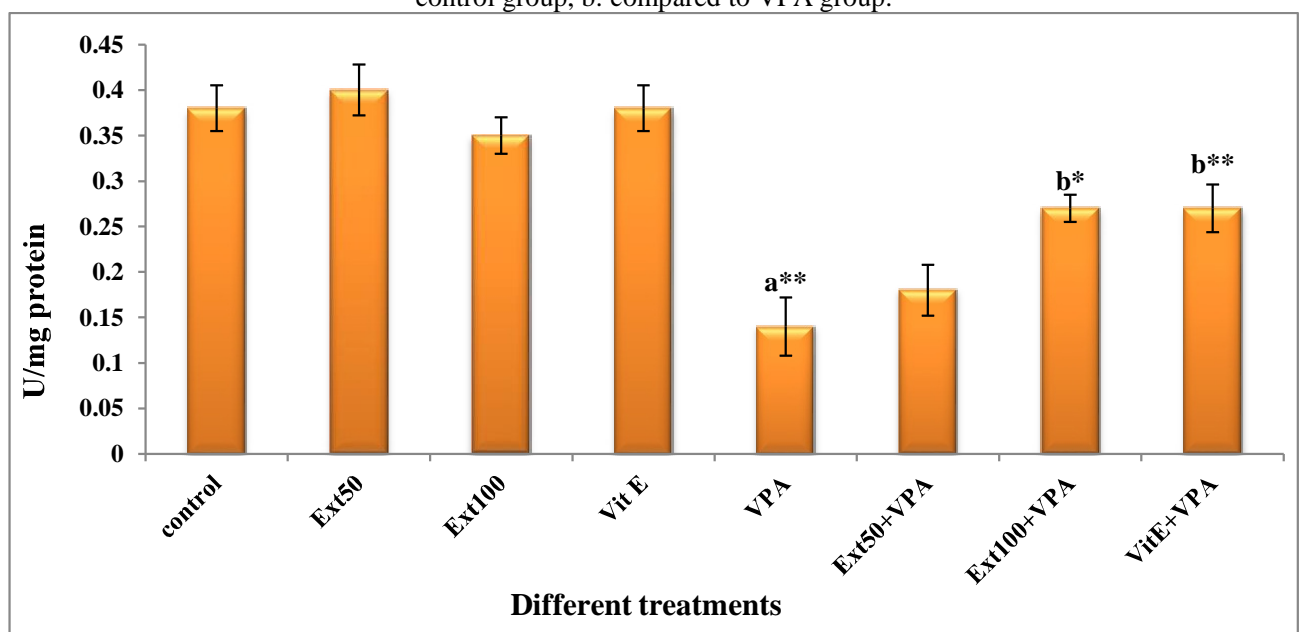


Figure 6: Effect of VPA (300mg/kg), *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* (50mg/kg, 100mg/kg) and Vit. E (100mg/kg) on catalase enzyme activity in rat's liver. Data are reported as means \pm SD. a: group compared to control group, b: group compared to VPA group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

