

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR- ANNABA



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE D'Ecophysologie animale

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat

Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Science Biologique

Spécialité : Biologie animale

Intitulé

« EVALUATION DES EFFETS NOCIFS DE L'ETHANOL
ET UTILISATION DE SILYBUM MARIANUM COMME UN
MODELE DE DETOXIFICATION NATURELS SUR LES
BIOMARQUEURES CHEZ LES RAT WISTAR ».

Presentée par : TALBI Amina

Directeur de thèse : KHELILI Kamel (Pr, Université Badji Mokhtar - Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. ABDENNOUR Cherif.	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Dr. LOUDJANI Farida.	Examinatrice	Université Badji Mokhtar - Annaba
Dr. DJABALI Nacira.	Examinatrice	Université Chadli ben djedid - el Taref
Dr. CHETTOUM Aziez.	Examineur	Université des Frères Mentouri – Constantine 1

Remerciement

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant pour m'avoir la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail.*

*Je voudrais témoigner ici toute mes sincères remerciements, ma reconnaissance et ma gratitude extrême à mon directeur de thèse **Monsieur KHELILI Kamel**, qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse, pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements inestimables et la confiance qu'il m'a accordé en me proposant ce thème.*

J'exprime mes profonds remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

***Monsieur ABDENNOUR Cherif**, que je remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.*

***Monsieur CHETTOUM Aziez, Madame LOUDJANI Farida et Madame DJABALI Nacira**, Que je remercie de l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté d'examine ce travail et d'apporter ses critiques constructives.*

*Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Ecophysiologie Animale sous la responsabilité du professeur **ABDENNOUR Cherif**, je tiens à le remercier pour son aide et son accueil chaleureux au laboratoire.*

*Mes sentiments de reconnaissance s'adressent à mon cher amie **Feriel REMITA** qui avec elle j'ai passé des années de travail durant la préparation de notre doctorat, on s'est vite très bien entendu pour devenir de très bons amie.*

Un merci infini à tous mes collègues du laboratoire d'Ecophysiologie Animale.

Et Merci aux oubliés...



**À mes Parents,
Qui m'ont soutenu tout au
long de mon parcours d'études
Cette thèse est le témoignage de leurs efforts et sacrifices
À ma sœur jumelle Meriem et ma petite nièce Nour
A mes frère Badreddine et Nacereddine**



Rappels

Le travail exposé dans cette thèse de doctorat a fait l'objet de publications et a été présenté par communications lors des congrès scientifiques nationaux et internationaux

Publications:

Amina Talbi, Kamel Khelili, Ferial Remita, Cherif Abdennour. *Silybum marianum* seeds protected biochemical and oxidative stress markers in ethanol-induced toxicity of Wistar rat. International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants. Vol. 6 (2): 80- 87, 2020

Amina Talbi, Kamel Khelili, Ferial Remita, Cherif Abdennour. The benefit of *Silybum marianum* in ethanol-induced reprotoxicity of male Wistar rat. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (acceptation et in press).

Communications Oral:

Talbi Amina, Khelili Kamel ; Evaluation de la Mobilité des Spermatozoïdes après l'exposition à l'Ethanol chez le Rat Wistar en utilisant le système CASA *Séminaire National de Biologie, Environnement et santé Skikda 8 et 9 Octobre **2018**

Communications par affiche :

Talbi Amina, Khelili Kamel ; Evaluation des effets nocifs de l'Ethanol et voir l'effet protecteur chardon marie (*silybum.Marianum*) sur les paramètres de la reproduction chez les rats Wistar. *1er Séminaire National Sur L'Eau, l'Environnement et la Santé Université Chadli Bendjedid-**El Tarf** Les 6 et 7 Mars **2018**

Talbi Amina, Khelili Kamel, Abdennour Cherif; Evaluation des effets toxiques de l'éthanol sur la biologie des spermatozoïdes épидидymaire chez les rats Wistars. *VI^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources 20–23 Mars **2018**, THABRACA– **Tabarka, TUNISIE**

Talbi Amina, Khelili Kamel ; Modulatory role of *Silybum marianum* extract against Ethanol induced liver damages in male Wistar rats *30^{ème} Congrès international des Sciences Biologiques et de Biotechnologie 25-28 mars **2019 Sousse – Tunisia**

L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets nocifs de l'éthanol (Eth) et l'utilisation de l'infusion des graines de *Silybum marianum* (ISM) comme un modèle de détoxification naturels. 36 rats mâles ont été répartis en 6 groupes de 6 rats chacun en groupe témoin, groupe (ISM) a reçu 200 mg/kg/j de l'infusion des graines de *Silybum marianum*, groupe (Eth1) et groupe (Eth2) ont reçu 1g/kg/j et 2g/kg/j d'Eth, les groupes (Eth1+ISM) et (Eth2+ISM) ont d'abord reçu 1 g/ kg/j et 2 g/kg/j d'Eth, puis après une heure, les deux groupes ont reçu ISM (200 mg/kg/j), pendant 6 semaines successives. Les paramètres de la fertilité, les paramètres biochimiques, hématologiques ainsi les paramètres de stress oxydatif ont été évalués. L'étude de poids des organes a montré une diminution significative de poids des testicules et épидидymes, et une augmentation de poids de foie des rats d'Eh1 et Eth2. Les résultats ont montré une altération toxique dans les paramètres biologiques des spermatozoïdes et la concentration de testostérone chez les groupes Eth1 et Eth2. De plus, une perturbation des paramètres biochimiques (ALT, AST, PAL, cholestérol, triglycérides, LDL, HDL, urée et créatinine) et hématologiques a été aussi observé chez les groupes Eth1 et Eth2. L'implication d'éthanol dans le stress oxydant a été confirmée par l'augmentation de la concentration du MDA avec une diminution de la concentration de GSH de l'activité de GPx des testicules, épидидymes, foie et les reins. D'autre part, l'administration de ISM a réussi à améliorer les paramètres cités ci-dessus dans les groupes de traitement combiné (Eth1+ISM et Eth2+ISM) par rapport aux groupes Eth1 et Eth2 et à les ramener à des niveaux normaux comme celui de groupe témoin. En conclusion, l'ensemble des résultats à bien montre que l'utilisation d'ISM a réussi d'atténuer la toxicité d'Eth, par conséquent, son utilisation comme supplément serait une méthode naturelle et facile pour se protéger de la toxicité de l'éthanol.

Mot clés : L'éthanol. *Silybum marianum*. Stress oxydatif. Rôle protecteur. Spermatozoïdes. Rat.

In this study, we sought to assess the harmful effects induced by ethanol (Eth) and the use of *Silybum marianum* (ISM) as a natural detoxification model. 36 male rats were divided into 6 groups of 6 rats each into control group, group (ISM) received 200 mg/ kg/day of *Silybum marianum* seeds infusion, group (Eth1) and group (Eth2) received 1 g/kg/day and 2 g/kg/day of Eth, the groups (Eth1 + ISM) and (Eth2 + ISM) first received 1 g/kg /day and 2g/kg/day of Eth , then after one hour, the rats received ISM (200 mg / kg / day), for 6 successive weeks. Fertility parameters, biochemical and hematological parameters as well as oxidative stress parameters were evaluated. Study of organs weight showed a significant decrease in testis and epididymis weight, and a significant increase in liver weight of Eh1 and Eth2 groups. The obtained results displayed a toxic alteration in the parameters of sperm biology and testosterone concentration in Eth1 and Eth2 groups. Moreover, a disturbance of the biochemical parameters (ALT, AST, ALP, cholesterol, triglycerides, LDL, HDL, urea and creatinine) and hematological parameters was also observed in Eh1 and Eth2. The involvement of ethanol in oxidative stress was confirmed by the increase of MDA concentration with a decrease of GSH concentration and GPx activity in testes, epididymis, liver and kidneys. On the other hand, the administration of ISM has succeeded in improving the parameters mentioned above in the combined treatment groups (Eth1+ISM and Eth2+ISM) compared to Eth1 and Eth2 groups, and bring them to normal levels as that of the control group. In conclusion, results clearly showed that the use of ISM has successfully mitigated the toxicity of ethanol, hence, its use as supplement would be natural, easy and cheap method to protect from ethanol toxicity.

Key words: Ethanol. *Silybum marianum*. Oxidative stress. Protective role. Spermatozoa. Rat.

سعينا في هذه الدراسة، لتقييم الآثار الضارة التي يسببها الإيثانول (Eth) و استخدام نقيع بذور *Silybum marianum* كنموذج طبيعي لإزالة السموم من خلال تحليل المؤشرات الحيوية للوظائف الفيزيولوجية عند ذكور الجرذان . تم تقسيم 36 من الجرذان الذكور إلى 6 مجموعات في كل منها 6 جرذان إلى مجموعة الشاهدة، مجموعة (ISM) تلقت 200 ملغم / كلغ / يوم من نقيع حبوب *Silybum marianum*، مجموعة (Eth1) و مجموعة (Eth2) تلقت 1 غرام / كلغ / يوم و 2 جم / كلغ / يوم من الإيثانول، مجموعة (Eth1 + ISM) و المجموعة (Eth2 + ISM) تلقت أولا 1 جم / كلغ / يوم و 2 جم / كلغ / يوم من الإيثانول ثم بعد ساعة، تلقت المجموعتين 200 ملغم / كلغ / يوم من ال ISM لمدة 6 أسابيع متتالية. تم تقييم علامات الحصى، المؤشرات البيوكيميائية والدموية وكذلك مؤشرات الإجهاد التأكسدي. أظهرت دراسة وزن الأعضاء انخفاضًا ملحوظًا في وزن الخصية والبربخ، وزيادة في وزن الكبد عند المجموعتين Eth1 و Eth2. كما أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها تغير سمي في المؤشرات البيولوجية للحيوانات المنوية وتركيز التستوستيرون عند المجموعتين Eth1 و Eth2. بالإضافة إلى ذلك، لوحظت اضطرابات في قيم المؤشرات البيوكيميائية المتمثلة في (ALT، AST، PAL، الكوليسترول، الدهون الثلاثية، LDL، HDL، اليوريا والكرياتينين) و قيم المؤشرات الدموية عند المجموعتين Eth1 و Eth2. علاوة على ذلك، تم تأكيد أحداث الإيثانول للإجهاد التأكسدي و ذلك من خلال زيادة كبيرة في تركيز MDA مع انخفاض كبير في تركيز GSH و نشاط GPx في الخصيتين، البربخ، الكبد والكلى في المجموعتين Eth1 و Eth2. من جهة أخرى، نجح تناول ISM في تحسين المؤشرات البيولوجية المذكورة أعلاه عند مجموعتين (Eth1 + ISM) و (Eth2 + ISM) مقارنة بالمجموعتين Eth1 و Eth2، ورفعها إلى المستويات الطبيعية مثل تلك الخاصة بالمجموعة الشاهدة. نستنتج من النتائج المتحصل عليها أن استخدام ISM أثبت نجاعته في الحد من سمية الإيثانول، ولهذا، استخدامه كمكمل سيكون طريقة طبيعية وسهلة وغير مكلفة للحماية من سمية الإيثانول.

الكلمات المفتاحية: الإيثانول. سيليبوم ماريانوم. الإجهاد التأكسدي. دور وقائي. حيوانات المنوية. جرذان.

Liste des Abbreviation

ACC : Acetyl-CoA Carboxylase	LIN : Index de linéarité
ADH : Alcool déshydrogénase	IL-1 : Interleukin-1
ALD : Alcoholic liver disease	IL-7: Interleukin-7
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase	IL-8 : Interleukin-8
ALH : Amplitude of lateral head displacement	iNOS : Inducible nitric oxide synthase
ALT : Alanine aminotransférase	INSIG : Insulin-induced gene
AMPK : AMP-activated protein kinase	ISM : Infusion des graines de Silybum marianum
AST : Aspartate aminotransférase	LPS : Lipopolysaccharides
BCF : Beat cross frequency	ONAB : Office National des Aliments de Bétail
CASA : Computer assisted sperm analysis	PAL : Phosphatase alcaline
CXCL1 : Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1	PUFA : Polyunsaturated fatty acids
CYP2E1 : Cytochrome P450 2E1	PPARα : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)	SCA : Sperm Class Analyser
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique	SCD1 : stearoyl CoA desaturase 1
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay	SIRT1 : Sirtuin1
Eth : Ethanol	SREBP1-c : Sterol regulatory element-binding protein-1c
ERO : Espèces réactives de l'oxygène	STR : Index de rectitude
ERA : Espèces réactives d'azote	TBA : Thiobarbituric Acid
FASN : Fatty acid synthase	TCA : Trichloroacetic acid
FNS : Numération Formule Sanguine	TGF-β3 : Transforming Growth Factor beta 3
HDL : Lipoprotéines à haute densité	TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha

VAP: Average path velocity

VCL: Curvilinear velocity

VSL: Straight-line velocity

WOB : Index d'oscillation

Liste des Figures

Figure 1: La voie du métabolisme d'éthanol.....	07
Figure 2: Répartition mondiale de tous les décès attribué à l'alcool par la maladie ou d'une blessure.....	09
Figure 3: Mécanismes moléculaires de l'ALD.....	10
Figure 4: Photo de <i>S. marianum</i> prise à la région d'Ain-Berda. Feuilles ; fleur fraîche ; fleur sèche avec grain ; grains.....	15
Figure 5 : Structures chimiques des flavonolignanes et des flavonoïdes comprenant de la silymarine.....	17
Figure 6 : Effets anticancéreux possibles de la silymarine.....	20
Figure 7: Action anti-inflammatoire de la silymarine.....	21
Figure 8: Photo de flacon de l'éthanol utilisé.....	23
Figure 9 : Hébergement, gavage des rats et préparation de l'infusion.....	25
Figure 10: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	27
Figure 11 : Présentation schématique des modifications morphologiques caractéristiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique.....	29
Figure 12: La courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de l'MDA.....	31
Figure 13 : La courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.....	35
Figure 14: Les variations des poids absolu des organes de la reproduction chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	38
Figure 15 : Concentration des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	40
Figure 16: Pourcentage des spermatozoïdes vivant chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	40
Figure 17: Mobilité total des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	43
Figure 18: Mobilité progressive des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	43
Figure 19 : Les paramètres de vélocité chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	44

Figure 20 : Variation de la fréquence de croisement de la trajectoire (BCF) chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	45
Figure 21 : Variation de l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	45
Figure 22 : Taux de testostérone (ng/ml) chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	46
Figure 23 : Les variations des poids absolu du foie (A) et des reins (B) chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	54
Figure 24 : Les variations de l'activité des transaminases et phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	56
Figure 25 : Variation de bilan lipidique chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	58
Figure 26 : Variation de bilan rénal chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement.....	60
Figure 27 : Variation des paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement.....	68
Figure 28 : Variation de la concentration du MDA testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines.....	74
Figure 29 : Variation du concentration de glutathion réductase testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines.....	75
Figure 30: Variation de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines..	76

Liste des Tableaux

Tableau 1 : les caractéristiques physiques de l'éthanol.....	05
Tableau 2 : Classification scientifique du Chardon-Marie.....	15
Tableau 3 : Activités anticancéreuses de la silymarine dans différents types de cancers.....	19
Tableau 4 : Propriétés pharmacologiques de <i>S.marianum</i>	22
Tableau 5 : Les variations des poids absolu des testicules et épидидymes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	36
Tableau 6 : Les variations des poids absolu des testicules et épидидymes chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	37
Tableau 7 : Les variations la concentration et la vitalité des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	39
Tableau 8 : Les variations de mobilité totale et progressive des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$..	41
Tableau 9 : Les variations des paramètres cinématiques des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	42
Tableau 10 : Les variations de la concentration de testostérone chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	46
Tableau 11 : Les variations des poids absolu de fois et des reins chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	53
Tableau 12 : Les variations de l'activité des transaminases et phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$..	55
Tableau 13 : Les variations de bilan lipidique chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	57
Tableau 14 : Les variations de bilan rénal chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	59
Tableau 15 : Les variations des paramètres hématologique chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	67
Tableau 16 : Les variations de taux du MDA chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, $N=6$	72

Tableau 17 : Les variations de la concentration de glutathion réductase (GSH) chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, N=6.... 72

Tableau 18 : Les variations de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, N=6.... 73

Sommaire

Remerciement	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01
Partie I : Synthèse bibliographique	
I- L'éthanol.....	04
1- Identification de l'éthanol	04
2- La toxicocinétique de l'éthanol	05
2-1-L'absorption de l'éthanol.....	05
2-2- Distribution de l'éthanol.....	06
2-3-Métabolisme de l'éthanol.....	06
2-4-Excrétion de l'éthanol.....	08
3-Toxicité de l'éthanol	08
3-1-L'intoxication aiguë.....	08
3-2-Toxicité chronique.....	09
3-2-1-La maladie alcoolique du foie.....	09
3-2-2-Effet sur la fonction reproductrice.....	10

3-2-3-Effet cancérrogène.....	11
3-2-4- L'éthanol et la santé cardiovasculaire.....	12
3-2-5-L'éthanol et le stress oxydatif.....	12
II- <i>Silybum marianum</i>	14
1-Présentation de <i>Silybum marianum</i>	14
2-Composition de <i>Silybum marianum</i>	16
3-Historique d'utilisation.....	17
4-Propriétés pharmacologiques de <i>Silybum marianum</i>	18
4-1-Activité antioxydantes.....	18
4-2-Effet contre les maladies du foie.....	18
4-3-Activité anti-cancéreuse.....	19
4-4-Activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice.....	20
5-Toxicité de <i>Silybum marianum</i>	22

Partie II- Matériels et méthodes

I- Matériel utilisés	23
1-Matériel biologique.....	23
2-Produit chimique.....	23
2-1-L'éthanol.....	23
2-2- <i>Silybum marianum</i>	24
3-Protocole Expérimental.....	24
4-Prélèvement des échantillons.....	26
4-1-Prélèvement sanguin.....	26

4-1-Prélèvement du sperm épидидymaire.....	26
4-3-Prélèvement des organes.....	26
II- Méthodes de dosage.....	28
1-Etude de la biologie des spermatozoïdes.....	28
1-1-La mobilité / concentration des spermatozoïdes.....	28
1-2-La vitalité des spermatozoïdes.....	28
2-Dosage de testostérone.....	30
3-Mesure des paramètres biochimiques.....	30
4-Mesure des paramètres hématologiques.....	30
5-Dosage des paramètres de stress oxydative.....	30
5-1-Dosage du malone-dialdehyde (MDA).....	30
5-2-Dosage du Glutathion réduit (GSH).....	31
5-3-Dosage de l'activité enzymatique du Glutathion Peroxydase (GPx).....	33
5-4 Dosage des protéines.....	34
III-Étude statistique.....	35

Partie III- Résultats et Discussion

I- L'effet de l'éthanol sur la fonction reproductrice : l'effet protecteur de <i>Silybum marianum</i> ..	36
❖ Résultats.....	36
1-Influence du traitement sur la masse corporelle.....	36
2-Influence du traitement sur la fonction reproductrice.....	37
2-1-Variation du poids absolu des testicules et l'épididyme.....	37
2-2-Variations des paramètres biologiques des spermatozoïdes.....	38
2-2-1-Effet de traitement sur la concentration et la vitalité des spermatozoïdes.....	38
2-2-2-Effet de traitement sur les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes	41

2-3-Variations de la concentration de testostérone	46
❖ Discussion.....	47
II- L'effet de l'éthanol sur la fonction hépatique et rénale : l'effet protecteur de <i>Silybum</i> <i>marianum</i>	53
❖ Résultats.....	53
1-Variation du poids absolu de foie et des reins.....	53
2-Variation des paramètres biochimiques.....	54
2-1-Effet sur l'activité des transaminases et phosphatase alcaline.....	54
2-2-Effet sur le bilan lipidique.....	57
3-Effet sur le bilan rénal.....	59
❖ Discussion.....	60
III- L'effet de l'éthanol sur les paramètres hématologiques : l'effet protecteur de <i>Silybum</i> <i>marianum</i>	66
❖ Résultats.....	66
❖ Discussion.....	69
IV- L'effet de l'éthanol sur les paramètres du stress oxydatif : l'effet protecteur de <i>Silybum</i> <i>marianum</i>	71
❖ Résultats.....	71
❖ Discussion.....	77
Conclusion et perspective.....	80
Références.....	81
Annexe.....	i

INTRODUCTION

Introduction

L'éthanol ou alcool éthylique, communément appelé « l'alcool », est considéré comme la drogue récréative la plus utilisée dans le monde. La consommation d'alcool par l'Homme remonte à l'époque préhistorique, dont, la première preuve historique de boissons alcoolisées est venue de la découverte archéologique de cruches de bière Stone Age, il y a environ 10.000 ans (**Dasgupta, 2019**).

L'éthanol n'est pas seulement disponible sous forme de boissons alcoolisées, ses propriétés chimiques en font également un solvant idéal pour les arômes et autres composés utilisés dans les industries alimentaires. Ce qui le rend l'un des principaux produits chimiques organiques utilisés dans les produits industriels et de consommation, dans lequel il est utilisé comme intermédiaire dans la production d'autres produits chimiques et comme solvant (**Strohm, 2014**). L'éthanol contenu dans les boissons alcoolisées concède comme la principale source d'exposition de la population générale à l'éthanol (**Bevan et al., 2009**). Selon l'Organisation mondiale de la santé (**WHO, 2018**), la consommation d'alcool a augmenté depuis l'année 2000 dans presque toutes les régions du monde, où les consommateurs africains boivent en moyenne 40 g / jour de l'éthanol pur. Cependant, l'usage nocif de l'éthanol a été considéré l'un des principaux risques pour la santé dans le monde et un facteur causatif plus de 60 principaux types de maladies et de blessures et entraîne environ 2,5 millions de décès chaque année (**WHO, 2018**).

Le stress oxydatif était considéré comme le rôle majeur de la pathogenèse induite par l'alcool. Dans lequel la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est impliquée dans le mécanisme de l'éthanol induisant un stress oxydatif (**Wang et al., 2018**) conduit généralement à la peroxydation des lipides, à l'oxydation des protéines et de l'ADN (**Sugimoto & Takei, 2017**), entraînant par la suite, des dommages cellulaires et un dysfonctionnement des organes.

Depuis les temps anciens, les gens ont cherché des médicaments dans la nature pour le sauvetage de leur maladie (**Petrovska, 2012**). Ils ont utilisées diverses parties des plantes telles que les feuilles, les tiges et les racines. Avec le temps, les raisons de l'utilisation des plantes médicinales spécifiques pour le traitement de certaines maladies ont été découvertes (**Petrovska, 2012**). La médecine traditionnelle est toujours reconnue comme le système de soins de santé primaires préféré dans de nombreuses communautés pour un certain nombre de raisons, notamment l'abordabilité, l'accessibilité et le faible coût (**Mintah et al., 2019**). La médecine

moderne utilise aujourd'hui des composés actifs isolés de plantes supérieures, et environ 80% de ces ingrédients actifs indiquent une corrélation positive entre leur utilisation thérapeutique moderne et les utilisations traditionnelles (**Sarkar et al., 2015**).

En raison de sa situation géographique et de son climat particulier, l'Algérie possède une végétation très riche et variée, dont beaucoup ont été utilisés en médecine depuis les années anciennes pour traiter différentes maladies. Depuis des siècles, en Algérie, les plantes médicinales et aromatiques sont principalement utilisées en milieu rural par les personnes âgées (**Reguieg, 2011**). Le chardon marie (*Silybum marianum*) connu en Algérie par (*chouk ahmar*) fait partie des 123 familles botaniques classées en Algérie. Il est connu par sa valeur thérapeutique traditionnelle, notamment pour traiter les maladies de foie (**Bhattacharya, 2011**). *Silybum marianum* contient un composé actif obtenu principalement à partir des graines séchées où elle est présente à des concentrations plus élevées que dans d'autres parties de la plante et se compose de quatre flavonolignanes qui sont collectivement connus sous le nom de silymarine (**Onalan et al., 2016**). La silymarine a été connue par des multiples activités pharmacologiques, y compris des activités antioxydants, anti-inflammatoires, antibactériens, antiallergiques, antiviraux, antimutagènes, antinéoplasiques et antithrombotiques (**El-Demerdash et al., 2015**).

Dans la lumière de ces constatations, Nous avons cherché dans cette étude, d'une part, d'évaluer les effets toxiques induits par l'éthanol, et d'autre part, de démontrer la faisabilité de l'utilisation de l'infusion des graines de *Silybum marianum* comme agent préventif en analysant plusieurs paramètres physiologiques chez le rat mâle Wistar notamment, les paramètres de la fertilité, les paramètres biochimiques, hématologiques ainsi que les paramètres de stress oxydatif. Ce manuscrit est divisé en trois parties essentielles

❖ La première partie présente une étude bibliographique basée sur de récentes études, dont nous aborderons quelques connaissances sur les caractéristiques de l'éthanol, son cinétique dans l'organisme et ces effets toxiques, ainsi que les caractéristiques de la *Silybum marianum* et ses propriétés pharmacologiques.

❖ La deuxième partie consiste à développer les méthodes utilisées pour étudier l'effet du traitement sur la fonction reproductrice, la fonction hépatique, rénale, les paramètres hématologiques et les paramètres du stress oxydatif chez le modèle biologique choisi, le rat Wistar.

❖ La troisième partie est enfin consacrée aux résultats obtenus et la discussion, d'où nos résultats sont largement commentés et des comparaisons sont faites par rapport aux recherches antérieures qui font référence dans le domaine, cette partie est divisée en quatre chapitres :

- ✓ L'effet de l'éthanol sur la fonction reproductrice : l'effet protecteur de *Silybum marianum*
- ✓ L'effet de l'éthanol sur la fonction hépatique et rénale : l'effet protecteur de *Silybum marianum*
- ✓ L'effet de l'éthanol sur les paramètres hématologiques : l'effet protecteur de *Silybum marianum*
- ✓ L'effet de l'éthanol sur les paramètres du stress oxydatif : l'effet protecteur de *Silybum marianum*

Synthèse Bibliographique

I- L'éthanol

1- Identification de l'éthanol

Ethanol, alcool éthylique, alcool de grain, méthyl carbinol, hydrate d'éthyle et l'alcool de pomme de terre (**Strohm, 2014**), est un alcool aliphatique à 2 carbones de formule structurale $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (**Bekatorou, 2016**). Dans des conditions ordinaires, l'éthanol est un liquide volatil, inflammable, clair et incolore, son odeur est agréable, familière et caractéristique (**Logsdon, 2000**). L'éthanol est un solvant polyvalent, miscible avec l'eau et avec plusieurs d'autres substances telles que les solvants organiques, les hydrocarbures aliphatiques légers, les chlorures aliphatiques et d'autres substances non polaires telles que les huiles essentielles (**Bekatorou, 2016**).

Grace à ces nombreuses propriétés utiles, L'éthanol est utilisé par une gamme d'industries différentes. Il est utilisé comme produit intermédiaire par l'industrie chimique, pharmaceutique ou cosmétique. L'éthanol est utilisé dans les boissons alcoolisées, comme solvant, dans la fabrication des plastiques, des laques, des vernis et les plastifiants. Il est utilisé aussi dans les produits cosmétiques comme les parfums, les après-rasages et les eaux de Cologne. Il a également de nombreuses utilisations médicales et peut être trouvé dans des produits tels que les médicaments, comme un antiseptique dans la plupart des gels désinfectants antibactériens pour les mains, les bains de bouche et comme antidote à l'éthylène glycol ou au surdosage de méthanol (**Strohm, 2014**).

La consommation des boissons alcoolisées considéré comme la principale source d'exposition de la population générale à l'éthanol, cependant, les expositions se produisent également par inhalation de vapeur d'éthanol et par absorption cutanée (sont les plus importantes en milieu professionnel) (**Bevan et al., 2009**).

Tableau 1 : les caractéristiques physiques de l'éthanol (INRS, 2019)

Numéro CAS	64-17-5
Etat Physique	Liquide
Masse molaire	46,07
Point de fusion	-114 °C
Point d'ébullition	78 °C
Densité	0,789 g ml ⁻¹
Densité gaz / vapeur	1,59 g ml ⁻¹
Pression de vapeur	5,9 kPa à 20 °C
	10 kPa à 30 °C
	29,3 kPa à 50 °C
Point d'éclair	13 °C (éthanol pur) ; 17 °C (éthanol à 95 % vol.) ; 21 °C (éthanol à 70 % vol.) ; 49 °C (éthanol à 10 % vol.) ; 62 °C (éthanol à 5 % vol.)
Température d'auto-inflammation	363 à 425 °C
Limites d'explosivité ou d'inflammabilité (en volume % dans l'air)	limite inférieure : 3,3 % limite supérieure : 19 à 27,7 %

2- La toxicocinétique de l'éthanol

2-1- L'absorption de l'éthanol

L'absorption de l'éthanol par le canal gastro-intestinal se fait par une diffusion passive à travers la lumière intestinale. Une fois que l'éthanol ingéré, l'absorption se commence dans l'estomac à travers les surfaces muqueuses de la lumière, où le taux d'absorption dans le sang se produit beaucoup plus rapidement à partir du duodénum et de l'intestin grêle, en raison de la surface beaucoup plus grande fournie par les villosités et les microvillosités du duodénum et du jéjunum. La consommation d'alcool pur sur un estomac vide s'accélère leur absorption (Jones, 2011).

La concentration maximale en alcool dans le sang peut survenir 5 à 10 minutes après la fin de la consommation d'alcool ou jusqu'à 120 minutes (Jones, 2011).

2-2- Distribution de l'éthanol

Après son absorption, l'éthanol est transporté dans tous les organes et les tissus du corps avec la circulation sanguine. L'éthanol passe librement à travers les membranes biologiques et se distribue dans l'espace total de l'eau corporelle sans se lier aux protéines plasmatiques, il pénètre dans le sang veineux porte et est d'abord transporté vers le foie, puis vers le côté droit du cœur, et via les poumons, vers le cœur et dans toute la circulation systémique (Jones, 2011). La distribution de l'éthanol est très rapide, dont la demi-vie de distribution est de 7 à 8 minutes (Jones *et al.*, 1990).

Chez la femme enceinte, l'éthanol traverse facilement le placenta, distribuant la circulation fœtale à des concentrations proportionnelles à la concentration d'alcoolémie maternelle (Fernandes *et al.*, 2017).

2-3-Métabolisme de l'éthanol

Il existe trois principaux systèmes métaboliques qui participent au métabolisme oxydatif de l'alcool en acétaldéhyde :

❖ L'alcool déshydrogénase

C'est la voie principale représente environ 80 % des capacités métaboliques ce système oxyde l'éthanol en acétaldéhyde en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) comme cofacteur. L'acétaldéhyde produit par l'alcool déshydrogénase (ADH), est rapidement oxydé en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) (Dasgupta, 2019).

❖ Le système MEOS *microsomal ethanol oxidizing system*

C'est la deuxième voie principale pour le métabolisme de l'éthanol, il implique l'enzyme CYP2E1 du cytochrome P450 et nécessite du NADPH comme cofacteur. Le CYP2E1 est considéré comme le composant principal de ce système, il se trouve principalement dans le foie,

mais il est également situé dans d'autres organes, tels que le cerveau, l'intestin et les reins (Kawaratani *et al.*, 2013).

Dans des conditions physiologiques normales, le CYP2E1 catalyse l'oxydation d'une petite quantité d'éthanol en acétaldéhyde (environ 10%), Cependant, cette quantité c'augmente dans les conditions chroniques d'abus d'alcool en raison de l'induction de l'expression du CYP2E1 (Kong *et al.*, 2019).

❖ Le catalase (CAT)

En effet, le rôle principal de catalase est l'élimination de H_2O_2 , mais est également capable de catalyser l'oxydation de l'alcool en acétaldéhyde (Ceni *et al.*, 2014), il métabolise moins de 2% d'éthanol il est considéré comme l'autre système métabolique principal qui dépend du NADPH pour le métabolisme oxydatif.

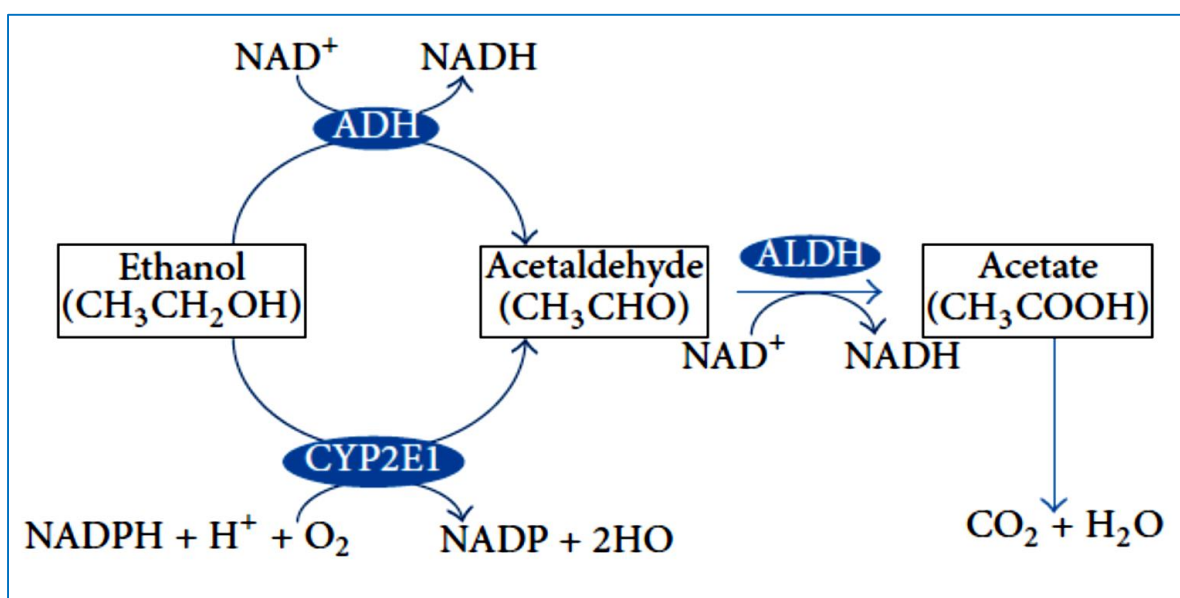


Figure 1 : La voie du métabolisme d'éthanol (Kawaratani *et al.*, 2013). L'éthanol est métabolisé en acétaldéhyde par ADH et le CYP2E1. La réaction enzymatique de l'ADH est la principale voie métabolique de l'éthanol impliquant un porteur intermédiaire d'électrons, à savoir le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). L'acétaldéhyde est rapidement métabolisé par ALDH en acétate et NADH. L'acétate est finalement métabolisé en CO₂ et + H₂O.

2-4-Excrétion de l'éthanol

Près de 90 à 95 % de l'éthanol s'élimine par voie métabolique. Seule une petite fraction (2 à 10%) de la dose totale d'éthanol ingérée est éliminée du corps sous forme inchangée par les poumons (haleine) et les reins (urine), et des traces dans la sueur (**Jones, 2011**). L'éthanol est également éliminé dans le lait maternel (**Lands, 1998**).

3- Toxicité de l'éthanol

La toxicité de l'éthanol varie selon la durée et la quantité ingester, ce que produire soit une toxicité aiguë soit une toxicité chronique, représentant deux spectres différents de maladie.

3-1- L'intoxication aiguë

L'intoxication aiguë à l'éthanol se produit généralement après l'ingestion d'une grande quantité d'alcool et est une condition cliniquement nocive (**Vonghia et al., 2008**). Le principal site d'action de la toxicité aiguë de l'éthanol est le système nerveux central (SNC) (**LaHood & Kok, 2020**). Cette toxicité est médiée par 2 voies : une augmentation de l'inhibition du SNC et une diminution de l'excitation du SNC (**Pitzele & Tolia, 2010 ; Noble & Weimer, 2014**).

❖ Augmentation de l'inhibition du SNC

Le principal neurotransmetteur inhibiteur est L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), ce dernier se lie aux récepteurs permettant au chlorure d'entrer dans la cellule, ce qui diminue l'excitabilité cellulaire. L'éthanol a une affinité élevée pour se lier au récepteur GABA, activant ainsi cette cascade inhibitrice, ce qui entraîne cliniquement une sédation, une incoordination motrice et un dysfonctionnement cognitif (**Pitzele & Tolia, 2010**).

❖ Diminution de l'excitation du SNC

L'excitation dans le SNC est principalement assurée par le glutamate, un neurotransmetteur, qui est également inhibé par l'éthanol. L'éthanol exécute cette inhibition en se liant préférentiellement au récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) un récepteur du glutamate commun dans le SNC (**Pitzele & Tolia, 2010**).

3-2- Toxicité chronique

Une consommation excessive d'alcool peut causer des dommages au foie, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancer. Selon **WHO, (2018)**, l'usage nocif de l'alcool est considéré l'un des principaux risques pour la santé dans le monde et un facteur causatif de plus de 60 principaux types de maladies et de blessures et entraîne environ 2,5 millions de décès chaque année.

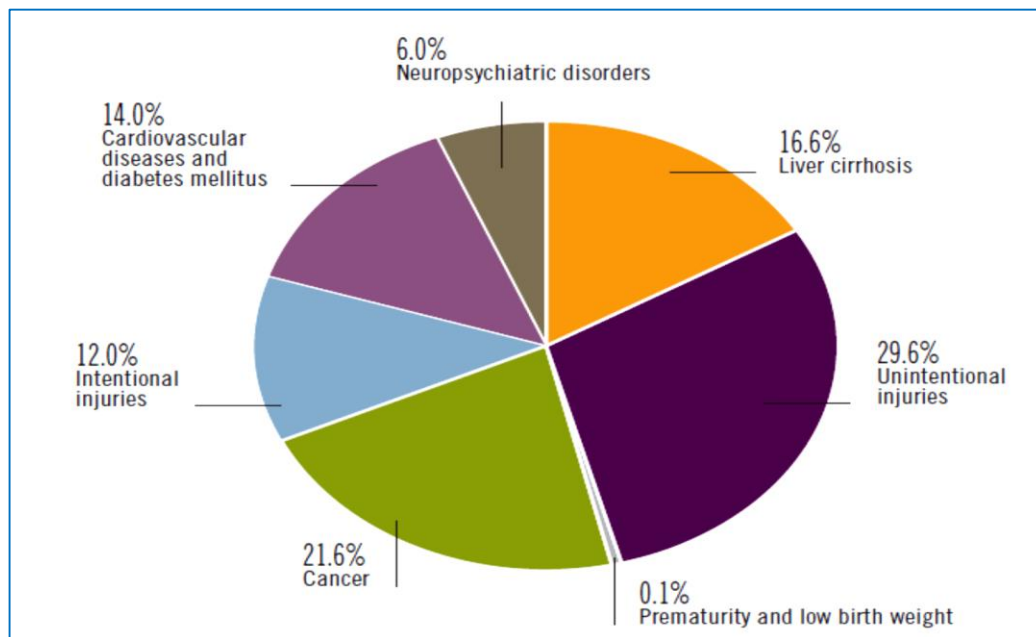


Figure 2 : Répartition mondiale de tous les décès attribués à l'alcool par la maladie ou d'une blessure (WHO, 2018)

Les effets à long terme d'une consommation excessive d'alcool peuvent inclure :

3-2-1- La maladie alcoolique du foie

La maladie alcoolique du foie ou *alcoholic liver disease (ALD)* est un spectre des maladies entraîné par la consommation excessive d'alcool à long terme, provoquant de la stéatose hépatique, la cirrhose et de l'hépatite alcoolique. L'ALD est considérée comme la principale cause de mortalité dans le monde (**Ding et al., 2012**). Les mécanismes moléculaires de l'ALD ont été illustrés par la figure 3.

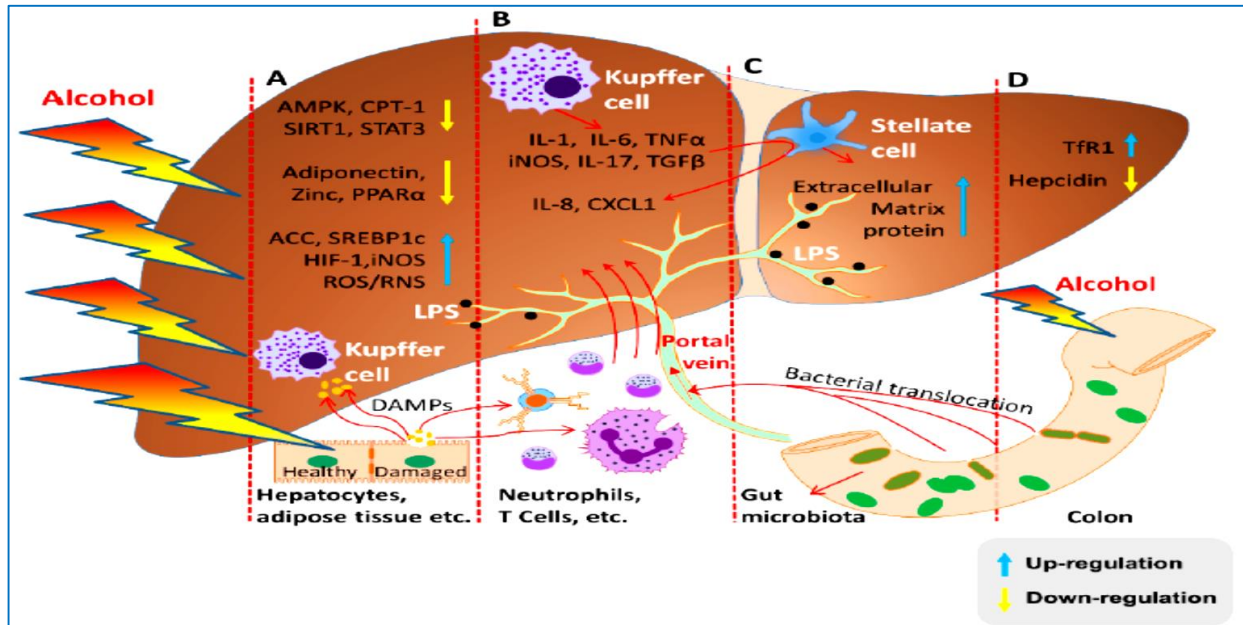


Figure 3: Mécanismes moléculaires de l'ALD (Kong *et al.*, 2019) : (A) L'alcool et ses métabolites provoquent une stéatose hépatique en augmentant les niveaux (ERO/ERA) et l'expression de (ACC) et de SREBP1c. via l'expression réduite d'AMPK-SIRT1, d'adiponectine et de zinc qui activent PPAR α . (B,C) Une perméabilité excessive du côlon augmentée par la consommation excessive d'alcool permet au LPS d'entrer dans le foie par la veine porte. Les cellules Kupffer activées libèrent des cytokines telles que IL-1, IL-17, TGF- β 3, iNOS et TNF α qui activent les cellules étoilées et libèrent IL-8 et CXCL1 dans Hépatite alcoolique. Les cellules stellaires activées libèrent également la matrice extracellulaire qui entraîne une fibrose hépatique. (D) Régulation de l'hepcidine, l'un des principaux facteurs pathogènes de l'ALD.