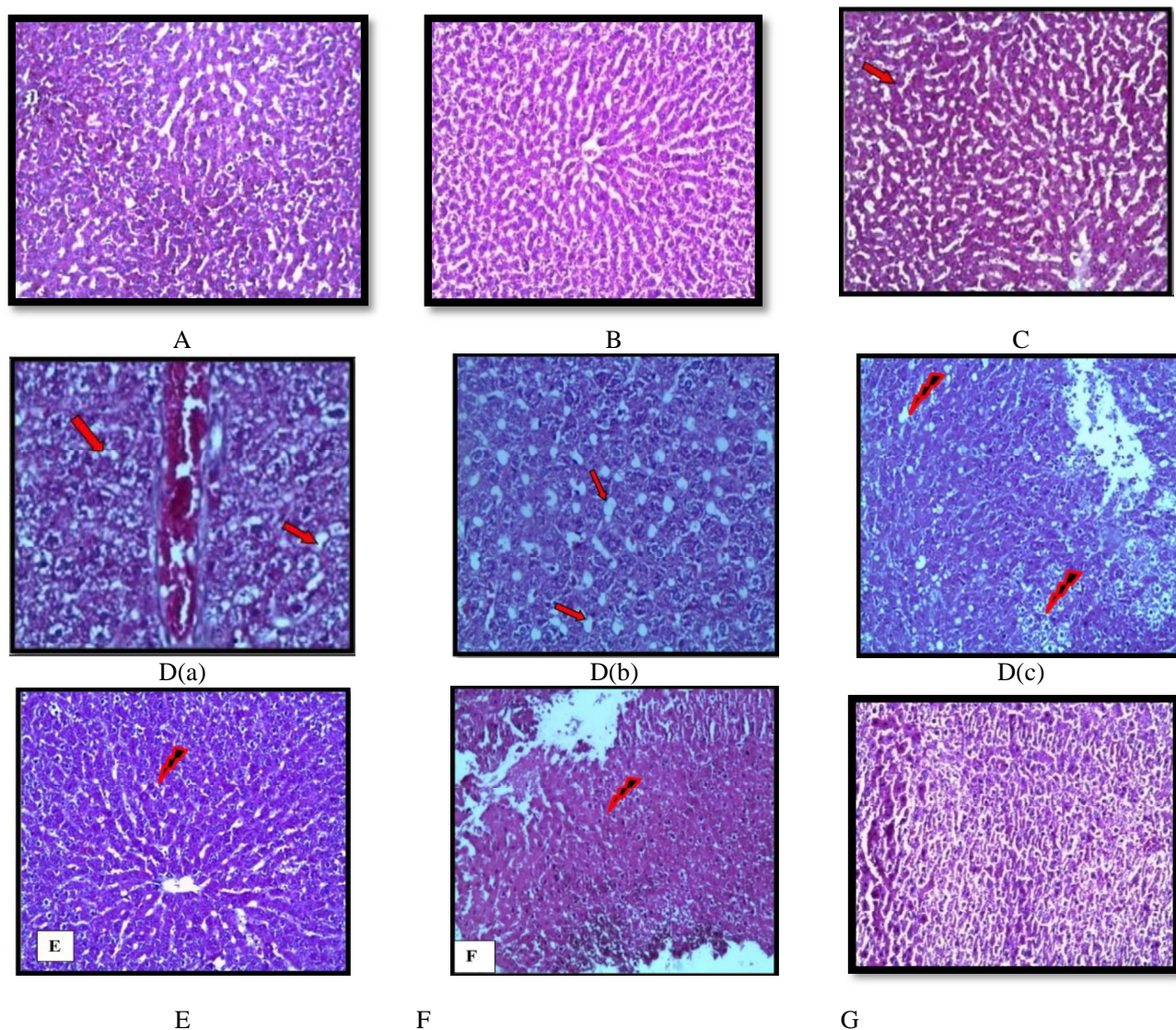


Figure 7: Photomicrographs of rat's liver section (H&E, $\times 100$, $\times 400$). (A): Control group showing normal hepatic architecture, ($\times 100$). (B & C): Rats' livers treated with *n*-butanol extract of *C. sphaerocephala* alone (50 mg/kg and 100 mg/kg) respectively. Treated group showed normal histology almost similar to the control group ($\times 100$). (D): VPA (300mg/kg) treated group showing distortion of normal architecture and irregularly-shaped hepatocytes as; vascular congestion (D, a), ($\times 400$); Steatosis (D, b), ($\times 400$) and necrosis, dilated and congested sinusoids veins (D, c), ($\times 400$). (E), (F): Livers 'section of rats treated with VPA (300mg/kg) and *C. sphaerocephala* extract (50mg/kg or 100mg/kg) respectively showed conserved hepatocytes ($\times 400$). (G): Livers 'section of rats treated with VPA (300mg/kg) and vitamin E (100mg/kg) showing a histological picture comparable to that of the control group with minimal damage of hepatocytes ($\times 400$).

peroxidation through the free radical scavenging activity, which enhanced the levels of antioxidant defense system. This effect could be attributed to its antioxidant properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) for financial support. Also, the authors thank Professor M. Kaabeche for the identification of the plant material.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Hacıhasanoğlu Cakmak N, Yanardag R. Edaravone a free radical scavenger, protects liver against valproic acid induced toxicity. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2015; 80: 627–637.
2. Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem*, 2013; 46 :1323-38.
3. Abdel Salam G, Abdelaziz OA. The effects of valproic acid on the skeletal development and the ameliorative effects of combined use of folic acid and Vitamin E in pregnant albino rats. *International Journal of Clinical and Developmental Anatomy*, 2015; 1: 70-78.
4. Heinz NauH. Siemes. Differentiation between valproate-induced anticonvulsant effect, teratogenicity