3-2-2- Effet sur la fonction reproductrice

Plusieurs études ont montré que la consommation de l'éthanol induit des altérations toxiques pour la reproduction, dont il affecte à la fois la fertilité masculine et la fertilité féminine.

Chez l'homme, la consommation de l'éthanol provoque :

- ❖ Une altération de la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) suite à l'interférence avec la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Muthusami & Chinnaswamy, 2005).

- ❖ La diminution de taux de testostérone (**Van thiel et al., 1974 ; Jin et al., 2018**)
- ❖ Perturbations de la fonction stéroïdogenes des cellules de Leydig (**Giannessi et al., 2008 ; Uygur et al., 2014**).
- ❖ Perturbations la fonction des cellules de Sertoli (**Emanuele et al., 1998**)
- ❖ Perturbations et dysfonctionnement de la spermatogenèse (**Shayakhmetova et al., 2014**).
- ❖ Des changements dans le diamètre des tubules séminifères, l'apoptose des cellules germinales et l'atrophie testiculaire (**Maneesh et al., 2005**).
- ❖ Des changements histopathologiques dans les tissus de l'épididyme, notamment une réduction de l'épaisseur des cellules épithéliales dans la tête et la queue des tubules épидидymaire et un élargissement de l'espace interstitiel épидидymaire (**Al-Bairuty et al., 2016**).
- ❖ La formation des radicaux libres qui attaquent les cellules germinales dans les tissus testiculaires en provoquant des altérations de la spermatogenèse et la réduction de la quantité et la qualité des spermatozoïdes (**Abedi et al., 2016**).
- ❖ Un échec dans l'acquisition et maintenance de la mobilité des spermatozoïdes (**El-Ashmawy et al., 2007**).

Chez la femme, la consommation de l'éthanol provoque :

- ❖ Une diminution des concentrations des hormones stéroïdes et interfère avec le transport des spermatozoïdes dans la trompe de Fallope (**Sharma & Chaudhury, 1970**).
- ❖ Altérations de l'ovulation et de la régularité du cycle menstruel avec une consommation chronique éthanol (**Emanuele et al., 2002**).
- ❖ Diminution de la réserve ovarienne et la fécondabilité (**Van Heertum & Rossi, 2017**).

3-2-3- Effet cancérigène

La consommation d'alcool a été identifiée comme cancérigène pour les catégories de cancer suivantes: cancer de la bouche, cancer du nasopharynx, pharynx et l'oropharynx, cancer du larynx, cancer de l'œsophage, cancer du côlon et du rectum, cancer du foie, cancer du sein (**Baan et al., 2013**).

Des études ont reporté que la consommation élevée de l'éthanol augmente le risque de développement des cancers, même si avec une consommation aussi faible qu'un verre par jour

augmente considérablement le risque de certains cancers, comme le cancer du sein féminin (Seitz *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2013).

3-2-4- L'éthanol et la santé cardiovasculaire

La relation entre la consommation d'éthanol et la santé cardiovasculaire varie entre être bénéfique ou toxique. Les doses légères à modérées d'éthanol peuvent avoir un effet bénéfique sur la santé cardiovasculaire en réduisant le risque de maladies cardiovasculaires et toutes causes de mortalité (WHO, 2018). Néanmoins, la consommation excessive d'éthanol a été liée à l'hypertension artérielle, à des battements cardiaques irréguliers, à des difficultés à pomper le sang dans le corps, à des caillots sanguins, à un accident vasculaire cérébral, à une cardiomyopathie (relâchement, muscle cardiaque étiré) ou à une crise cardiaque (Piano, 2017).

3-2-5- L'éthanol et le stress oxydatif

Le stress oxydatif était considéré comme le principal rôle de la pathogenèse induite par l'éthanol. Il a été mentionné que la consommation d'éthanol génère les espèces réactives de l'oxygène tels que l'anion superoxyde (O_2^-) et H_2O_2 et les accumule dans les cellules hépatiques ce qui provoque l'oxydation de glutathion, la peroxydation lipidique des membranes cellulaires, l'oxydation des protéines et de l'ADN (Habib-ur-Rehman *et al.*, 2009). De nombreux processus et facteurs sont impliqués dans le stress oxydatif induit par l'éthanol, notamment :

❖ L'induction de CYP2E1

CYP2E1 une enzyme clé dans MEOS responsable de la production excessive des espèces réactives de l'oxygène pendant le cycle catalytique de CYP2E1 (Lee *et al.*, 2016). Il génère des radicaux libres qui, à leur tour, endommagent la membrane cellulaire par oxydation et provoquent la réaction de peroxydation lipidique par une augmentation objectivée du malondialdéhyde (MDA) (Kamoun *et al.*, 2017).

❖ Modifications du rapport NAD^+ / $NADH$

L'alcool est métabolisé en deux étapes. Tout d'abord, l'enzyme alcool déshydrogénase convertit l'alcool en acétaldéhyde, une molécule toxique et réactive. Ensuite, l'enzyme aldéhyde déshydrogénase convertit l'acétaldéhyde en acétate. Chacune de ces réactions conduit à la formation d'une molécule de $NADH$, fournissant ainsi plus de matière de départ et donc une

activité accrue de la chaîne respiratoire, y compris une utilisation accrue d'O₂ et la formation d'ERO (Wu & Cederbaum, 2003).

❖ La Production d'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde produit pendant le métabolisme de l'alcool interagit avec les protéines et les lipides et conduit à la formation de radicaux et à des dommages cellulaires (Cederbaum, 2013)

❖ Dommages aux mitochondries

L'éthanol est connu depuis longtemps pour endommager la chaîne de transport d'électrons mitochondriaux entraînant une diminution de la production d'ATP et la formation d'ERO (Wu & Cederbaum, 2003).

❖ Augmentation des niveaux de fer libre dans la cellule

L'éthanol augmente les niveaux de fer cellulaire, ce dernier favorise la production d'oxydants puissants comme le radical hydroxyle en catalysant les réactions de Fenton ou Haber-Weiss (Cederbaum, 2013).

❖ Diminution de la défense antioxydante

La production des espèces réactives de l'oxygène par l'éthanol conduit à la diminution des enzymes antioxydantes, en particulier le glutathion (GSH). Il a été démontré que l'éthanol diminue la teneur en GSH mitochondrial (mtGSH) de 50 à 85% (Fernandez-Checa *et al.*, 1991; Hirano *et al.*, 1992).

II- *Silybum marianum*

1- Présentation de *Silybum marianum*

Silybum marianum, « chardon-marie » en français ou « Milk-Thistle » en anglais est une plante annuelle à bisannuelle fait partie de la famille d'*Asteraceae*, l'une des familles les plus distribuées dans le règne végétal. *S. marianum* une plante herbacée annuelle ou bisannuelle originaire des régions de la Méditerranée et de l'Afrique du Nord (Khan *et al.*, 2009), elle est aussi naturalisé en Amérique du Nord et du Sud ainsi qu'en Australie du Sud (Abenavoli *et al.*, 2010). En Algérie, *Silybum marianum* est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides (Quezel & Santa, 1963). Le chardon-marie pousse dans une atmosphère chaude (Bijak, 2017) et préfère des précipitations élevées et des sols fertiles (Khan *et al.*, 2009). Il atteint le plus souvent 0,9–1,8 m de hauteur, floraison en mois de juillet – août avec des fleurs violet rougeâtre et des feuilles épineuses avec nervures blanc laiteux, qui ont inspiré son nom commun de *Silybum marianum* (Bijak, 2017). La plante donne des graines obliquement ovoïdes d'une couleur brune et a un anneau élargi extrapolant jaunâtre à son extrémité (Khan *et al.*, 2014).

Le chardon-marie est connue dans le monde sous divers noms régionaux :

❖ **Noms botanique** : *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Syn. *Carduus marianum* L.) (Qavami *et al.*, 2013)

❖ **En algérie** elle est connu sous le nom : chouke el djemel, chouke ahmar, bou-zeroual ou suk ez-zerwal, hacoub lichilic, tawra, djou-n'ilour man (Beniston & beniston, 1984 ; Beloued, 1998).

❖ **En français** : elle est connu sous le nom de chardon-marie, chardon argenté, chardon notre-dame, chardon marbé, épine blanche, lait de notre dame, silybe de marie (Messegue, 1975 ; Peris *et al.*, 1996).

❖ **En Anglais**: Milk thistle, Mary thistle, St. Mary's thistle, Marian thistle, Lady's thistle, Christ's crown, Venus thistle, Heal thistle, Variegated thistle, Pig leaves, Royal thistle, Snake milk, Sow thistle et Wild artichoke (Das *et al.*, 2008; Abenavoli *et al.*, 2010)

Dans cette étude nous allons utiliser le nom *Silybum marianum* ou bien *S.marianum*



Figure 4: photo de *S. marianum* prise à la région d'Ain-Berda. Feuilles ; fleur fraîche ; fleur sèche avec grain ; grains.

Tableau 2 : classification scientifique de *S. marianum* (Spichiger et al., 2000).

Embranchement	<i>Phanérogames</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Astraceae (compositae)</i>
Sous-famille	<i>Tubulifores</i>
Genre	<i>Silybum</i>
Espèce	<i>Silybum marianum (L). Gearthn</i>

2- Composition de *Silybum marianum*

Le *Silybum marianum* est un végétal riche en composés actifs de point de vue médicinal. Les fruits du chardon-marie sont souvent utilisés sans y adjoindre le reste de la plante car ce sont eux qui présentent la plus forte concentration en principes actifs (**Mouillé, 2014**). Le *S. marianum* contient un mélange de composés, en particulier de flavonolignanes communément appelés silymarine (**Kuki et al., 2012**).

La silymarine représente 1,5 à 3% du poids sec du fruit (**Bijak, 2017**). C'est un extrait des graines se compose d'une mixture de sept flavonolignanes (environ 65% à 80% de l'extrait) silybin A, silybin B, Isosilyran A et isostérien B, silychristin, isosilychristin, silydian et d'un flavonoïde qui est le taxifolin (**Graf et al., 2016**). La silymarine a été classée par l'OMS dans les années 1970 comme médicament officiel aux propriétés hépatoprotectrices (**Wesołowska et al., 2007**).

Le Silybin est le principal composant bioactif de l'extrait de silymarin comprenant environ 50–70% de l'extrait (**Bijak, 2017**).

Les grains de *S. marianum* contiennent aussi une quantité d'huile environ 20–31% (**Qavami et al., 2012**), des tocophérols, des stérols (cholestérol, campestérol, stigmastérol et sitostérol), des sucres (arabinose, rhamnose, xylose et glucose) et des protéines (**Abenavoli et al., 2010**).

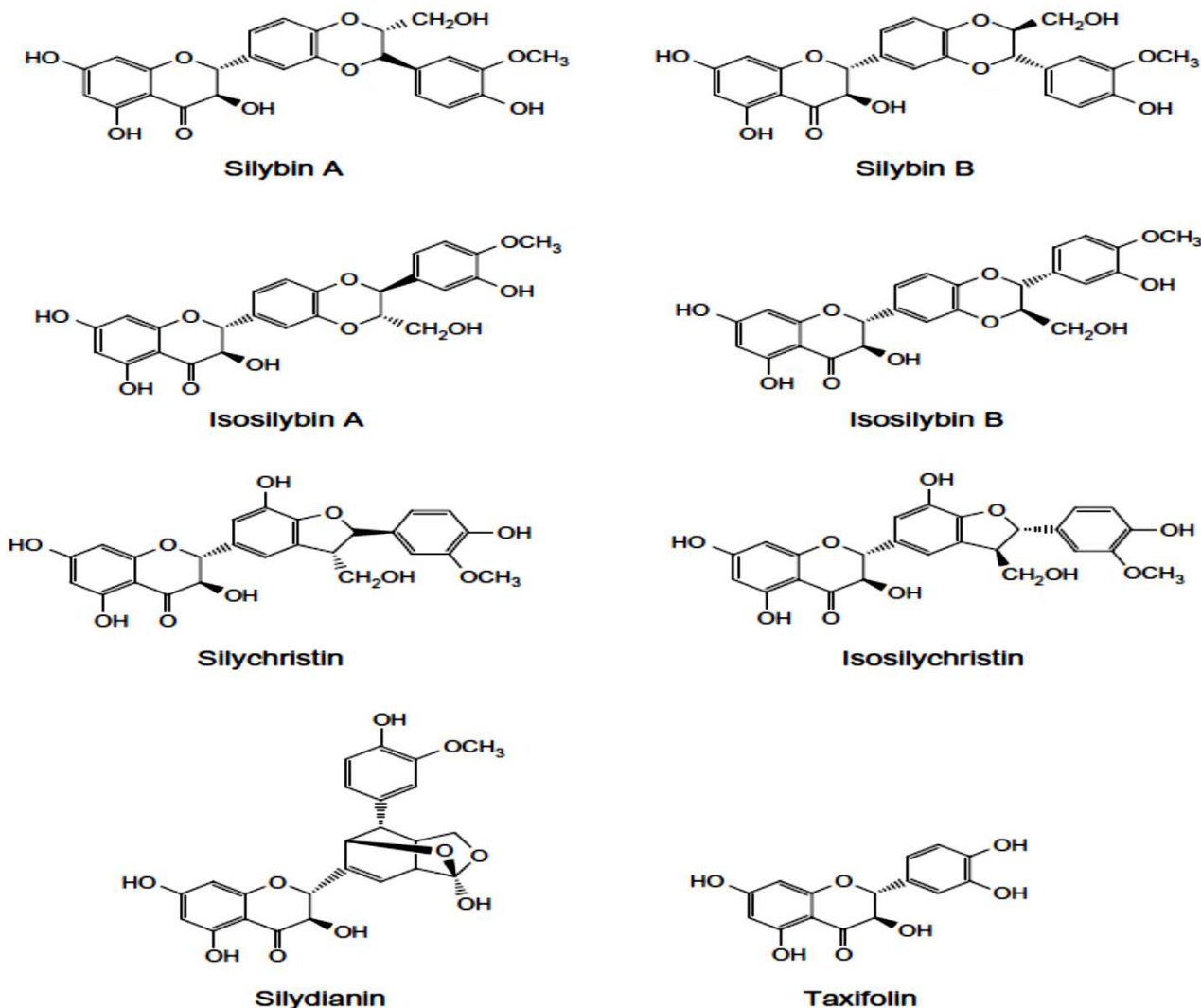


Figure 5 : Structures chimiques des flavonolignanes et des flavonoïdes comprenant de la silymarine (AbouZid *et al.*, 2016)

3- Historique d'utilisation

Chardon marie était connu depuis 2000 ans par sa valeur thérapeutique, il a été utilisé depuis des siècles comme médicament à base de plantes pour le traitement des maladies du foie, notamment la cirrhose et l'hépatite, ainsi que pour protéger le foie contre les substances toxiques (Salehi *et al.*, 2010). Les racines et les feuilles de *S. marianum* ont été recommandés par St.

Hildegard von Bingen (1098–1179) pour traiter l'enflure et l'érysipèle, au 16ème siècle, deux herboristes anglais ont recommandé l'utilisation de *S.marianum* contre toutes les maladies mélancoliques et pour soigner la fièvre (Abenavoli *et al.*, 2018).

4- Propriétés pharmacologiques de *Silybum marianum*

Plusieurs études pharmacologiques ont été réalisées sur les composants actifs de *S. marianum*, la silymarine et la silybine. Il a été constaté que ces substances exercent des propriétés hépatoprotectrices, antioxydantes, anti-inflammatoires et antifibrotiques, ils stimulent la biosynthèse des protéines, la régénération des cellules hépatiques (Abenavoli & Milić, 2017).

4-1- Activité antioxydantes

Les propriétés antioxydantes du *S. marianum* ont été évaluées en analysant la capacité de réagir avec espèces réactive d'oxygène (ERO) ou des oxydants tels que le radical anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^-) et l'acide hypochloreux (HOCl) (Qavami *et al.*, 2013). De nombreuses études ont montré l'effet antioxydant de la silymarine en éliminant les ERO et en inhibant la peroxydation des lipides. Il a été démontré que les mécanismes antioxydants possibles de la silymarine ont lieu par piégeage direct des radicaux libres, ainsi que la prévention de la formation de radicaux libres en inhibant des enzymes spécifiques responsables de la production de radicaux libres (El-Shennawy *et al.*, 2016). Plus intéressant, La silymarine n'a pas seulement une propriété antioxydante forte qui réagit avec les espèces réactives de l'oxygène, mais aussi a la capacité d'augmenter la puissance des antioxydants physiologiques (Surai, 2015). Il a été reporté que l'administration de silymarine augmente les activités des enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase, le glutathion peroxydase (GPx), le glutathion réductase (GR) et le glutathion-S-transférase (GST) (Kiruthiga *et al.*, 2007 ; Fatehi *et al.*, 2018). De plus, il a été prouvé que la silymarine peut préserver la concentration de GSH en augmentant les niveaux de métabolites de la méthionine, de la S-adénosylméthionine et de la cystéine qui sont nécessaires pour synthétiser la GSH (Kim *et al.*, 2016).

4-2- Effet contre les maladies du foie

L'effet protecteur de silymarine contre les maladies du foie a été résumé par (Abenavoli & Milić 2017) comme suivant :

- ❖ Régénère les cellules hépatiques endommagées par l'alcool ou les drogues
- ❖ Augmente la synthèse des protéines dans les hépatocytes
- ❖ Réduit l'infiltration des cellules inflammatoires après une atteinte hépatique
- ❖ Augmente le taux de survie des patients atteints de cirrhose du foie
- ❖ Utiliser comme un complément dans le traitement de l'hépatite virale
- ❖ Réduit l'accumulation de graisses dans le foie et améliore la résistance à l'insuline
- ❖ Protège contre les poisons industriels, tels que le tétrachlorure de carbone

4-3- Activité anti-cancéreuse

Plusieurs études ont démontré les effets anticancéreux de la silymarine ou de la silybine à différentes étapes des processus de cancérogenèse et dans différents types de cancers (tableau 3).

Parmi les mécanismes par lesquels la silymarine et la silybine exercent leur activité anti-cancéreuse est la régulation de déséquilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose en interférant avec les expressions des régulateurs du cycle cellulaire et des protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules cancéreuses (**Ramasamy & Agarwal, 2008**).

Tableau 3: Activités anticancéreuses de la silymarine dans différents types de cancers

Type de cancer	Références
Cancer de la bouche	Won <i>et al.</i> , 2018
cancer de colon	Eo <i>et al.</i> , 2016 ; Akhtar <i>et al.</i> , 2014
cancer d'estomac	Wang <i>et al.</i> , 2014
cancer de peau	Singh <i>et al.</i> , 2006
cancer du poumon	Kalla <i>et al.</i> , 2014; Singh <i>et al.</i> , 2016 ; Won <i>et al.</i> , 2018
cancer de prostate	Zi & Agarwal, 1999; Bhatia & Agarwal, 2001; Wu <i>et al.</i> , 2010
Cancer des ovaires	Fan <i>et al.</i> , 2014
cancer du sein	Noh <i>et al.</i> , 2011 ; Kalla <i>et al.</i> , 2014
cancer de vessie	Sun <i>et al.</i> , 2017 ; Imai-sumida <i>et al.</i> , 2017

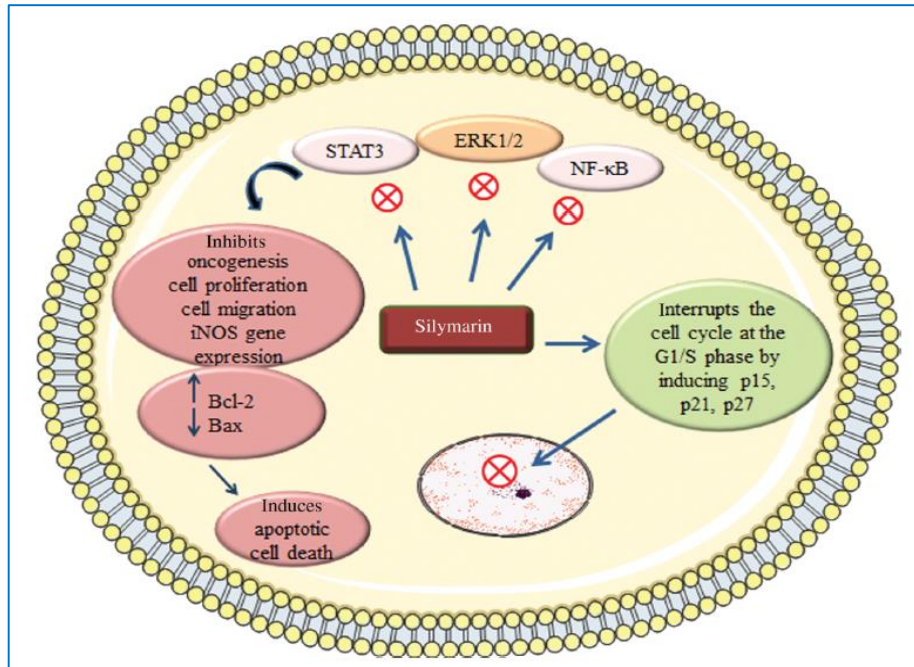


Figure 6 : Effets anticancéreux possibles de la silymarine (Camini & Costa 2020).

4-4- Activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice

Des études ont rapporté que la silymarine présente une activité anti-inflammatoire et immun-modulatrice dans diverses structures et voies de la cellule (Milić *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2017) :

- ❖ La silymarine inhibe l'expression de molécules d'adhésion, comme la E-sélectine, une famille de molécules transmembranaires exprimées notamment à la surface des leucocytes, impliquées dans les voies inflammatoires (Kang *et al.*, 2003).
- ❖ Le *S.marianum* semble avoir des effets immunomodulateurs sur certains effecteurs du système immunitaire, notamment les lymphocytes T CD3 et CD4 (Johnson *et al.*, 2003).
- ❖ Réduire les niveaux de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), d'interleukine et d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Milić *et al.*, 2013).
- ❖ La silymarine et la silibinine inhibent la formation de médiateurs inflammatoires, en particulier les prostaglandines et les leucotriènes (en inhibant la voie de la 5-lipoxygénase) et la libération d'histamine par les basophiles (Bhattacharya, 2011).

- ❖ La silybine pourrait inhiber la voie de la 5-lipoxygénase, en particulier le leucotriène B4 (LTB4) (Abenavoli & Milić, 2017)
- ❖ la silymarine prévenir l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF-κB), qui est un facteur de transcription omniprésent à réponse rapide dans les cellules inflammatoires en supprimant à la fois leur motif de l'activité de liaison à l'ADN NF-κB et son expression génique dépendante dans les cellules d'hépatique (Abenavoli & Milić, 2017).
- ❖ L'administration à long terme de silymarine améliore l'immunité en augmentant les lymphocytes T et les interleukines et en réduisant tous les types d'immunoglobulines (Das *et al.*, 2008).

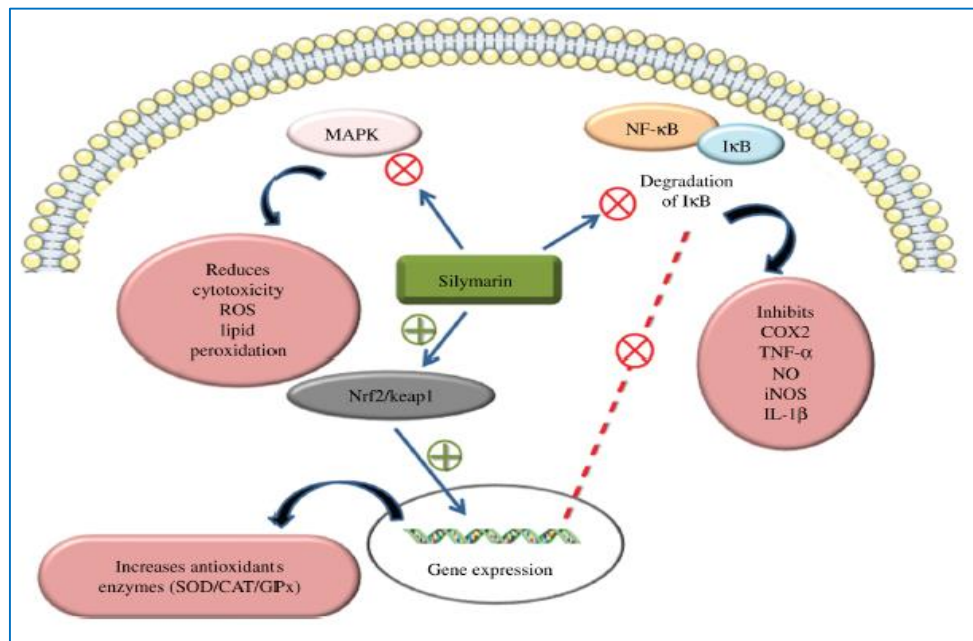


Figure 7: Action anti-inflammatoire de la silymarine (Camini & Costa 2020).

Les autres propriétés pharmacologiques de *S.marianum* ont été résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Propriétés pharmacologiques de *S.marianum*.

Propriétés pharmacologiques	Références
Activités antivirales	McClure <i>et al.</i> , 2014; Blaising <i>et al.</i> , 2013 ;Cardile & Mbuy, 2013
Activité antifibrotique	Clichici <i>et al.</i> , 2015
Activités antidiabétiques	Derosa <i>et al.</i> , 2016; Ebrahimpour-Koujan <i>et al.</i> , 2018
Effet Cardio-protecteur	Ulas <i>et al.</i> , 2013 ; Vilahur <i>et al.</i> , 2018
Maladies de Wilson	Jedlinszki <i>et al.</i> , 2016
Blocus des toxines	Serviddio <i>et al.</i> , 2014; Trakulsrichai <i>et al.</i> , 2017

5- Toxicité de *Silybum marianum*

S. marianum est reconnu comme une plante sans danger. Il n'a pas été inclus dans la liste des plantes qui contiennent des substances toxiques, addictives, psychotropes ou autres préoccupantes (**European Food Safety Authority, 2009**). Des études menées sur l'homme en utilisant les graines de *S. marianum* ont démontré que l'extrait des graines est sans danger et bien toléré (**Bhattacharya, 2011**). Tandis que, les doses plus élevées (> 1500 mg / jour) peuvent produire des troubles gastro-intestinaux mineurs impliquant un léger effet laxatif, des légères réactions allergiques (prurit, urticaire, arthralgie) ont été aussi observées, mais sont rarement suffisamment graves pour provoquer l'arrêt du traitement (**Bhattacharya, 2011**).

Matériels & Méthodes

I- Matériels utilisés

1- Matériel biologique

Notre étude expérimentale a été réalisée sur des rats blancs de la souche *Wistar*. Un échantillon de 36 rats males provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, avec un poids de 200 ± 20 g. L'élevage des rats a été effectué au niveau de l'animalerie de l'Université Badji Mokhtar - Annaba. Les animaux étaient hébergés dans des cages en polyéthylène munies d'étiquettes où sont mentionnés le nom du lot et le traitement subit, les cages sont tapissées d'une litière en copeaux de bois nettoyées quotidiennement. Les rats ont aussi accès libre à l'eau et à la nourriture qui est fournie sous forme de croquettes provenant d'ONAB Kseur-Bejaia.

2- Produit chimique

2-1- L'éthanol

L'expérimentation consiste à administrer aux rats deux doses croissantes 1g/Kg et 2g/kg de l'éthanol à une concentration de 40%. L'éthanol absolu (99,8%, Honeywell Laboratory, Germany) a été dilué pour atteindre la concentration souhaitée selon le tableau de dilution de l'alcool de *Gay Lussac* (voire annexes).



Figure 8 : photo de flacon de l'éthanol utilisé

2-2- *Silybum marianum*

Les graines de *Silybum marianum* ont été récolté le mois de juillet- août de l'année 2016, de la région de Ain-Berda, Annaba- Algérie, puis ils ont stocké dans une boîte en verre loin de l'humidité jusqu'au leur utilisation.

❖ *Préparation de l'infusion de Silybum marianum*

L'infusion a été préparée selon **Raskovic et al, (2002)**, 100 ml d'eau distillée bouillante a été versé sur 10 g de graines secs écrasées de la plante. Le mélange et a été laissé à infuser pendant 30 minutes. Après filtration, l'infusion a été donnée aux rats à la dose de 200 mg/Kg/j par gavage.

3- Protocole Expérimental

Après une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie les rats ont été répartis en six groupes, six rats chacun. Le traitement été effectué par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique pendant six semaines successives comme suit :

Groupe Témoin : les rats ont reçu une eau potable et une nourriture simple.

Groupe ISM : Témoin positive, les rats ont reçu l'infusion des graines de *Silybum marianum* (ISM) à la dose de 200 mg/Kg/j

Groupe Eth1 : Les rats ont été traités par gavage 01 g/kg/j d'éthanol.

Groupe Eth2 : Les rats ont été traités par gavage 02 g/kg/j d'éthanol.

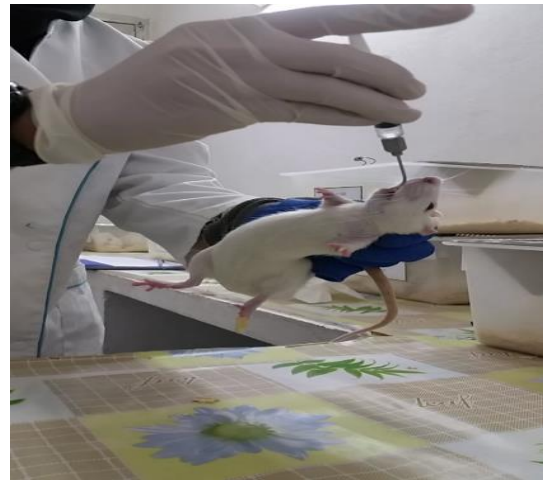
Groupe Eth1+ISM : Les rats ont été traités par gavage 01 g/kg/j d'éthanol, après une heure les rats ont reçu 200 mg/Kg/j l'infusion des graines de *Silybum marianum*

Groupe Eth2+ISM : les rats ont été traités par gavage 02 g/kg/j d'éthanol, après une heure les rats ont reçu 200 mg/Kg/j l'infusion des graines de *Silybum marianum*

Tous les rats de l'expérience ont reçu l'eau potable et une nourriture simple



Les rats dans la cage



Gavage des rats



Grains de Chardon marie



Infusion des grains de Chardon marie

Figure 9: hébergement, gavage des rats et préparation de l'infusion

4- Prélèvement des échantillons

4-1- Prélèvement sanguin

Les rats sont sacrifiés par décapitation ; le sang est immédiatement recueilli dans trois tubes étiquetés, l'un sec et les deux autres contiennent un anticoagulant :

- Les tubes héparinés sont centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, le plasma récupéré servi au dosage de testostérone.
- Les tubes secs sont centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, le sérum récupéré servi à la détermination des paramètres biochimiques.
- Les tubes à EDTA serviront pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).

4-2- Prélèvement du sperm épидидymaire

Le sperme a été prélevé à partir d'une petite ouverture faite au niveau de la queue de l'épididyme. Le sperme (10 µl environ) est ensuite dilué dans deux solutions ; le sérum physiologique (NaCl 0.9%) pour étudier la concentration et la motilité, et un autre volume de sperm (100µl environ) a été dilué dans une solution hypo-osmotique pour étudier la vitalité des spermatozoïdes.

4-3- Prélèvement des organes

Les animaux ont été ouverts ventralement. Après dissection, les testicules, l'épididyme, le foie et les reins ont été prélevés, nettoyés de leurs tissus adipeux et rincés dans le NaCl à 0.9% puis pesés pour déterminer leur poids absolu. Ensuite, les organes ont été stockés à -20 ° C pour la détermination des paramètres de stress oxydatif.

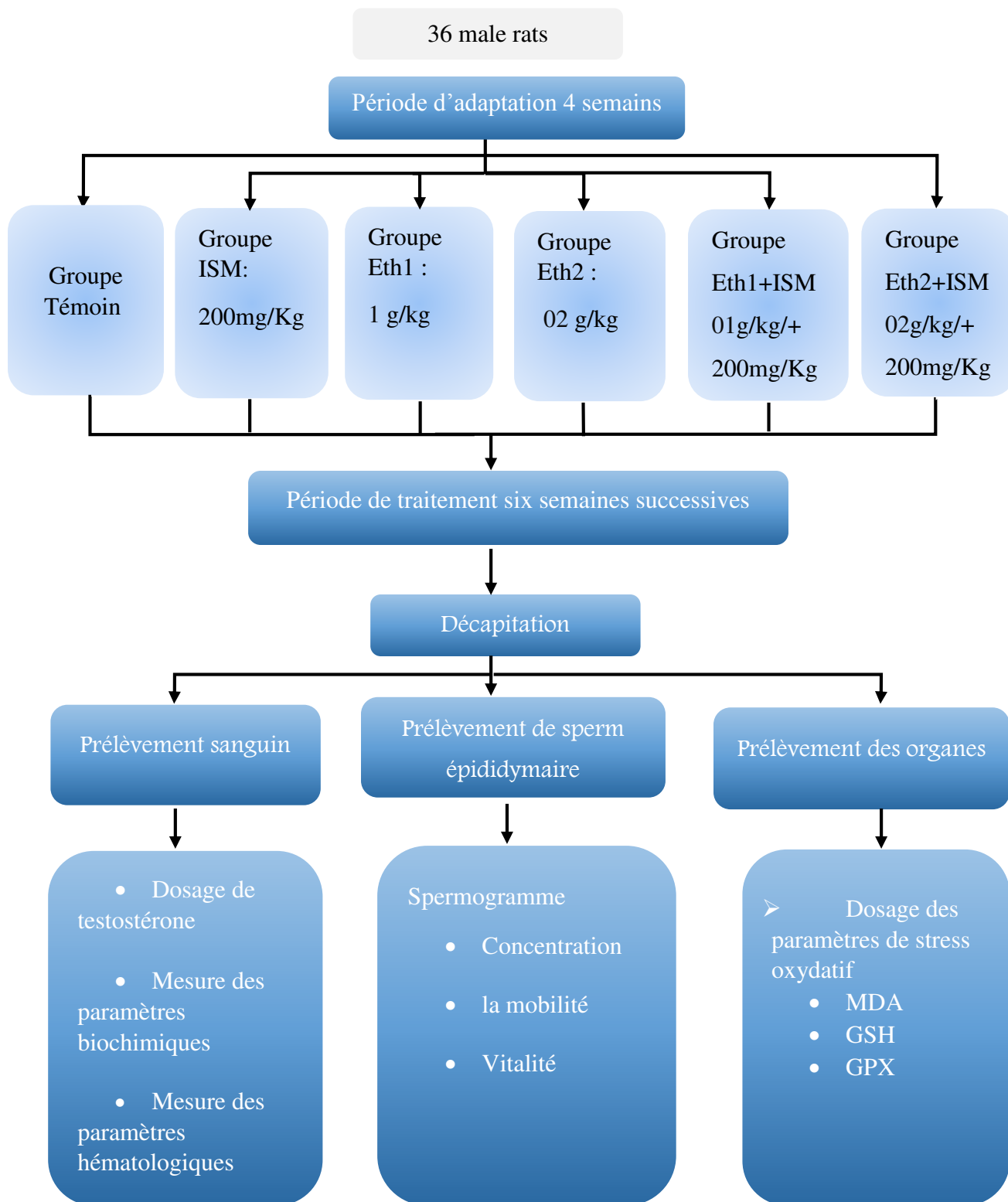


Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

II- Méthodes de dosage

1- Etude de la biologie des spermatozoïdes

L'étude de la biologie des spermatozoïdes des rats a été réalisée au niveau notre laboratoire de recherche Ecophysiologie Animal en utilisant le système SCA (sperm class Analyzer) du CASA. Le système permet une analyse automatique, répétitive et précise d'un échantillon de spermatozoïdes selon les paramètres suivants : concentration, les paramètres des mobilités (mobilité totale, mobilité progressive, et les paramètres cinétiques (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF et ALH)), vitalité. Le système s'affiche le résultat se forme d'un rapport contient les différentes paramètres analysés.

1-1- La mobilité / concentration des spermatozoïdes

La concentration et les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes ont été mesurés automatiquement par la méthode d'analyse de sperme assistée par ordinateur CASA en utilisant le Sperm Class Analysis (SCA®, Microptic, Barcelona, Espagne) version 6.2.0.0. 5 µl de spermatozoïdes dilués à une température de 37 °C ont été mis dans une chambre de la lame GoldCyto préchauffée et mis sous microscope Nikon Eclipse (Nikon E200-LED) en utilisant objective x4 négative à contraste de phase combiné à un contraste condenseur de phase, le microscope intégré avec une caméra BASLER acA780-75gc. Le module Mobilité/concentration de sperm class analysis nous permet de déterminer les paramètres suivants : concentration, mobilité totale, mobilité progressive, et les paramètres cinétiques (VCL, VSL, VAP, BCF et ALH).

1-2- La vitalité des spermatozoïdes

Pour la vitalité des spermatozoïdes on a utilisé le test de gonflement hypo-osmotique (Jeyendran *et al.*, 1984). Ce test est basé sur le caractère semi-perméable de la membrane de spermatozoïde intacte en présence d'un milieu extracellulaire hypo-osmotique, les spermatozoïdes vivants se produisent un influx d'eau dans leur flagelle pour rééquilibrer la pression osmotique de part et d'autre de la membrane, provoquant par la suite un gonflement et un recourbement de flagelle. Un

spermatozoïde mort, perd cette capacité osmorégulatrice et, par conséquent, ne gonfle pas en milieu hypo-osmotique.

❖ *Préparation de solution utilisée*

Dissoudre 0.367g de citrate de sodium et 0.675g de fructose dans 50 ml d'eau distillée.

❖ **Mode de travail**

- Mettre 500µl de la solution placée dans un tube Eppendorf fermé dans un bain marie à une température 37°C pour 3 mn.
- Ajouter environ 50µl de sperme dilué et on mélange doucement à l'aide d'une pipette et laisser incuber à 37°C pendant 30 minutes.
- Sur une lame ordinaire, étaler 10µl du mélange et laisser sécher

On Calcule le pourcentage des spermatozoïdes avec des flagelles gonflé ainsi le pourcentage des spermatozoïdes avec des flagelles non gonflé et sur un total de 100 spermatozoïdes compté (OMS, 1993).

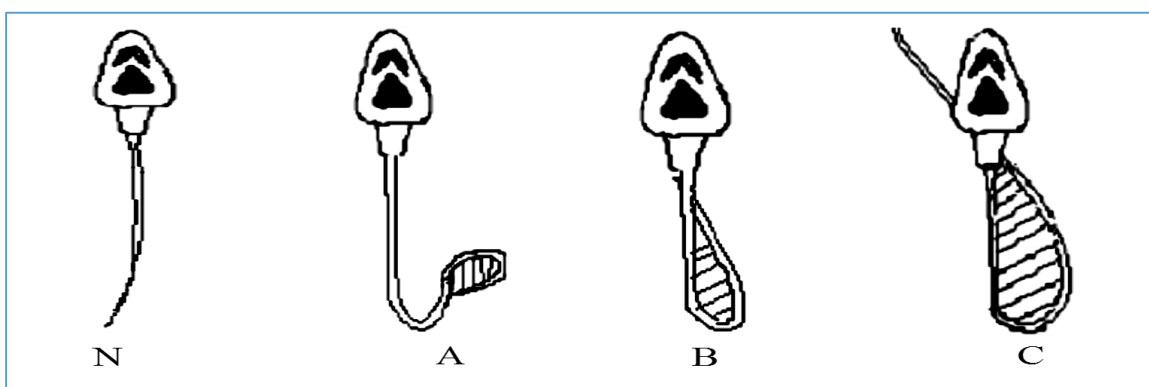


Figure 11: présentation schématique des modifications morphologiques caractéristiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique.

A: Modification faible du flagelle.

B : Modification importante du flagelle.

C: Modification très importante du flagelle.

N: spermatozoïde normal= spermatozoïdes morts

} Spermatozoïdes vivants

2- Dosage de testostérone

La concentration plasmatique de testostérone a été mesurée par le test d'immunosorbant lié à une enzyme (the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)), comme a été mentionné dans le manuel d'instructions du kit commercial (fabriqué par DGR Instruments GmbH, Germany). Le dosage est effectué au niveau d'un laboratoire d'analyse médical privé (laboratoire d'analyse médicales Dr S.KACI née TIARTI, cite des orangers Bloc 23 N° 178 Annaba).