- and hepatotoxicity. *Pharmaceutisch Weekblad* .1992, 14(3): 101–107.
5. Abdou SF, El-Wakeel M, El-Saied MH. Protective effect of Silymarin and Vitamin E in hepatotoxicity induced by valproic acid in albino rats .*J.Med.Sci* , 2014;14:290-296.
 6. El-Mowafy AM, Abdel-Dayem MA, Abdel-Aziz A, El-Azab MF, Said SA.Eicosapentaenoic acid ablates valproate-induced liver oxidative stress and cellular derangement without altering its clearance rate: Dynamic synergy and therapeutic utility.*Biochimica et Biophysica Acta* , 2011;1811:460–467.
 7. Ustundag UV, Tunali S, Alev B, Ipekci H, Emekli-alturfan E, Tunali-akbay T, Yanardag R, Yarat A. Effects of chard (*Beta Vulgaris L. Var. Cicla*) on cardiac damage in valproic acid–induced toxicity .*Journal of Food Biochemistry*,2016;40:132–139.
 8. Khan M, Khattak ST, Maqbool E. Gross hepatic changes in developing albino rats exposed to valproic acid .*J Ayub Med Coll Abbottabad* , 2011;23:48-50.
 9. Al-Rouby NM, Gawish SM. Histological study on the possible protective effect of *Nigella Sativa* Oil on experimentally induced hepatotoxicity in albino rats treated with sodium valproate.*Global Advanced Research Journals*, 2013; 2 : 090-099.
 10. Ehab M. Abdella, Sanaa R.Galaly, Hanaa M.Mohammed, Sally M.Khadrawy. Protective role of vitamin E against valproic acid-induced cytogenotoxicity and hepatotoxicity in mice. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 67(4) , 2014: 127-139.
 11. Vidya M, Perumal S. Effects of α -ketoglutarate on antioxidants and lipid peroxidation products in rats treated with sodium valproate. *J. Appl. Biomed*, 2006 ; 4: 141–146.
 12. Tong V, Chang TK, Chen J, Abbott FS. The effect of valproic acid on hepatic and plasma levels of 15-F(2t)-isoprostane in rats. *Free Radic. Biol. Med*, 2003; 34:1435–1446.
 13. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity.*Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2005; 204: 263–273.
 14. Sabayan B, Foroughinia F,Chohedry A. A postulated role of garlic organosulfur compounds in prevention of valproic acid hepatotoxicity. *Medical Hypotheses*, 2007; 68: 512-514.
 15. Rani TS, Chandravadana Y. Influence of *Spirulina Fusiformis* on the sodium valproate induced hepatotoxicity and oxidative stress. *Pharmacologyonline*, 2008; 2: 265-281.
 16. Boubekri N,Boukaabache R, Amrani A , Belfarhi L , Zama D , Boumaza O , Benayache F , Benayache S . Hepatoprotective effect of *Genista quadriflora* munby extract against ethanol induced toxicity. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 2014;7 :226-229.
 17. Ozenda, P. Flore du Sahara septentrional et central. Centre National de La Recherche Scientifique(CNRS), Paris, 1958 :450-454.
 18. Quezel, P. Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales: Centre National de La Recherche Scientifique(CNRS) Paris, Tome II , 1963, p.1032.
 19. Sarker SD, Savchenko T, Whiting P, Sik V, Dinan LN. Moschamine, cis-moschamine, moschamindole and moschamindolol: Four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Natural Product Letter*, 1997; 9: 189-199.
 20. Lassed, S.; Deus, C.; Djebbari, R.; Zama, D.; Oliveira, P.J.; Rizvanov, A.; Dahdouh, A.; Benayache, F.; Benayache, S.Protective effect of green tea (*Camellia sinensis (L.) Kuntze*) against prostate cancer: from in vitro data to Algerian patients. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2017, 3, 1-12.
 21. Zama, D.; Meraihi, Z.; Tebibel, S.; Benaissa, w.; Benayache, F.; Benayache, S.; Vlietinck, A.J. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective roles of the butanolic extract of *Paronychia argentea L.* *Indian J. Pharmacol.*, 2007, 39(3), 145-150.
 22. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriobarbituric acid test. *Anal.Biochem*, 1978; 86: 271-278.
 23. Ellman GL. Plasma Antioxidants .*Arch. Biochem Biophys*, 1959; 82:70-77.
 24. Flohe L, Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1984 ; 105: 114-121.
 25. Claiborne A. Catalase activity In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed. Greenwald RA, 1985; pp 283–284.
 26. Lowry OH, Rosegrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent.*J. Biol. Chem*, 1951; 193: 265-275.
 27. Habbu PV, Shastry RA, Mahadevan KM, Joshi H, Das SK. Hepatoprotective and antioxidant effects of *argyrea speciosa* in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2008; 5: 158–164.
 28. Chaudhary S, Parvez S. An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience*, 2012; 225:258–268.
 29. Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, Shaki F, Shahraki J, Fard JK. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol In Vitro*, 2012; 26:545–55.
 30. Tung EW, Winn LM.Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol* , 2011;80:979–987.
 31. Wang C, Luan Z, Yang Y, Wang Z, Cui Y, Gu G.Valproic acid induces apoptosis in differentiating hippocampal neurons by the release of tumor necrosis factor- α from activated astrocytes. *Neurosci Lett* , 2011;497:122–127.
 32. Fourcade S, Ruiz M, Guilera C, Hahnen E, Brichta L, Naudi A, Portero-Otin M, Dacremont G, Cartier N,