3- Mesure des paramètres biochimiques

Dans cette expérience, l'activité enzymatique de alanine transaminase, aspartate amino transférase, and phosphatase alcaline, le bilan lipidique (cholestérol total, les triglycérides, le LDL et le HDL) et le bilan rénal (exprime par la créatinine et l'urée). Le dosage est effectué au niveau d'un laboratoire d'analyse médical prive dans la ville de Annaba (laboratoire d'analyse médicales Dr S.KACI née TIARTI, cite des orangers Bloc 23 N° 178 Annaba) par un automate informatise selon la fiche technique des kits commercial Spinreact, (fabriqué par SA – Santa Coloma, Spain).

4- Mesure des paramètres hématologiques

Le dosage a été effectué au niveau de laboratoire de l'écophysiologie animal par un automate d'FNS abacus4.

5- Dosage des paramètres de stress oxydative

5-1- Dosage du malone-dialdehyde (MDA)

Principe : le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres. Dans notre étude, le dosage de taux du MDA testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal été évalués selon la méthode d'**Ohkawa et al, (1979)**. Cette méthode repose sur la formation entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol dans un milieu acide et chaud (100 °C).

Mode opératoire

100 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 1 mL d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pour obtenir un homogénat. Après la préparation de l'homogénat, on a :

- Prélevé 0,5 ml de l'homogénat.
- Ajouté 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 %.
- Ajouté 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %.
- Mélangé et laissé le mélange incuber au bain marie a une température de 100 °C durant 15 min.
- Laissé le mélange refroidir, puis on a additionné 4 ml de *n*-butanol.

Le mélange a été centrifugé pendant 15 minutes à 3000 tours/min. à la fin, on a récupéré le surnageant et li la densité optique contre le blanc.

***Calcul de la concentration du MDA :** la quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de tissu (foie ou reins). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions.

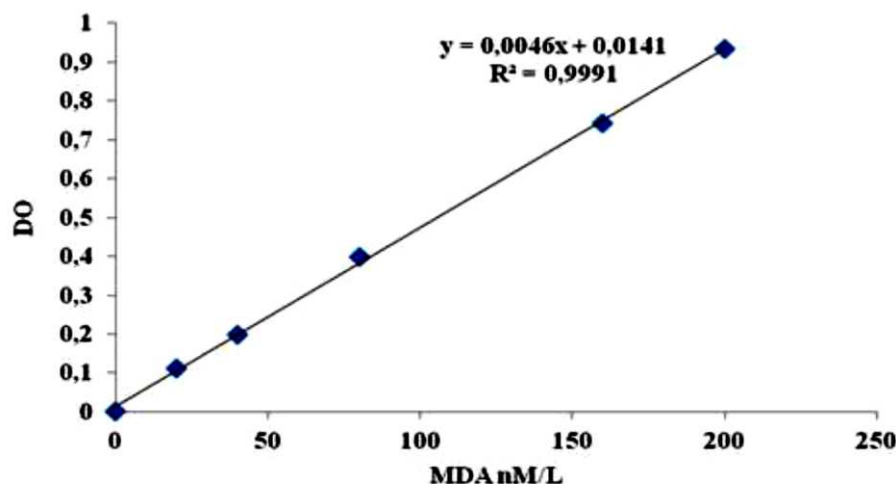


Figure 12: la courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de l'MDA

5-2- Dosage du Glutathion réduit (GSH)

Principe : le dosage du glutathion au niveau des testicules, épидидyme, foie et rein a été réalisé selon la méthode de **Weckbecker & Cory, (1988)** qui repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qu'il résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-

nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

Mode opératoire

Pour la préparation de l'homogénat, 100 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 4 mL d'une solution d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid en utilisant un broyeur ultra son (4 °C) pour obtenir un homogénat ensuit :

- Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique 0,25 %.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger a 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0,5 ml du surnagent.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris + EDTA (0.02 M d'EDTA), pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

Calcul : la concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante

$$[\text{GSH}] (\text{Nm GSH/mg protéines}) = (\text{DO} \times 1 \times 1,525) / (13,100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg proteins})$$

- ❖ D0 : Densité optique.
- ❖ 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8mL homogénat +0.2 mL de l'acide salicylique).
- ❖ 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 mL surnageant +1 mL Tris + 0.025 mL DTNB).
- ❖ 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- ❖ 0.8 : Volume de l'homogénat.
- ❖ 0.5 : Volume du surnageant.

5-3- Dosage de l'activité enzymatique du Glutathion Peroxydase (GPx)

Principe : l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal a été mesurée par la méthode de **Flohe & 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 de la GPx selon la réaction suivante :



Préparation de l'homogénat : 100 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 1 mL d'une solution TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

- Prélever 0,2 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM).
- Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- Incuber au bain marie 25°C, pendant 5 min.
- Ajouter 0,2ml de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- Prélever 0,48 ml du surnageant.
- Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- Ajouter 0,32 ml de DTNB (1,0 mM)
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

Calcul : la détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide des formules suivantes:

$$\text{GPx (nmol GSH/mg prot)} = \frac{Q}{\text{mg de protéine}}$$

$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

- ❖ Q : Quantité de GSH disparue (oxydée)
- ❖ DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

- ❖ DO étalon : Densité optique de l'étalon.
- ❖ 0.04 : Concentration du substrat (GSH).

5-4 Dosage des protéines

Les résultats de GSH et GPx ont été exprimés en (nmol/mg de protéines) et (μ mol de GSH/mg de protéines), respectivement. Donc, la concentration en protéines totales testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

Principe : la concentration de protéines est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-NH_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

Mode opératoire

- Prélever 0,1 mL de l'homogénat.
- Ajouter 5 mL du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.

Calcul de La concentration des protéines : la densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/mL) réalisée dans les mêmes conditions.

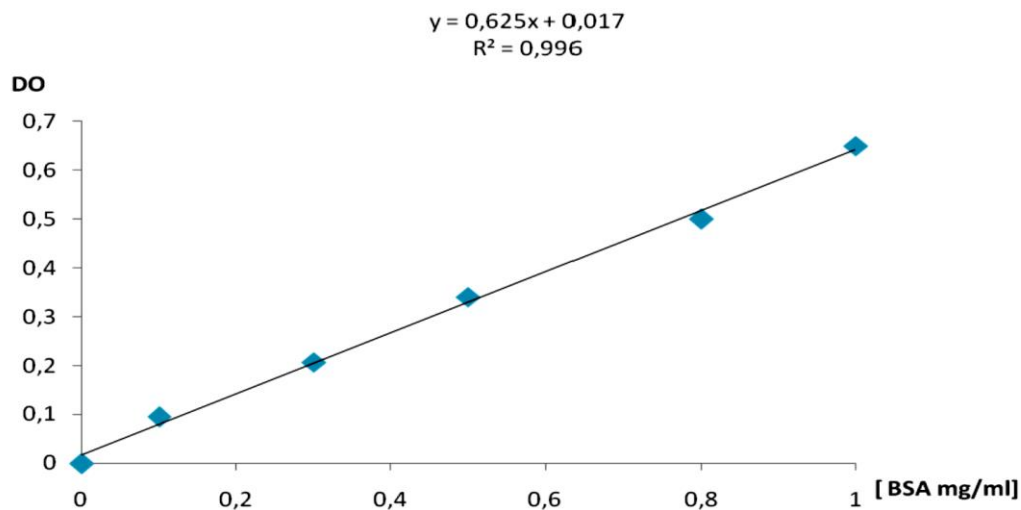


Figure 13 : la courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines.

III- Étude statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne \pm écart type (SD) de la moyenne. Les différences ont été testées entre les groupes pour la signification statistique par analyse de la variance (ANOVA), suivies du test de Tukey pour les comparaisons multiples. L'analyse statistique des données a été effectuée par le logiciel *Minitab 18*.

Résultats & Discussion

I- L'effet de l'éthanol sur la fonction reproductrice : l'effet protecteur de *Silybum marianum*

❖ Résultats

1- Influence du traitement sur la masse corporelle

Les variations de du poids corporel initial, du poids corporel final et du gain de poids des rats de groupe témoin et les groupes traités ont été présenté dans le tableau 5. Les résultats montrent que le gavage oral d'éthanol à 1g/kg et 2g/kg de poids corporel ainsi que de l'infusion des graines de *Silybum marianum* pendant six semaines n'ont provoqué aucun changement significatif du poids corporel initial, du poids corporel final et du gain de poids entre tous les groupes de l'expérimentation ainsi par rapport au groupe témoin.

Tableau 5: Les variations de du poids corporel initial, poids corporel final et du gain de poids chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	SMI	Eth1	Eth2	Eth1+SMI	Eth2+SMI
PI (g)	219.83±6.6 ^a	220.67±8.3 ^a	220.33±11.6 ^a	220.33±9.4 ^a	219.83±8.7 ^a	219.67±12.8 ^a
PF (g)	300.67±6.9 ^a	302.33±15.9 ^a	311.33±13.4 ^a	312.67±15.9 ^a	298.00±17.7 ^a	300.0±29.6 ^a
GP (g)	81.60±7.02 ^a	82.40±12.14 ^a	90.60±10.01 ^a	90.00±17.45 ^a	74.40±20.38 ^a	79.2±23.9 ^a

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. PI : Poids Initial ; PF : Poids Final ; GP : Gain de Poids ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

2- Influence du traitement sur la fonction reproductrice

2-1- Variation du poids absolu des testicules et l'épididyme

Les variations de poids des testicules et des épидидymes ont présente par le tableau 6, figure 14.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative du poids des testicules et des épидидymes chez les rats traités par l'éthanol (Eth1 et Eth2) en comparaison avec les autres groupes. Tandis que les rats traite avec éthanol et l'ISM (Eth1+ISM et Eth2+ISM) ne montrent aucun changement significative dans le poids des testicules et les épидидymes en comparaison avec le groupe témoin (figure 14, tableau 6).

Tableau 6: Les variations des poids absolu des testicules et épидидymes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
T (g)	1.67±0.046 ^b	1.79±0.045 ^a	1.53±0.033 ^c	1.46±0.064 ^d	1.68±0,064 ^b	1.66±0.088 ^b
E (g)	0.69±0.035 ^a	0.74±0.019 ^a	0.61±0.033 ^b	0.57±0.013 ^b	0.70±0.027 ^a	0.69±0.026 ^a

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. T : Testicules ; E : Epididymes ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

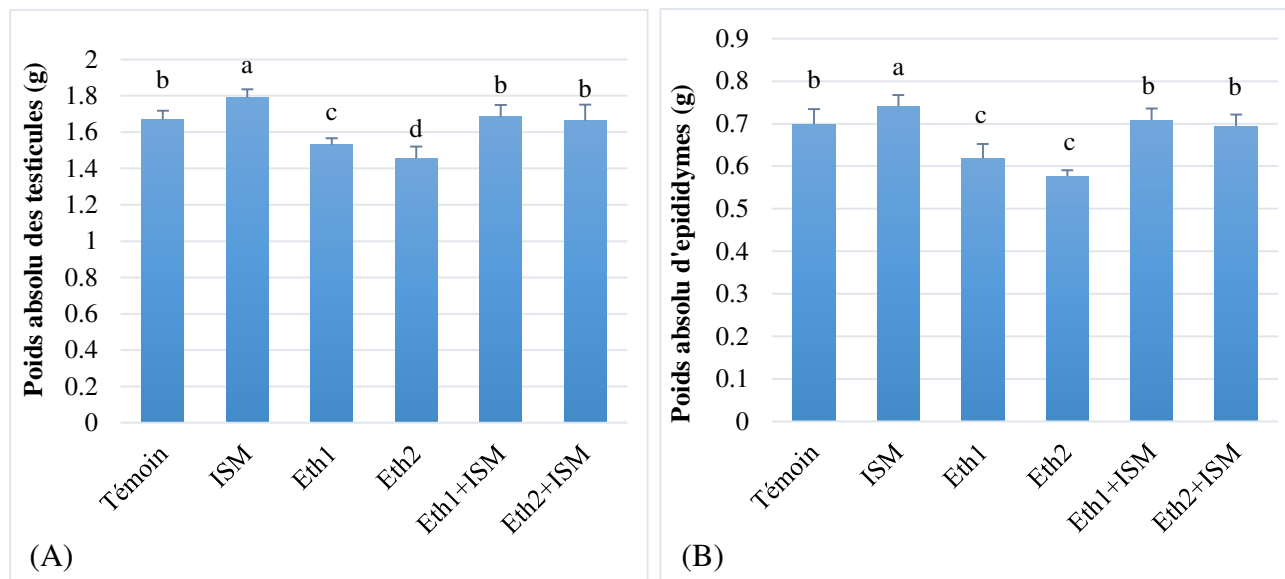


Figure 14 : Les variations des poids absolus des organes de la reproduction chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement ; (A) : poids absolu des testicules, (B) : poids absolu des épидидymes.

2-2- Variations des paramètres biologiques des spermatozoïdes

Afin d'évaluer l'effet de traitement sur la fonction reproductrice nous avons étudié les paramètres biologiques des spermatozoïdes présentés par la concentration et la vitalité des spermatozoïdes, la mobilité totale, la mobilité progressive et les paramètres cinématiques exprimés par VCL "curvilinear velocity", VSL "straight-line velocity", VAP "velocity average path", la fréquence de croisement de la trajectoire ou bien "beat cross frequency" (BCF), et ALH "lateral head displacement".

2-2-1- Effet de traitement sur la concentration et la vitalité des spermatozoïdes

Les variations de la concentration des spermatozoïdes ainsi que leur vitalité ont été présentées dans le tableau 7.

Les résultats indiquent que le gavage oral de l'éthanol par les deux doses utilisé pendant six semaines successives a réduit significativement la concentration et la vitalité des spermatozoïdes (figure 15 et 16) par rapport aux autres groupes.

D'autre part, nous avons observé que la concentration des spermatozoïdes ainsi leur vitalité ont été significativement plus élevés dans les groupes Eth1+ISM et Eth2+ISM par rapport aux groupes Eth1 et Eth2. De plus, nous n'avons observé aucune changement significative dans les groupes Eth1+ISM et Eth2+ISM par rapport au groupe témoin (figure 15 et 16).

Tableau 7: Les variations la concentration et la vitalité des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
CON (m/ml)	771.7±49.0 ^{ab}	838.8±34.8 ^a	625.0±57.9 ^c	481.5±66.1 ^d	733.9±24.1 ^b	717.8±55.7 ^b
Vitalité (%)	62.02±1.83 ^b	68.50±2.41 ^a	34.31±3.28 ^c	27.29±3.11 ^d	59.77±3.49 ^b	58.22±6.20 ^b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. CON : Concentration des spermatozoïdes ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

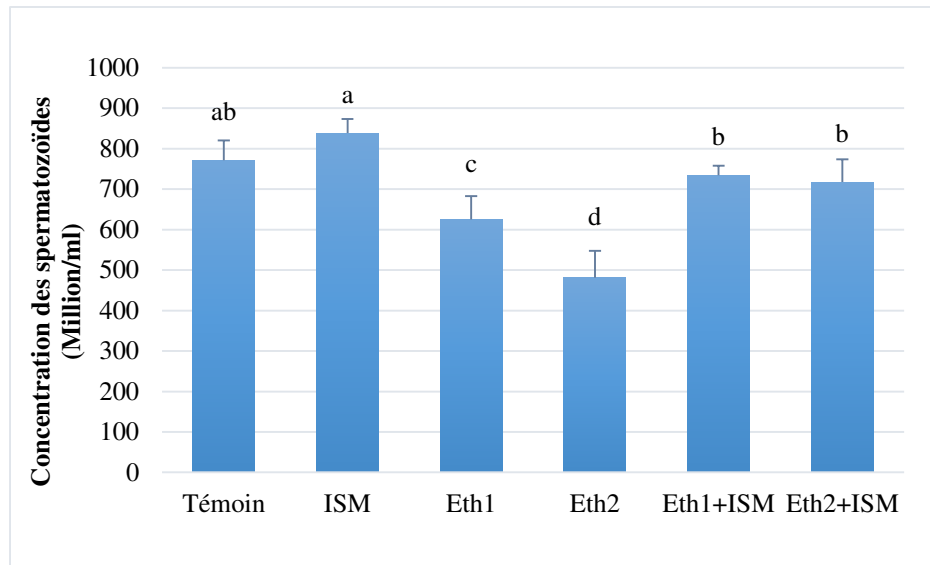


Figure 15 : Variation de la concentration des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

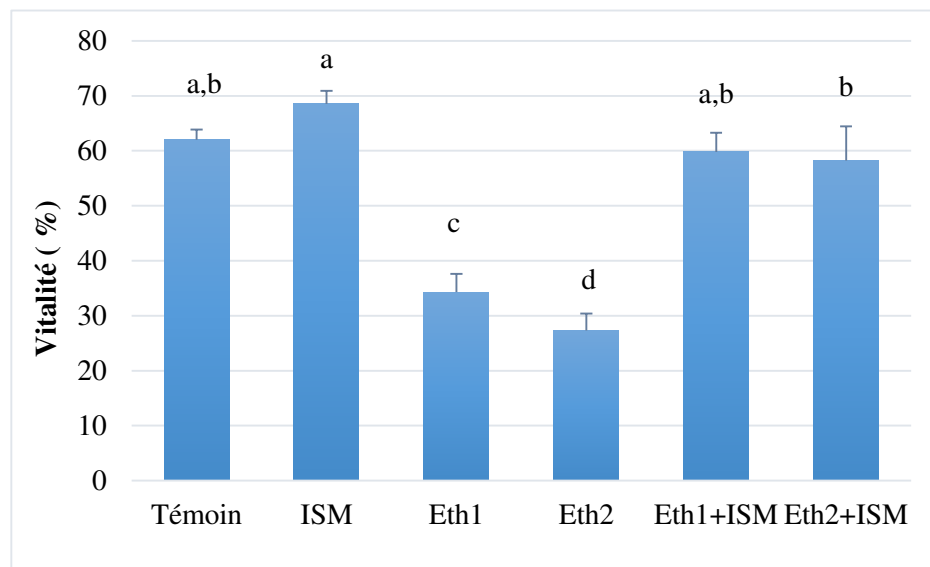


Figure 16: Pourcentage des spermatozoïdes vivant chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

2-2-2- Effet de traitement sur les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes

Les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes, en particulier, les paramètres cinématiques sont des paramètres sensibles pour évaluer les effets des facteurs environnementaux sur la fertilité masculine et donnent plus de détails sur la fonction de motilité des spermatozoïdes.

Nos résultats montrent une claire altération toxique sur les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes provoqué par l'éthanol. Dont, nous avons observé que la mobilité totale, mobilité progressive les paramètres de vélocité (VCL, VSL, VAP), BCF et ALH ont diminué significativement chez les groupes Eth1 et Eth2 par rapport aux autres groupes. D'autre part, ISM a remarquablement protégé les fonctions les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes de la toxicité de l'éthanol. Dont, tous les paramètres cité ci-dessus ont été significativement plus élevés dans les groupes Eth1+ISM et Eth2+ISM par rapport aux groupes Eth1 et Eth2. De plus, aucune différence n'a été observée chez les groupes Eth1+ISM et Eth2+ISM par rapport au groupe témoin.