- Wanders R, Kemp S, Mandel JL, Wirth B, Pamplona R, Aubourg P, Pujol A. Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet*, 2005; 19: 2010–2014.
33. Khan SK, Abdul-Shakoor , Jan MA, Khattak AM, Shah SH. Study of histopathologic changes in the liver of albino rats, induced by toxic doses of valproic acid. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 2005; 3, 15-18.
 34. Raza M, Albekairi AM , Ageel AM, Qurishi S. Biochemical basis of sodium valproate hepatotoxicity & renal tubular disorders: time dependence of peroxidative injury. *Pharmacol Res*, 1999; 35: 153-7.
 35. Tunali S, Kahraman S, Yanardag R. Vitamin U, a novel free radical scavenger, prevents lens injury in rats administered with valproic acid. *Human and Experimental Toxicology*, 2015; 34: 904–910.
 36. Jurima-Romet M, Abbott FS, Tang W, Huang HS, Whitehouse LW. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology*, 1996; 112: 69–85.
 37. Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS. Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci* , 2005; 86: 427–435.
 38. Raza M, Al-Bekairi AM, Ageel AM, Qureshi S. Biochemical basis of sodium valproate hepatotoxicity and renal tubular disorders: time dependence of peroxidative injury. *Pharmacol Res*, 1997; 35: 153–157.
 39. Yuksel A, Cengiz M, Seven M. Changes in the antioxidant system in epileptic children receiving antiepileptic drugs: two-year prospective studies. *J Child Neurol* , 2001; 16: 603–606.
 40. Hamed AS, Abdellah MM, El-Melegy N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J Pharmacol Sci*, 2004; 96: 465–473.
 41. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2005 ; 204:263–273.
 42. Amrani A, Benaissa O, Boubekri N, Biod K, Djabari R, Beroal N, Zama D, Benayache F, Benayache S. Impact of *Chrysanthemum fontanesii* extract on sodium valproate mediated oxidative damage in mice kidney. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2016; 6(4): 067-071.
 43. Cengiz M, Yuksel A ,Seven M. The effects of carbamazepine and valproic acid on the erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children. *Pharmacol Res*, 2000; 41: 423–425.
 44. Solowiej E, Sobaniec W. The effect of antiepileptic drug therapy on antioxidant enzyme activity and serum lipid peroxidation in young patients with epilepsy. *Neurol Neurochir* , 2003; 37: 991–1003.
 45. Pippenger CE, Meng X, Van Lente F, Rothner AD: Valproate therapy depresses GSH-Px and SOD enzyme activity. A possible mechanism for VPA induced idiosyncratic drug toxicity. *Clin Chem*, 1989;35:1173.
 46. Cotariu DS, Evans JL and Marcus ZO. Early changes in hepatic redox homeostasis following treatment with a single dose of valproic acid. *Biochem Pharmacol* ,1990; 40: 589–593.
 47. Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D . Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chem. Biol. Interact* ,2005 ; 156 :101-111.
 48. Jassim AM. Protective Effect of *Petroselinum crispum*(parsley)extract on histopathological changes in liver ,kidney and pancreas induced by Sodium Valproate- In male Rats. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, 2013 ;4 :20-27.
 49. Raza M, Alghasham AA, Alorainy MS, El-Hadiyah TM. Beneficial Interaction of Thymoquinone and Sodium Valproate in Experimental Models of Epilepsy: Reduction in Hepatotoxicity of Valproate, 2006; 74: 159-173.
 50. Baran OP, Yildirim A , Akkus M. The protective role of folic acid and vitamin E against toxic effects of valproic acid on liver tissue during period of gestation. *Dicle Tip Dergisi*, 2004 ;31: 17–23.
 51. Khan SK , Shakoor KA , Jan MA , Khattak AM , Shah SH . Study of histopathological changes in the liver of albino rats, induced by toxic dose of Valproic acid. *Gomal J. Med. Sci*, 2005; 3: 15–18.
 52. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* ,1996; 93:3-56.
 53. Al-Amoudi WM. Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017; 24: 915-924.
 54. Said SAA, El-Agamy DS . Prevention of sodium valproate-induced hepatotoxicity by curcumin, rosiglitazone and N-acetylcysteine in rats. *Arzneimittelforschung* ,2010; 60: 647–653.