Les résultats ont été illustre dans les tableaux 8 et 9, figures 17-21

Tableau 8: Les variations de mobilité totale et progressive des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
Mob.T (%)	74.85±4.24 ^b	81.91±4.07 ^a	42.61±1.8 ^c	33.96±4.66 ^d	71.15±4.27 ^b	70.14±4.01 ^b
Mob.P (%)	10.61±0.68 ^{ab}	11.71±0.55 ^a	4.24±0.85 ^c	2.98±0.89 ^c	9.61±0.92 ^b	9.66±0.79 ^b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. Mob.T : Mobilité Totale ; Mob.P : Mobilité Progressive ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

Tableau 9: Les variations des paramètres cinématiques des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M \pm SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
VCL ($\mu\text{m/s}$)	81.15 \pm 4.5 1 ^a	81.19 \pm 2.21 ^a	72.92 \pm 3.74 ^b	71.07 \pm 4.31 ^b	79.89 \pm 1.99 ^a	79.81 \pm 4.45 ^a
VSL ($\mu\text{m/s}$)	18.36 \pm 1.8 4 ^{ab}	20.40 \pm 1.49 ^a	13.68 \pm 1.75 ^c	11.98 \pm 1.53 ^c	16.59 \pm 2.09 ^b	17.09 \pm 3.82 ^b
VAP ($\mu\text{m/s}$)	39.84 \pm 0.9 5 ^{ab}	41.42 \pm 1.49 ^a	33.83 \pm 0.9 ^c	32.73 \pm 1.03 ^c	38.64 \pm 2.39 ^{ab}	37.52 \pm 2.11 ^b
BCF (Hz)	4.19 \pm 0.11 ^a	4.45 \pm 0.18 ^a	3.54 \pm 0.33 ^b	3.36 \pm 0.18 ^b	4.09 \pm 0.27 ^a	4.09 \pm 0.40 ^a
ALH (μm)	4.62 \pm 0.11 ^a	4.59 \pm 0.12 ^a	4.23 \pm 0.15 ^b	4.06 \pm 0.11 ^b	4.52 \pm 0.173 ^a	4.50 \pm 0.14 ^a

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. CON : Concentration des spermatozoïdes ; VCL: *curvilinear velocity*; VSL: *straight-line velocity* ; VAP : *velocity average path* ; BCF : *beat cross frequency* ; ALH : *lateral head displacement* ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

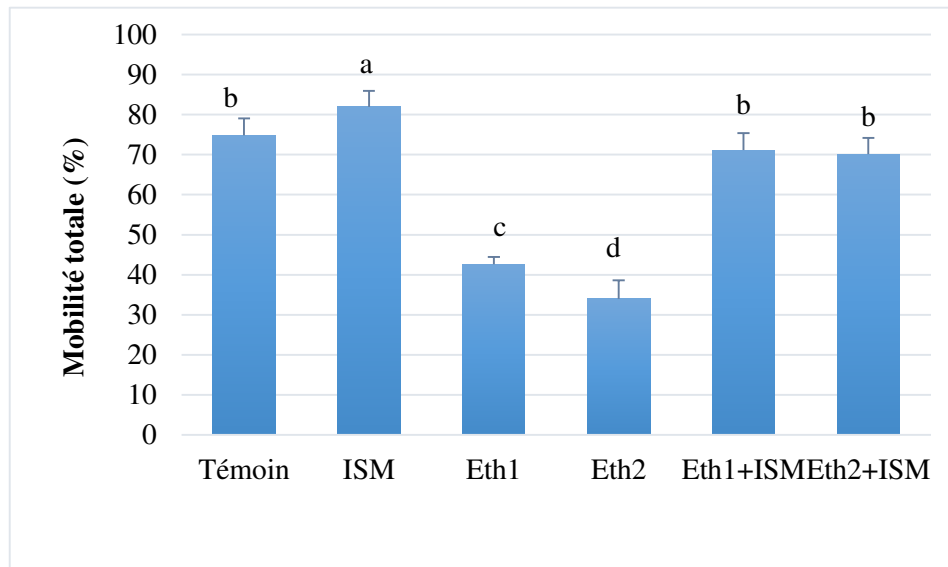


Figure 17: Mobilité des spermatozoïdes totale chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

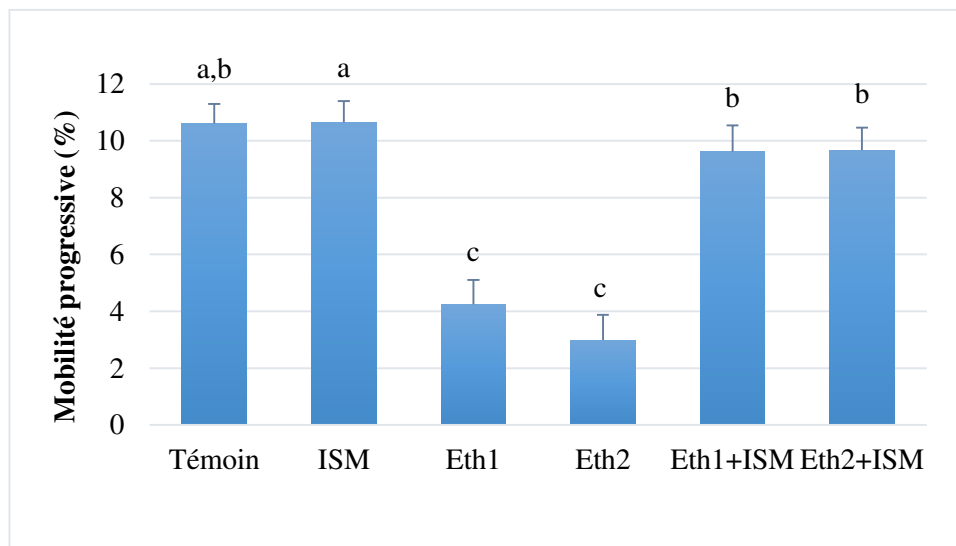


Figure 18: Mobilité progressive des spermatozoïdes chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

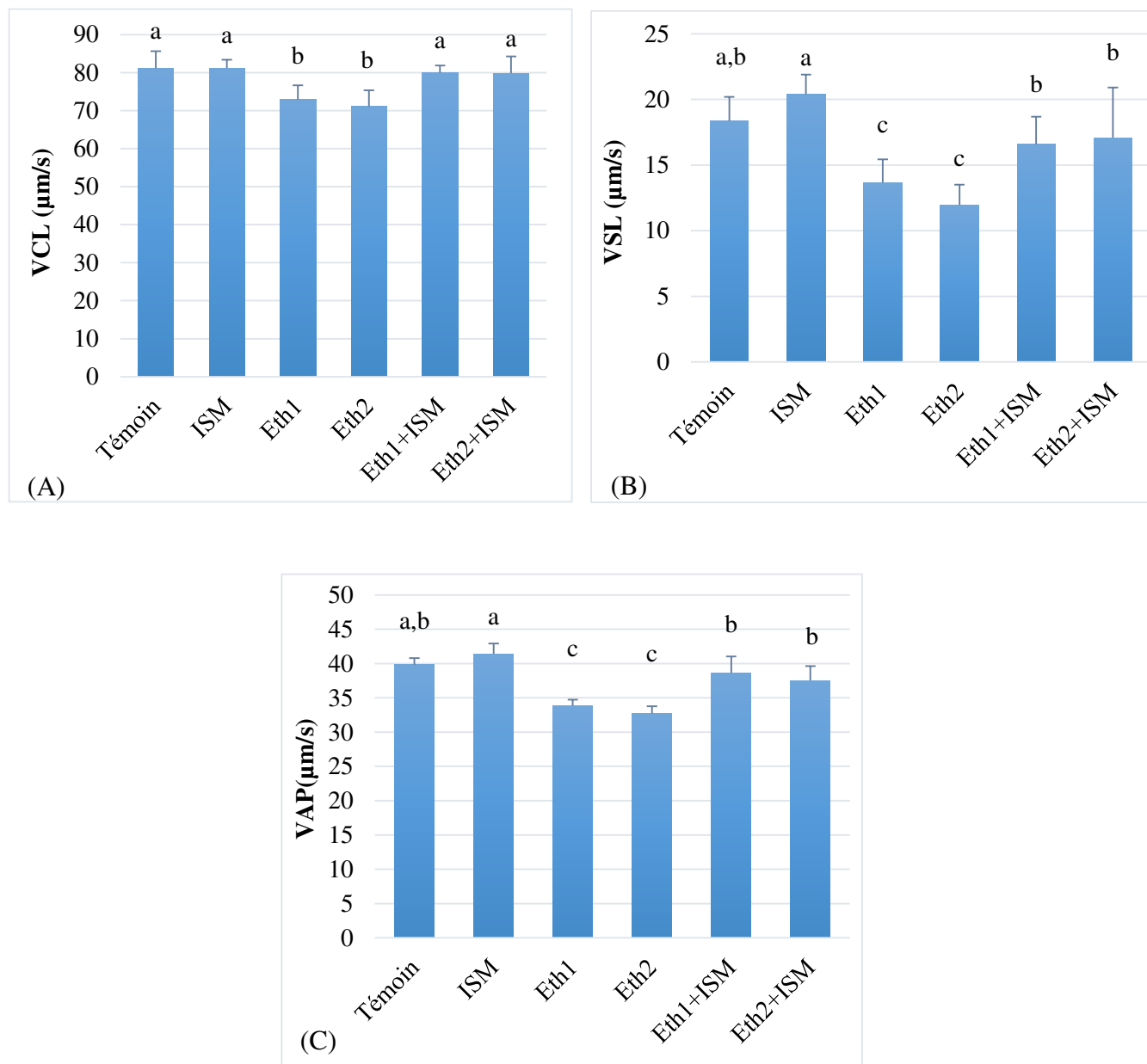


Figure 19 : les paramètres de vitesse chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement. (A): VCL “*curvilinear velocity*” ; (B): VSL “*straight-line velocity*” ; (C): VAP “*velocity average path*”.

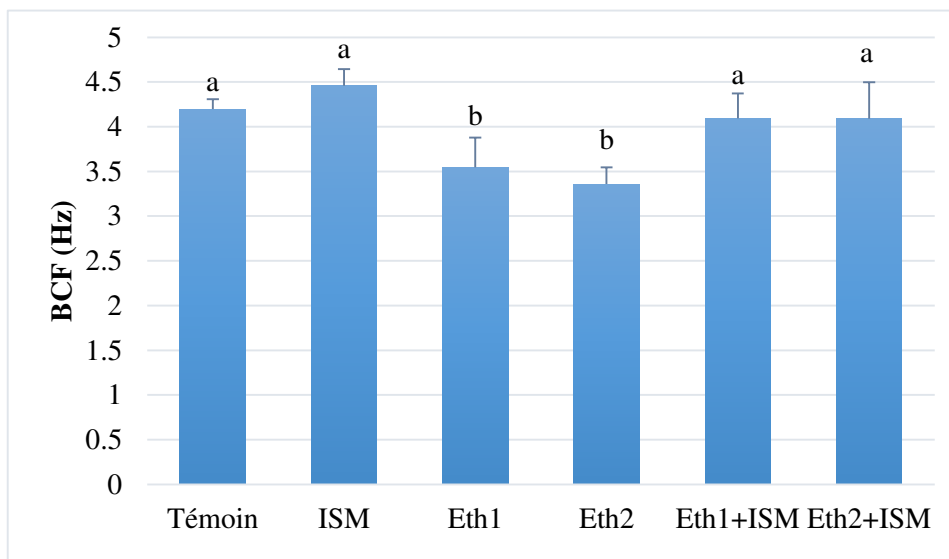


Figure 20 : Variation de la fréquence de croisement de la trajectoire (BCF) chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

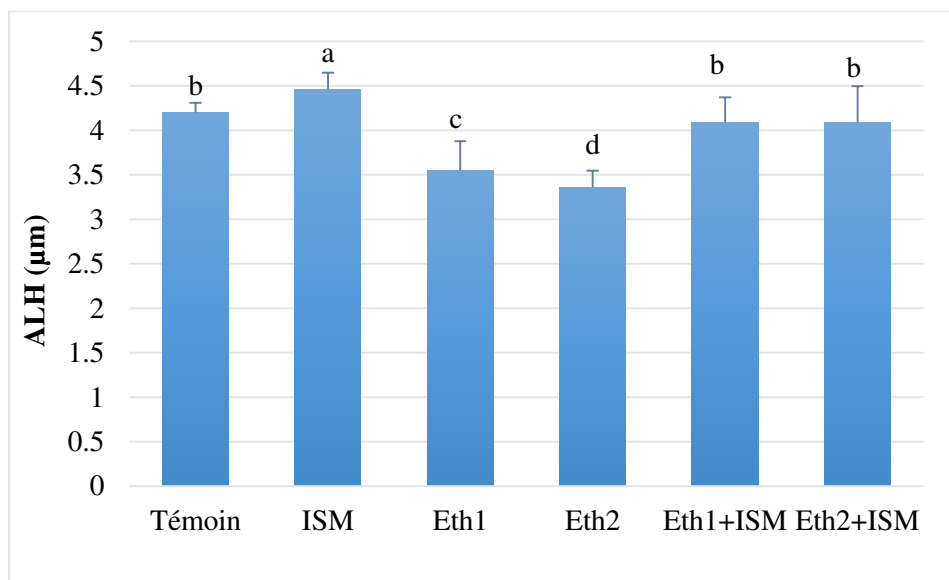


Figure 21 : Variation de l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

2-3- Variations de la concentration de testostérone

Les résultats montrent que la concentration de testostérone a été diminuée dans les groupes traités par l'éthanol par rapport aux autres groupes. Tandis que, les groupes combinés ont présenté une augmentation significative de la concentration de testostérone par rapport aux groupes Eth1 et Eth2, sans changement notable par rapport au groupe témoin (tableau 10, figure 22)

Tableau 10 : Les variations de la concentration de testostérone chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
T(ng/ml)	6.10±0.58 ^{ab}	6.84±0.41 ^a	4.15±0.83 ^c	3.13±0.45 ^c	5.70±0.67 ^b	5.55±0.59 ^b

*Les moyens ne partageant pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. T : testostérone ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

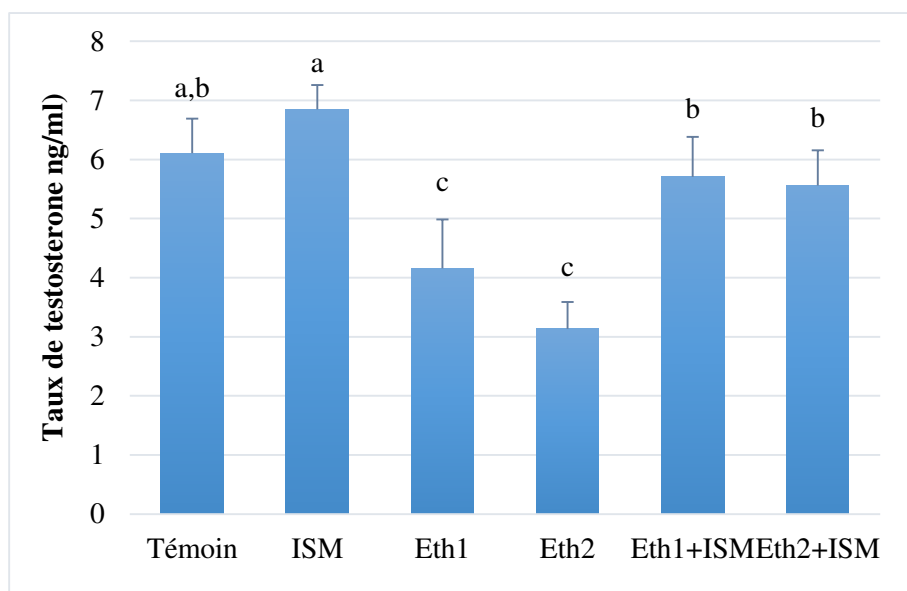


Figure 22 : Taux de testostérone (ng/ml) chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement

❖ Discussion

La mesure du poids corporel est un paramètre important dans les études toxicologiques car il évalue la croissance et l'état de santé générale des rats. Nos résultats montrent que le gavage oral de l'éthanol à 1g/kg et de 2 g/kg de poids corporel ainsi que de l'infusion des graines de *Silybum marianum* (ISM) à 200 mg/kg de poids corporel pendant 6 semaines n'ont induit aucun changement significatif par rapport au groupe témoin. Les mêmes résultats ont été observés chez les groupes de traitement combiné. Les résultats observés relèvent que le gavage oral de l'ISM et l'éthanol seul ou combiné avec l'ISM n'ont pas affecté la croissance physiologique des rats.

L'infertilité masculine est un problème clinique majeur dans l'andrologie. Environ 50% des couples passant de test de l'évaluation de l'infertilité sont diagnostiqués comme infertiles (**Sigman & Jarow, 2007**). Plusieurs facteurs liés au mode de vie, tels que le tabagisme, la consommation d'éthanol, l'obésité et le stress psychologique peuvent avoir un effet sur la fertilité masculine (**Sengupta et al., 2018**). La consommation d'éthanol est parmi les habitudes de style de vie qui devenue très courante dans le monde, bien qu'il existe de nombreuses études montrant que la consommation d'éthanol est associée aux dysfonctionnements de l'appareil reproducteur masculin.

Dans notre étude on a tenté de voir l'effet de la consommation de l'éthanol pendant six semaines successive sur les paramètres de la fonction reproductrice ainsi de démontrer la faisabilité de l'utilisation de l'infusion de graines de *Silybum marianum* comme agent préventif.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation montrent que le gavage oral de l'éthanol aux rats à 1g/kg et 2g/kg de poids corporel a provoqué une diminution significative de poids absolu des testicules et des épидидymes en comparant au groupe témoin et les autres groupes. Nos résultats s'harmonisent avec plusieurs autres études qui ont constaté une réduction de poids des organes de la reproduction en particulier les testicules et les épидидymes à cause de la consommation de l'éthanol dont celle de **Jin et al., (2018)** qui ont observé une réduction de poids des testicules et des épидидymes des rats après 28 jours de la consommation de 4g/kg de poids corporel de l'éthanol. **Saihia et al., (2015)** ont aussi observé une diminution de poids des testicules, et des épидидymes des lapins après 30 jours de la consommation de l'éthanol.

Il existe plusieurs mécanismes possibles par lesquels l'éthanol peut effectuer une telle altération du poids des testicules et de l'épididyme. **Maneesh et al., (2005)** ont reporté que l'ingestion de l'éthanol a provoqué certains changements dans le diamètre des tubules séminifères, l'apoptose des cellules germinales et l'atrophie testiculaire, ce qui provoque une diminution de poids de cet organe. Selon **Al-Bairuty et al., (2016)** l'ingestion de l'éthanol a induit des lésions pathologiques dans la structure de l'épididyme des rats et a conduit à une réduction de l'épaisseur des cellules épithéliales dans la tête et la queue des tubules épидидymaire, ainsi, a provoqué un élargissement de l'espace interstitiel. Cette altération structurale peut être le mécanisme par lequel l'éthanol réduit la masse épидидymaire. En outre, le fait que l'épididyme est le lieu de stockage des spermatozoïdes matures, la diminution du poids de cet organe induit par la consommation de l'éthanol peut être raisonnablement dû à la diminution de la concentration des spermatozoïdes. Cette suggestion peut être confirmée par nos résultats concernant la concentration des spermatozoïdes (figure 15, page 64), dont cette dernière a été diminuée significativement après la consommation de l'éthanol.

Plus intéressant, le fait que la taille des testicules est souvent corrélée avec les niveaux de testostérone (**Preston et al., 2012**), et que le maintien de la structure et de la fonction de l'épididyme aussi dépend de la testostérone (**Cameron, 2007**). La diminution du poids des organes reproducteurs pourrait être due à la notable diminution de la concentration plasmatique de testostérone après six semaines d'exposition de l'éthanol qui a été observée dans notre étude (figure 22, page 46).

En revanche, chez les groupes combinés (Eth1+ISM et Eth2+ISM), le poids des testicules et des épидидymes ont augmenté de manière significative en comparaison avec celle des groupes traités par l'éthanol (Eth1 et Eth2) avec aucun changement significatif en comparaison avec le groupe témoin. Ces résultats peuvent être justifiés par les fortes propriétés antioxydantes des composants de *Silybum marianum*, principalement la silymarine et la silybine le principal ingrédient actif de la silymarine. **Oufi et al., (2012)** dans leur étude ont montré que l'administration de la silybine l'un des isomères structuraux de la silymarine, a augmenté le diamètre des spermatozoïdes et des spermatozoïdes primaires des souris. De plus, **Moshtaghion et al., (2013)** ont trouvé que l'administration de la silymarine a protégé les testicules contre les dommages

induites par la varicocèle en conduisant à une augmentation significative dans les indices de spermatogenèse.

On outre, puisque le poids des testicules et des épидидymes sont souvent corrélées avec la concentration des spermatozoïdes et de la concentration de testostérone, la préservation de poids des testicules et des épидидymes par l'ISM contre les dommages de l'éthanol peut être due principalement à la préservation de la concentration des spermatozoïdes et de la concentration de testostérone par l'ISM ce qui est observé dans notre résultats (figure 15, page 40 ; figure 22, page 46).

Dans la présente étude l'administration de l'éthanol aux rats a montré une claire altération toxique dans les paramètres de biologie des spermatozoïdes, dont les résultats indiquent que la concentration et la vitalité des spermatozoïdes réduit significativement après le gavage oral de l'éthanol par les deux doses utilisé ainsi que la motilité totale, progressive et les paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP, BFC et ALH) ont été diminué. Des études ont démontré les effets délétères de l'éthanol qui provoque une diminution de la production de sperme, la qualité du sperme et ainsi la mobilité du sperme (Talebi *et al.*, 2011; Alirezai *et al.*, 2012; saihia *et al.*, 2015). De cette manière, il existe plusieurs explications possibles pour les résultats obtenus.

La concentration des spermatozoïdes réduite dans cette étude peut être attribuée en premier lieu au dysfonctionnement de la spermatogenèse induit par l'éthanol. Plusieurs études ont reporté que la consommation de l'éthanol a provoqué des perturbations et dysfonctionnement de la spermatogenèse, dont celle de Shayakhmetova *et al.*, (2014). Koh & Kim, (2006) ont démontré que l'une des mécanismes par la quelle éthanol provoque le dysfonctionnement de la spermatogenèse est via la diminution de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA). Ce dernier est une protéine de matrice nucléaire, qui est essentielle pour les multiples voies du cycle cellulaire y compris la réplication de l'ADN, réduite dans le cas de l'arrêt de la spermatogenèse (Tousson *et al.*, 2011). La diminution de (PCNA) réduit l'activité proliférative et la spermatogenèse (Koh et Kim, 2006), ce qui entraîne une diminution de la concentration des spermatozoïdes.