Nom: Lahneche

Prénom: Amina Maya

L'effet protecteur des extraits de la plante *Centaurea sphaerocephala* L .vis-à-vis de la toxicité induite par l'acide valproïque: Etude *in vitro* et *in vivo*

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3ème cycle

Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *Centaurea sphaerocephala* (*C. sphaerocephala*) contre l'impact toxique de l'acide valproïque (VPA) associé au stress oxydatif sur les différents tissus des rats *Wistar albinos*. Pour atteindre cet objectif, l'extrait *n*-butanol à des doses (50 et 100 mg/kg) combiné à un traitement par le VPA (300mg/kg) ont été administrés par gavage aux rats males pendant 14jours. Les animaux sont sacrifiés et disséqués au 15^{ème} jour. Une ablation suivie d'une homogénéisation des organes (foie, reins, cerveau et testicules) a été réalisées pour l'étude de la peroxydation lipidique et le dosage des antioxydants : catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réduit (GSH). Des petits morceaux de ces organes sont prélevés et utilisés pour l'étude histologique.

Le dysfonctionnement provoqué par le VPA s'exprime par une augmentation significative de la peroxydation lipidique signalée suite à une détermination du taux d'MDA tissulaire ainsi qu'une diminution significatif du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, GPx),accompagné aussi par des changements notables des paramètres biochimiques caractérisés surtout par une élévation de la concentration de la créatinine et la glycémie ainsi que le taux de cholestérol, des triglycérides et des aminotransférase (AST, ALT)qui sont libérés une fois que les cellules hépatiques lésées et leurs membranes perforées . Aussi bien, et sur le plan histologique, les résultats ont montré clairement des altérations de l'histoarchitecture des différents tissus étudiés : hépatique, rénale et testiculaire.

En revanche, le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol de *C. sphaerocephala* à des doses (50 et 100mg/kg) et la vitamine E à la dose (100mg/kg) a permis de rétablir les paramètres biochimiques à leurs valeurs normales et améliorer également les paramètres antioxydants ainsi que l'aspect histologique des différents tissus étudiés. On a enregistré l'absence totale des spermatozoïdes au niveau des testicules.

L'extrait *n*-butanol de la plante possède une action protectrice vis-à-vis du stress oxydatif résultants du traitement des rats par le VPA grâce à son effet antioxydant.

Les tests antioxydants *in vitro* (piégeage de radical DPPH, inhibition de LPO,) des extraits des différentes phases (éthyle acétate et butanolique) de la plante *C. Sphaerocephala* ont indiqué que les différents extraits jouent le rôle de scavenger des radicaux libres, de plus ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et phénols totaux qui sont relativement élevées.

Le test anticancéreux a été réalisé en utilisant une souche cellulaire (HeLa) en analysant les différentes doses de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. sphaerocephala*. Les résultats indiquent que l'extrait exerce un effet anticancéreux selon des concentrations dépendantes.

Les mots clés : *Centaurea sphaerocephala*, l'acide valproïque, stress oxydative, activités antioxydantes, composés phénoliques.