En addition, la diminution de la concentration et la vitalité des spermatozoïdes observée dans cette étude, pourrait être raisonnablement supposé au stress oxydatif induit par l'éthanol. Dont, il a été trouvé que l'éthanol provoque une augmentation dans les espèces réactives de

l'oxygène et la peroxydation des lipides (Saleh & Agarwal, 2002). Selon Abedi *et al.*, (2016), les radicaux libres induit par éthanol attaquent les cellules germinales dans les tissus testiculaires en produisant des altérations de la spermatogenèse et la nécrose, provoquant ensuite une diminution dans le nombre des spermatozoïdes. Dans le même contexte, le stress oxydatif est impliqué dans l'induction des mécanismes de l'apoptose, la peroxydation lipidique membranaire et la fragmentation de l'ADN déclenchant une altération de la fonction des spermatozoïdes (Lampiao *et al.*, 2013).

En ce qui concerne la réduction des paramètres de la mobilité, des études ont suggéré que c'est un signe d'échec dans l'acquisition et maintenance de la mobilité des spermatozoïdes causé par l'éthanol (El-Ashmawy *et al.*, 2007). Plus intéressant, comme le flagelle est la structure la plus importante pour le mouvement des spermatozoïdes, nos résultats peuvent être expliqués par l'effet de l'éthanol sur la morphologie du flagelle des spermatozoïdes. Cette explication pourrait être soutenue par l'étude de Sadighi Gilani & Sadighi Gilani (1998), dans laquelle les auteurs ont rapporté que la morphologie normale des flagelles de sperme a une corrélation importante avec l'augmentation ou la diminution de la mobilité des spermatozoïdes. D'un autre côté, notre explication pourrait être confirmée par l'étude de Muthusami & Chinnaswamy (2005), dans laquelle les auteurs dans leur étude ont montré que l'administration de l'éthanol a augmenté le nombre des spermatozoïdes avec des flagelles anormaux.

En effet, la mobilité des spermatozoïdes, les paramètres de vitesse (VCL, VSL, VAP) la fréquence de croisement de la trajectoire (BCF) et l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) reflète à la fonction de la mitochondrie et la production de l'énergie sous forme d'ATP. A la lumière que les spermatozoïdes sont sensibles aux dommages causés par l'excès d'oxygène réactif et le développement de stress oxydatif à cause de taux élevés des acides gras polyinsaturés dans le plasma membranaire et la faible concentration des enzymes antioxydants dans le cytoplasme (Heidari Khoei *et al.*, 2019). L'explication probable des effets délétères de l'éthanol sur la mobilité des spermatozoïdes est l'augmentation des stress oxydatif et les radicaux libres qu'ils provoquent un dysfonctionnement de la fonction mitochondriale ce qui conduit à la diminution de l'énergie nécessaire pour les mouvements des flagelles.

En addition, l'altération des paramètres de biologie des spermatozoïdes observée dans notre étude, pourrait être attribuée à la réduction des niveaux de testostérone que nous avons trouvée

après l'administration d'éthanol comme nous l'avons mentionné précédemment (figure 22, page 46), comme il est l'hormone sexuelle masculine l'essentielle qui maintien et contrôle l'action de diverses fonctions en particulier le maintien de spermatogenèse (**Smith & Walker, 2014**) et le maintien de la fonction de l'épididyme (**Cameron, 2007**).

En revanche, l'infusion des graines de *Silybum marianum* a remarquablement protégé les paramètres biologiques des spermatozoïdes de la toxicité induit de l'éthanol, dont les résultats montre que la concentration, la vitalité, la motilité totale, mobilité progressive et les paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP, BCF et ALH) ont été augmenté de manière significative en comparant avec celle des rats traités par l'éthanol (Eth1 et Eth2), avec aucun changement significative en comparaison avec le groupe témoin.

Certaines études ont montré l'effet bénéfique de la silymarine et de la silybine pour les caractéristiques des fonctions des spermatozoïdes. **Attia et al., (2017)** ont rapporté que nourrir des lapins avec le supplément des gains de *S.marianum* à 5 et 10 g / kg de régime basal a amélioré significativement la qualité du sperme et la fertilité des lapins. **Fatehi et al., (2018)** ont mentionné que la silymarine a réussi de protéger les spermatocytes normaux contre les dommages cellulaires induits par les rayonnements γ .

Le mécanisme par lequel l'ISM a protégé les paramètres biologiques des spermatozoïdes de la toxicité induit par l'éthanol peut être attribuée aux propriétés antioxydantes de la silymarine, en éliminant les ERO et en inhibant la peroxydation des lipides (**Yaman et al., 2018**). Il a été rapporté que la silymarine a la capacité de sauver la cellule contre l'apoptose en réduisant le stress oxydatif (**Adhikari et al., 2013**), ce qui augmente cependant la concentration et la vitalité des spermatozoïdes. De plus, selon **Surai, (2015)** la silymarine et la silybin ont été prouvé d'avoir la capacité de protéger l'intégrité de la mitochondrie. Cette dernière est l'unité essentielle qui produit l'énergie pour le mouvement des flagelles, ce qui améliore la motilité et la vitalité des spermatozoïdes.

Dans l'étude actuelle, l'analyse statistique montre une diminution significative de la concentration plasmatique de la testostérone chez les rats traités par les deux doses d'éthanol par rapport au groupe témoin. Nos résultats concernant la diminution de l'hormone sexuelle male rejoignent plusieurs autres études antérieures. **Saihia et al., (2015)** ont observé une diminution de la concentration de testostérone chez lapins après 30 jours de la consommation de l'éthanol. **Jin et**

al., (2018) ont aussi constaté une réduction de la concentration de testostérone chez les rats après 28 jours de la consommation de 4g/kg de poids corporel de l'éthanol.

Vu que les cellules de Leydig sont responsables de la production de testostérone dans les testicules des mammifères (Oh, 2014), la diminution de la concentration de testostérone observée dans cette étude peut être due principalement à l'effet toxique de l'éthanol sur les cellules de Leydig. Plusieurs études ont montré que la consommation de l'éthanol provoque des dysfonctionnements des cellules de Leydig (Giannessi *et al.*, 2008 ; Uygur *et al.*, 2014).

En outre, la diminution de la concentration de testostérone observée dans cette étude peut être due à l'augmentation des niveaux d'hormones cortisol qui conduisait à une inhibition de la production et de la libération de testostérone dans les testicules sous l'effet de l'éthanol (Venkat *et al.*, 2009). De plus, Muthusami et Chinnaswamy, (2005) ont suggère que l'éthanol pourrait renforcer la conversion des androgènes en œstrogènes par l'aromatase, conduisant à la diminution de la concentration de testostérone.

La diminution de la concentration plasmatique de testostérone a été rectifiée par l'administration de l'ISM chez Eth1+ISM et Eth2+ISM, dont nous avons observé chez ces groupes une augmentation significative de la concentration plasmatique de testostérone par rapport aux groupes traités par l'éthanol avec aucun changement notable par rapport au groupe témoin. Selon Oufi *et al.*, (2012), l'administration de la silybine chez les rats a entraîné une augmentation significativement de la concentration de testostérone. De même, Abedi *et al.*, (2016) ont observé les mêmes résultats chez les rats en administrant de la silymarin.

Selon Khalil, (2003), le mécanisme par lesquels les graines de *Silybum marianum* peuvent augmenter la concentration testostérone est que la propriété de silymarine qui réagit comme un inhibiteur de l'aromatase en bloquant la conversion des androgènes en œstrogènes, ce qui amène l'hormone à son niveau normal. De plus, il été rapporté que la silybine peut stimuler la fonction des cellules de Leydig pour augmenter la production de testostérone (Oufi *et al.*, 2012).

II- L'effet de l'éthanol sur la fonction hépatique et rénale : l'effet protecteur de *Silybum marianum*

❖ Résultats

1- Variation du poids absolu de foie et des reins

La figure (23) montre les variations des poids absolu du foie et des reins, dont les résultats montrent une augmentation significative du poids de foie chez les rats des groupes Eth1 et Eth2 en comparant avec les autres groupes. Ainsi, les résultats montrent une diminution significative du poids des reins chez le groupe Eth2 par rapport aux autres groupes, tandis que les rats de groupe Eth1 ne montrent aucun changement des poids des reins par rapport aux autres groupes.

Cependant, les résultats révèlent que le traitement des rats par l'infusion des graines de *Silybum marianum* chez les groupes combinés (Eth1+ISM and Eth2+ ISM) ne montre aucun changement significatif dans le poids absolu de foie et reins en comparant avec le groupe témoin. Les résultats mentionnés au-dessus ont été résumés dans le tableau 11.

Tableau 11: Les variations des poids absolu du foie et des reins chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
Foie (g)	8.09±0.311 ^b	8.08±0.438 ^b	8.94±0.327 ^a	9.21±0.348 ^a	7.91±0.409 ^b	7.96±0.688 ^b
Reins (g)	0.86±0.03 ^{a,b}	0.89±0.038 ^a	0.81±0.050 ^{b,c}	0.760±0.029 ^c	0.83±0.046 ^{a,b}	0.844±0.045 ^{a,b}

*Les moyens ne partageant pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol

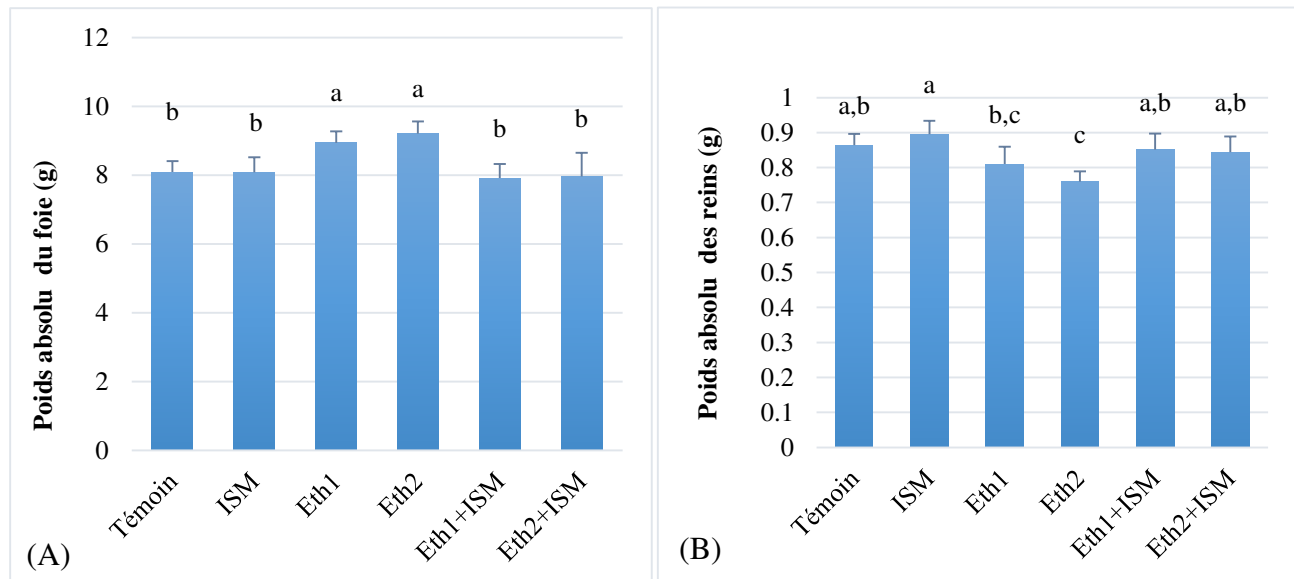


Figure 23 : Les variations des poids absolu du foie (A) et des reins (B) chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement

2- Variation des paramètres biochimiques

Afin d'évaluer l'influence de traitement sur la fonction hépatique et rénale, nous avons dosés quelque paramètre biochimique.

2-1- Effet sur l'activité des transaminases et phosphatase alcaline

Les variations de l'activité des transaminases et phosphatase alcaline ont été illustré dans le tableau 12, figure 24. D'après les résultats obtenus, nous avons observé une augmentation notable de l'activité enzymatique d'alanine transaminase, aspartate amino transférase et de phosphatase alcaline chez les deux groupes traités par l'éthanol par rapport aux autres groupes. En revanche, les groupes combinés (Eth1+ISM, Eth2+ISM) ont gardé la même valeur d'ALT, AST et PAL comme celle de groupe témoin.

Tableau 12: Les variations de l'activité des transaminases et phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
ALT (UI/L)	190.47±3.9 ^b	175.62±8.32 ^b	207.49±7.87 a	212.04±6.09 a	182.63±17.37 b	186.25±3.09 b
AST (UI/L)	34.60±7.75 ^b	29.50±0.43 ^b	41.23±1.49 ^a	41.71±2.08 ^a	30.81±1.60 ^b	32.23±1.66 ^b
PAL (UI/L)	105.67±13.05 b	91.83±10.36 ^b	144.00±4.52 a	153.50±5.92 a	97.92±6.14 ^b	101.00±4.9 ^b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. ALT : alanine transaminase ; AST : aspartate amino transférase ; PAL : phosphatase alcaline ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

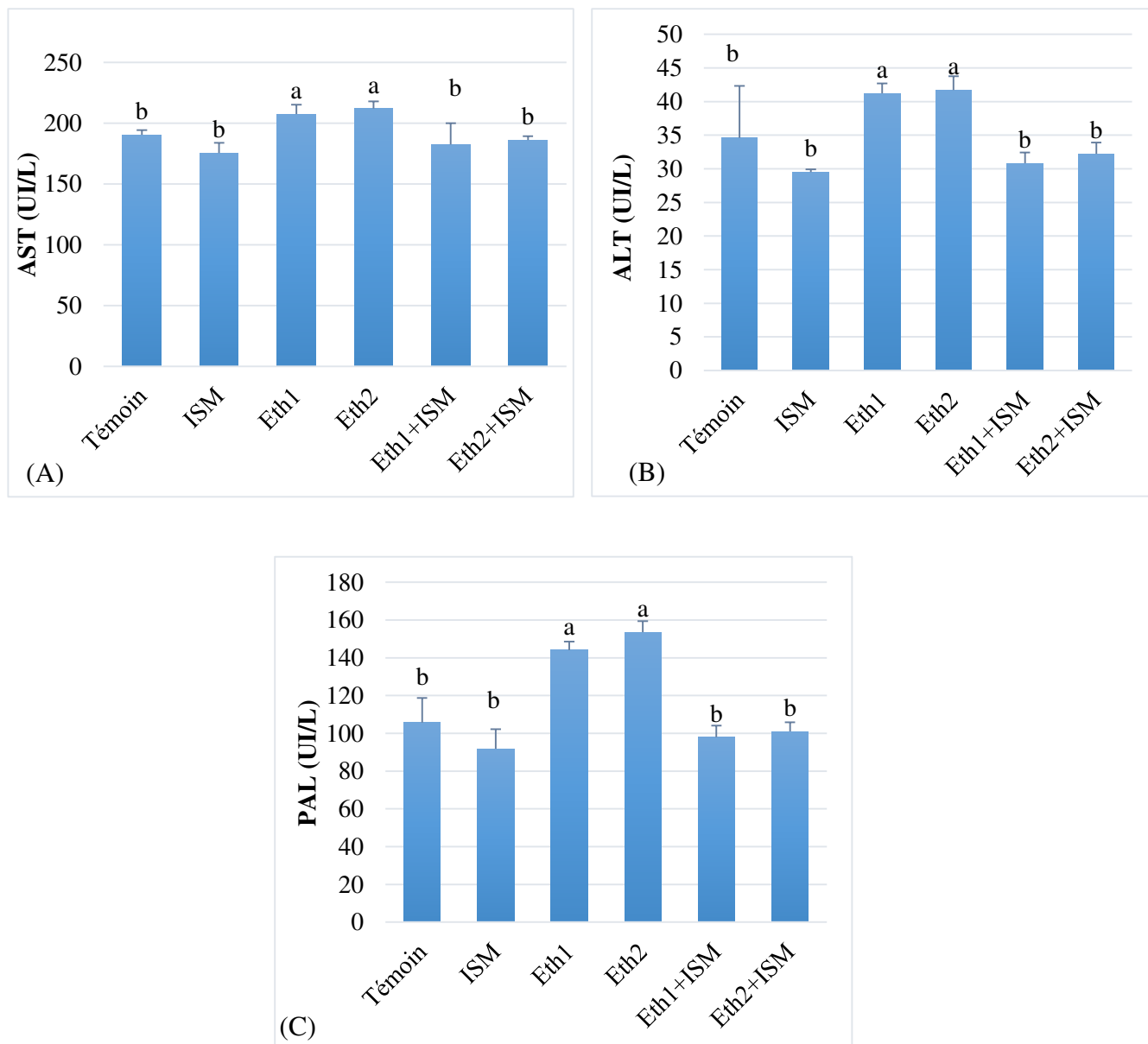


Figure 24: Variation de l'activité enzymatique chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement ; (A) : Activité enzymatique d'alanine transaminase (ALT), (B) : Activité enzymatique d'aspartate amino transférase (AST), (C) : Activité enzymatique d'alkaline phosphatase (PAL)

2-2- Effet sur le bilan lipidique

Les variations de bilan lipidique après six semaines de traitement ont été aussi évaluées.

D'après les résultats obtenus, le gavage orale de l'éthanol par les deux doses utilisé dans cette étude a provoqué des troubles dans le bilan lipidique caractérisé par une augmentation de taux de cholestérol, des triglycérides et de taux des lipoprotéines de densité légère (LDL) avec une diminution des taux des lipoprotéines à haute densité (HDL) chez les rat qu'ont été traite par l'éthanol (figure 25).

Cependant, l'administration de l'ISM avec l'éthanol a réussie à prévenir les troubles induit par l'éthanol, dont nous n'avons observé aucun changement significatifs des paramètres cité au-dessus chez les groupes Eth1+ISM et Eth2+ISM par rapport au groupe témoin.

Tableau 13: Les variations de bilan lipidique chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M \pm SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
CT (g/l)	0.59 \pm 0.06 ^b	0.58 \pm 0.02 ^b	0.69 \pm 0.04 ^a	0.77 \pm 0.05 ^a	0.59 \pm 0.05 ^b	0.60 \pm 0.05 ^b
TG (g/l)	0.86 \pm 0.027 ^{b,c}	0.78 \pm 0.073 ^c	0.94 \pm 0.029 ^{a,b}	1.04 \pm 0.060 ^a	0.79 \pm 0.072 ^c	0.80 \pm 0.061 ^c
LDL (g/l)	0.10 \pm 0.018 ^{b,c}	0.09 \pm 0.020 ^c	0.14 \pm 0.018 ^{a,b}	0.15 \pm 0.023 ^a	0.11 \pm 0.018 ^{b,c}	0.11 \pm 0.017 ^{b,c}
HDL (g/l)	0.37 \pm 0.019 ^{a,b}	0.39 \pm 0.013 ^a	0.26 \pm 0.035 ^c	0.26 \pm 0.040 ^c	0.32 \pm 0.031 ^b	0.32 \pm 0.031 ^b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. CT : cholestérol Total ; TG : triglycéride ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

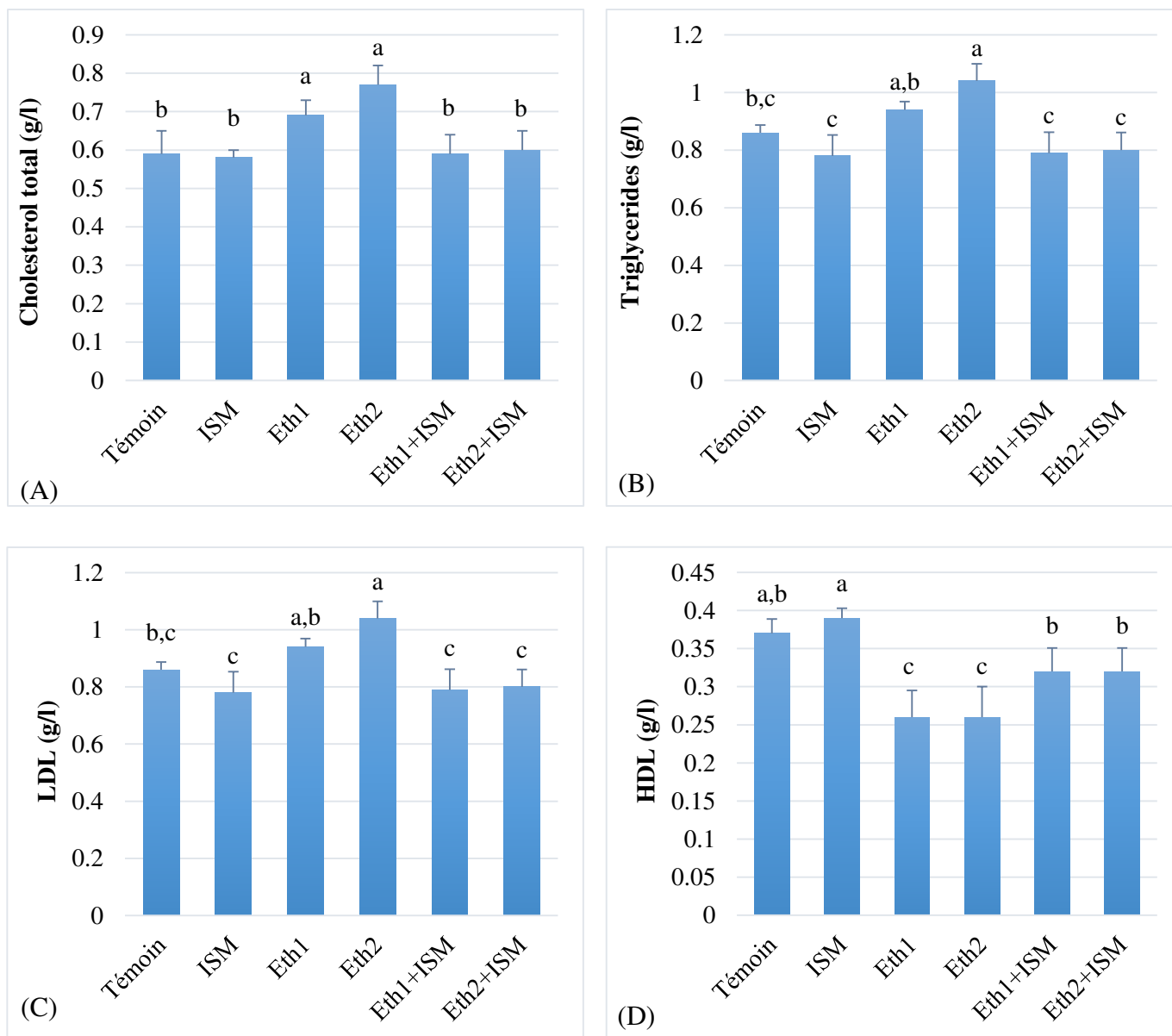


Figure 25 : Variation de bilan lipidique chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement ; (A) : taux de cholestérol total, (B) : concentration de Triglycérides, (C) : taux de LDL, (D) : taux de HDL.

3- Effet sur le bilan rénal

Les variations du bilan rénal ont été illustré dans le tableau 14, figure 26

Nos résultats montrent une augmentation significative dans le taux d'urée chez les rat de groupe Eth1 et le groupe Eth2 et une augmentation significatif de créatinine chez les rats de groupe Eth2 par rapport au groupe témoin et aux autre groupes (figure 26). Tandis que, nous n'avons observé aucuns changements significatifs dans le taux d'urée et de créatinine chez le groupes Eth1+ISM et Eth2+ISM par rapport au groupe témoin.

Tableau 14: Les variations de bilan rénal chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme $M \pm SD$, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
Créa (mg/l)	4.43±0.35 ^b	4.14±0.11 ^c	4.66±0.18 ^{a,b}	4.88±0.19 ^a	4.33±0.22 ^{b,c}	4.42±0.29 ^{b,c}
Urée (g/l)	0.48±0.03 ^b	0.41±0.01 ^c	0.58±0.05 ^a	0.63±0.02 ^a	0.48±0.04 ^{b,c}	0.49±0.03 ^b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. Créa : Créatinine ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

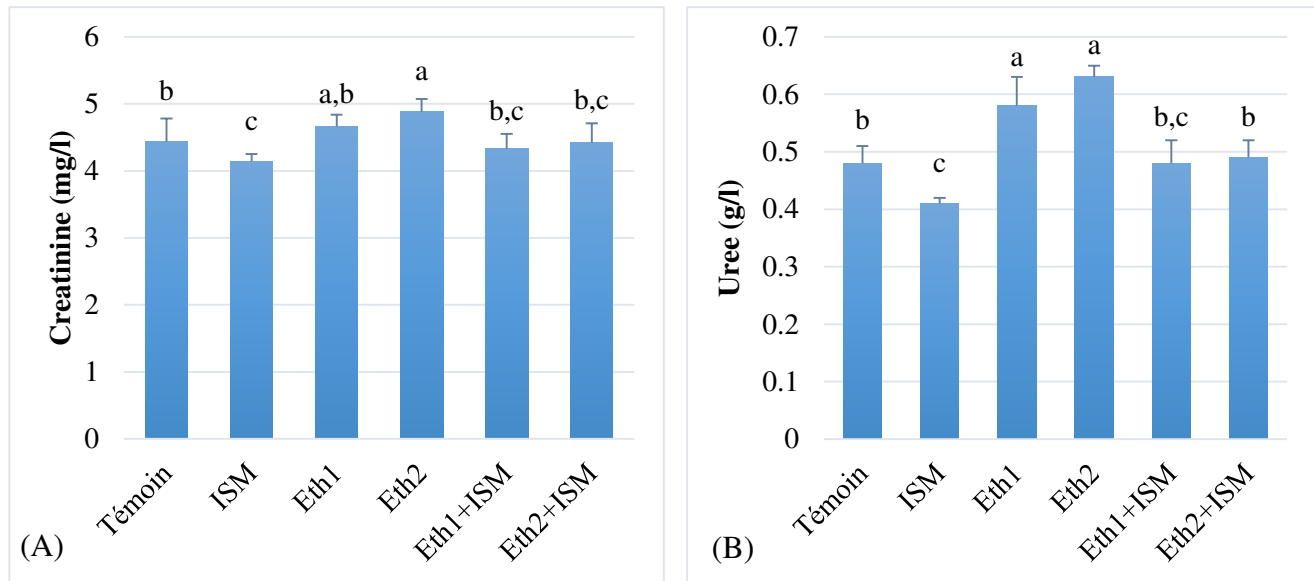


Figure 26 : Variation de bilan rénal chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement ; (A) : taux de créatinine, (B) : taux d'urée

❖ Discussion

Le foie et les reins ont un rôle extrêmement important dans la détoxification et l'excrétion des déchets métaboliques et des xénobiotiques (Kaneko *et al.*, 1999), Ce qui les rend les organes les plus sensibles aux dommages induits par les xénobiotiques, particulièrement, l'éthanol.

Dans la présente étude, nous avons tenté d'évaluer le rôle améliorateur de l'infusion des graines de *Silybum marianum* contre la toxicité induit par l'éthanol dans le foie et les reins des rats à travers l'évaluation des marqueurs biochimiques de ces organes. D'après nos résultats, traité les rats avec l'éthanol à raison de 1g/kg et 2 g/kg de poids corporel pendant 6 semaines a entraînée des perturbations au niveau des paramètres liée à la fonction hépatique et rénal. Tandis que, la co-administration de l'infusion des graines de *Silybum marianum* a réussi à prévenir cette induite perturbation.

Le foie joue de nombreux rôles clés dans les fonctions métaboliques. Le fait que 80% de l'éthanol absorbé est métabolisé par le foie, le rend l'organe le plus sensible à la toxicité de l'éthanol.

Nos résultats ont montré une augmentation de la masse hépatique chez les groupes traités à l'éthanol. Les résultats obtenus concordent avec plusieurs autres études dont celle **Feng et al., (2019)**, qui ont supposé que cette augmentation de la masse hépatique est possiblement expliquée par l'accumulation de lipides dans le foie due à l'exposition à l'éthanol. Cette explication peut être confirmée par d'autres études antérieures, dont celle de **Wang et al., (2015)** qui ont montré que la consommation de l'éthanol a provoqué une grave accumulation de lipides dans le foie.

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme lipidique et le maintien de l'homéostasie lipidique dans l'organisme. L'homéostasie lipidique est contrôlée par une cascade de processus qui maintient les pools de lipides hépatiques relativement constants et toute perturbation de l'un de ces processus peut entraîner une accumulation de lipides dans le foie (**You & Arteel, 2019**). Il a été rapporté que l'éthanol est l'unique parmi les toxines, qu'il perturbe presque tous les aspects du métabolisme des lipides hépatiques (**You & Arteel, 2019**).

Dans cette étude, les résultats ont montré que le gavage oral d'éthanol par les deux doses a perturbé le profil lipidique sérique caractérisé par, une augmentation du cholestérol total (TC), des triglycérides (TG) et des taux de des lipoprotéines de densité légère (LDL) avec une diminution des taux des lipoprotéines à haute densité (HDL) chez les rats traités par l'éthanol en comparaison avec le groupe témoin et le reste des groupes de cette expérience.

Les résultats obtenus chez les groupes traités à l'éthanol concordent avec plusieurs autres études. **Kamoun et al., (2017)** ont trouvé que, traité les rats avec une solution d'éthanol à 30% à une dose de 3 g / kg pendant 15 jours a provoqué une augmentation des taux plasmatiques de TC, des TG et LDL avec une diminution HDL.

L'augmentation du cholestérol sérique après la consommation de l'éthanol dans cette étude peut être expliquée par la diminution de l'expression du gène du récepteur LDL (LDLr) et l'abondance des protéines dans le foie comme a été rapporté par **Wang et al., (2010)**. Du même coup, le fait que LDL-LDLr est responsable d'éliminer environ 70% des LDL de la circulation (**Goldstein & Brown, 2009**), l'augmentation du taux de LDL sérique dans cette étude pourrait être également dû à la diminution du LDLr.

En ce qui concerne l'augmentation de taux des triglycérides sérique dans cette étude, **Maralla et al., (2012)** ont déclaré que la consommation d'alcool pouvait entraîner une réduction de triglycéride lipase et de la lipoprotéine lipase hépatiques, qui à leur tour, entraînent une

diminution de l'élimination des triglycérides du plasma, ce qui entraîne une élévation de taux des triglycérides. En ce que concerne la réduction de taux de HDL, dans la même étude de **Maralla et al., (2012)**, ils ont rapporté que la réduction du taux sérique de HDL pourrait être dû à une hypertriglycéridémie induite par un métabolite réactif formé lors de la biotransformation.

En revanche, nos résultats n'ont montré aucun changement de la masse hépatique chez les rats qui ont été traités par l'éthanol en concomitance avec d'ISM (Eth1 + ISM et Eth2 + ISM). De même, les groupes combinés ont gardé le niveau normal de taux de TC, TG, LDL et HDL comme celui de groupe témoin. Une explication possible des résultats obtenu, est que l'infusion des graines de *Silybum marianum* à interdire l'accumulation de lipides dans le foie qui été induite par l'exposition à l'éthanol.

Le *S.marianum* est connu d'avoir une gamme d'avantages potentiels pour la santé en raison de ses ingrédients actifs. Le silybin ou bien, la silibinin, été démontré d'avoir un effet inhibiteur sur l'accumulation de lipides (**Suh et al., 2015**). Dont, il a été démontré que le silybin régule la LIPIN1 ; une enzyme majeure dans la voie de synthèse des triglycérides, et l'acides gras synthase (FASN) ; une enzyme importante impliqué dans la synthèse des triglycérides et la synthèse des acides gras par la suppression de l'expression des deux protéines (**Suh et al., 2015**). Plus intéressant, il a été rapporté que le silybin a un effet anti-adipogène, qui est associé à une régulation positive des protéines gène induit par l'insuline (INSIG), les inhibiteurs de la transcription de la protéine-1c de liaison de l'élément régulateur Sterol (SREBP1-c) (**Ka et al., 2009**). SREBP-1c est un facteur de transcription essentiel, stimulé l'expression des gènes de synthèse lipidique, dont l'acides gras synthase (SAF), la stéaroyl CoA désaturase 1 (SCD1) (**Raghow et al., 2008**). SREBP-1c stimule par l'exposition à l'alcool entraînant une stéatose hépatique (**You et al., 2002**). Ces circonstances pourraient expliquer le mécanisme par lequel l'infusion des graines de *Silybum marianum* a rétabli le poids de foie et du profil lipidique au ces niveau normal dans cette étude.

La mesure des aminotransférases (l'AST et l'ALT) et de phosphatase alcaline (PAL) sériques a été couramment utilisée comme marqueur fiable pour l'évaluation de l'hépatotoxicité (**Sun et al., 2014**). Dans cette étude, nous avons trouvé que le gavage oral d'éthanol a provoqué une augmentation remarquable de l'activité enzymatique d'alanine transaminase (ALT), aspartate amino transférase (AST), et phosphatase alcaline (PAL).

Les aminotransférases sont distribuées dans plusieurs organes différents, et jouent un rôle important dans les voies métaboliques des glucides et des acides aminés (Al-Ghanim, 2014). Tandis que l'ALT est une enzyme du cytosol, considéré comme le marqueur le plus spécifique des lésions hépatiques, L'AST est principalement une enzyme mitochondriale qui se trouve également dans le cœur, les muscles, les reins et le cerveau (Dasgupta, 2015). Les activités des aminotransférases ont été prouvés pour changer dans plusieurs circonstances physiologiques et pathologiques (Al-Ghanim, 2014). Particulièrement, les activités sériques de l'aspartate aminotransférase et de l'alanine aminotransférase se sont révélées être élevées dans le cas où l'intégrité des cellules hépatiques était affectée (Nallagangula *et al.*, 2017).

La phosphatase alcaline est situé dans la membrane canaliculaire et sinusoidale du foie, c'est une enzyme marqueur de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique des tissus (Dasgupta, 2015). Le PAL peut être libéré dans le sang lorsque les cellules hépatiques parenchymateuses étaient principalement affectées (Carl *et al.*, 2012).

Nos résultats concernant l'augmentation l'activité enzymatique d'ALT, AST, et PAL s'harmonise avec Wang *et al.*, (2018) qui a montré que la consommation d'alcool a induit avec succès des dommages au foie remarqué par une élévation du taux sérique d'ALT, AST et PAL. Du même, El-Newary *et al.*, (2017) ont trouvé que traité les rats avec 40% de l'éthanol pendant 21 jours a entraîné une augmentation des taux de ALT, AST et PAL. Comme ceci, l'augmentation observée, dans la présente étude, indique que les deux doses d'éthanol induire des dommages au foie.

Inversement, dans l'étude actuelle, la co-administration de l'infusion des graines de *Silybum marianum* (ISM) en concomitance avec l'éthanol a atténué les dommages au foie induits par l'éthanol. Dans lequel, les groupes combinés ont montré une diminution des taux sériques d'ALT, d'AST et de PAL par rapport aux groupes traités à l'éthanol. Ces résultats sont en harmonie avec les recherches précédentes qui ont documenté la capacité de *Silybum marianum* ou l'un de ses composés à réduire le taux élevées de ALT, AST et PAL induites par différents xénobiotiques (Heidarian & Nouri, 2019; Zaki *et al.*, 2019). Nos résultats pourraient indiquer que l'ISM a arrêté la fuite de ces enzymes dans le plasma. Il a été reporté que la silymarine régule la perméabilité des membranes et augmente la stabilité des membranes en présence de dommages xénobiotiques (Abenavoli *et al.*, 2010). De plus, la silymarine a été trouvée pour stimuler l'enzyme ARN

polymérase dans le noyau des cellules hépatiques conduisant à l'augmentation de la synthèse des protéines ribosomales et à la régénération des hépatocytes (**Bahmani et al., 2015**).

Bien que la plupart de l'éthanol soit métabolisé dans le foie, les reins sont aussi importants dans le métabolisme et l'excrétion de l'éthanol ce que les rend aussi un organe susceptible à la toxicité de l'éthanol. L'urée et la créatinine sont les principaux produits du métabolisme des protéines libérés dans le sang et éliminés par les reins. L'urée et la créatinine sont un bon indice pour tester le fonctionnement normal des reins et l'augmentation de ces substances dans le sérum est un indicateur de dysfonctionnement rénal (**Kamal, 2014**).

Dans l'étude actuelle, les rats exposés à l'éthanol (Eth1 et Eth2) avaient des niveaux d'urée élevés. Cependant, le niveau de créatinine a augmenté dans Eth2 mais pas dans Eth1 par rapport au groupe témoin. De la même façon, les résultats ont montré une diminution significative du poids des reins chez le groupe Eth2 par rapport aux autres groupes. Première des choses qu'on doit mettre en considération, ce que nos résultats indiquent que l'éthanol, dans cette étude, a réagi d'une façon dose dépendant. Cette observation est en accord avec des études précédentes dont celle de **Saihia et al., 2014**.

L'élévation marquée des taux sériques d'urée et de créatinine après l'administration d'éthanol est en accord avec les résultats obtenus par d'autres chercheurs utilisant des différentes doses d'éthanol et des différents modèles d'animaux d'expérimentation (**Maralla et al, 2012; Saihia et al., 2014 ; Bulle et al., 2016**).

Plusieurs mécanismes potentiels par lesquels l'éthanol peut affecter directement ou indirectement les fonctions rénales ont été suggérés (**Varga et al., 2017**). Il a été signalé que la consommation chronique d'alcool induit des lésions profondes dans plusieurs organes qui, à leur tour, peuvent affecter et aggraver l'effet délétère de l'éthanol sur les reins (**Varga et al., 2017**). Cependant, l'une des façons par laquelle l'éthanol peut interférer directement avec la fonction rénale consiste à modifier la forme et la structure de cet organe. Selon **Latchoumycandane et al., (2014)** la filtration rénale ainsi que l'architecture des tissus rénaux ont été modifiées après la consommation d'éthanol. De même, **Bulle et al., (2016)** dans leur étude ont remarqué que la filtration rénale était réduite après la consommation d'éthanol accompagnée d'une augmentation de l'urée et de la créatinine dans la circulation. De plus, le stress oxydatif induit par l'éthanol a été suggéré comme l'un des mécanismes associés aux lésions rénales provoquées par l'éthanol (**Varga**

et al., 2017). De la même façon, il a été déclaré que l'abondance des acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans les lipides rénaux rend la membrane du tissu rénal sans défense contre les espèces réactives de l'oxygène induites par le stress oxydatif (**Rodrigo & Rivera, 2002**).

En revanche, les rats qui ont traités simultanément avec l'éthanol et l'ISM (Eth1 + SMI et Eth2 + SMI) ont gardé le niveau normal d'urée et de créatinine et même le poids des reins comme celui du témoin, tandis que le témoin positif (ISM) a montré le plus bas niveau d'urée et de créatinine. **Salama et al.**, (2015) ont déclaré que l'alimentation de l'extraction de *Silybum marianum* aux rats traités à l'éthanol a réussi à maintenir les niveaux des paramètres cités au niveau normal. Dans ce cas, les résultats observés pourraient être dû à l'effet du principal composé d'extrait de *Silybum marianum*, la Silymarine. Il a été documenté que la silymarine peut avoir un potentiel thérapeutique pour le traitement de la néphropathie en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes dans les reins et en réparant la morphologie rénale (**Hamza et al.**, 2015).

IV- L'effet de l'éthanol sur les paramètres hématologiques : l'effet protecteur de *Silybum marianum*

❖ Résultats

Dis que le profil hématologique est l'un des paramètres les plus sensibles pour évaluer la toxicité des xénobiotiques et des médicaments chez les humains et les animaux. Nous avons aussi évalués Influence du traitement paramètres hématologiques.

Nos résultats révèlent que le gavage oral de l'éthanol à raison de 1g/kg et 2g/kg de poids corporel pendant six semaines a affecté les paramètres hématologiques. Comme été illustré dans le tableau 15, et la figure 27: nous avons observé une diminution significative des nombres des globules rouges, de l'hémoglobine, d'hématocrite et des plaquettes chez les groupes Eth1 et Eth2 par rapport aux autres groupes. Nous avons observé aussi une augmentation significative des globules blancs toujours chez les groupes Eth1 et Eth2 par rapport au groupe témoin.

Cependant, les résultats révèlent que le traitement des rats par l'infusion des graines de *Silybum marianum* chez les groupes combinés (Eth1+ISM and Eth2+ ISM) a réussi à prévenir la toxicité de l'éthanol, dont nos résultats ne montrent aucun changement significatif dans les paramètres hématologique par rapport avec le groupe témoin.

Les résultats motionne au-dessus ont été résume dans le tableau 15 et illustré dans la figure 27.

Tableau 15 : Les variations des paramètres hématologique chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	SMI	Eth1	Eth2	Eth1+SMI	Eth2+SMI
GR(10⁶/m³)	9.48±0.28 5 ^a	9.55±0.135 7 ^a	8.96±0.086 9 ^b	8.52±0.429 c	9.516±0.216 7 ^a	9.34±0.128 4 ^{a,b}
Hb (g/L)	147.17±4. 26 ^a	148.17±3.5 4 ^a	138.16±2.4 01 ^b	136.00±3.7 4 ^b	147.333±2.3 38 ^a	146.00±5.2 5 ^a
Hct (%)	43.96±0.9 29 ^a	44.56±0.92 3 ^a	38.95±2.47 b	39.73±1.72 3 ^b	44.25±0.643 a	43.65±0.46 7 ^a
PLT(10³/m³)	776.8±115 .1 ^a	799.8±98.5 a	579.5±76.9 b	528.8±76.2 b	768.5±85.3 ^a	749.2±39.0 a
GB(10³/mm³)	9.33±0.49 0 ^b	8.87±0.430 b	12.75±1.35 4 ^a	13.34±2.26 2 ^a	9.48±0.534 ^b	9.57±0.448 b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. GB : Globules Rouges ; Hb : Hémoglobine ; Hct : Hématocrite ; PLT : Plaquette ; GB : Globule Blancs ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

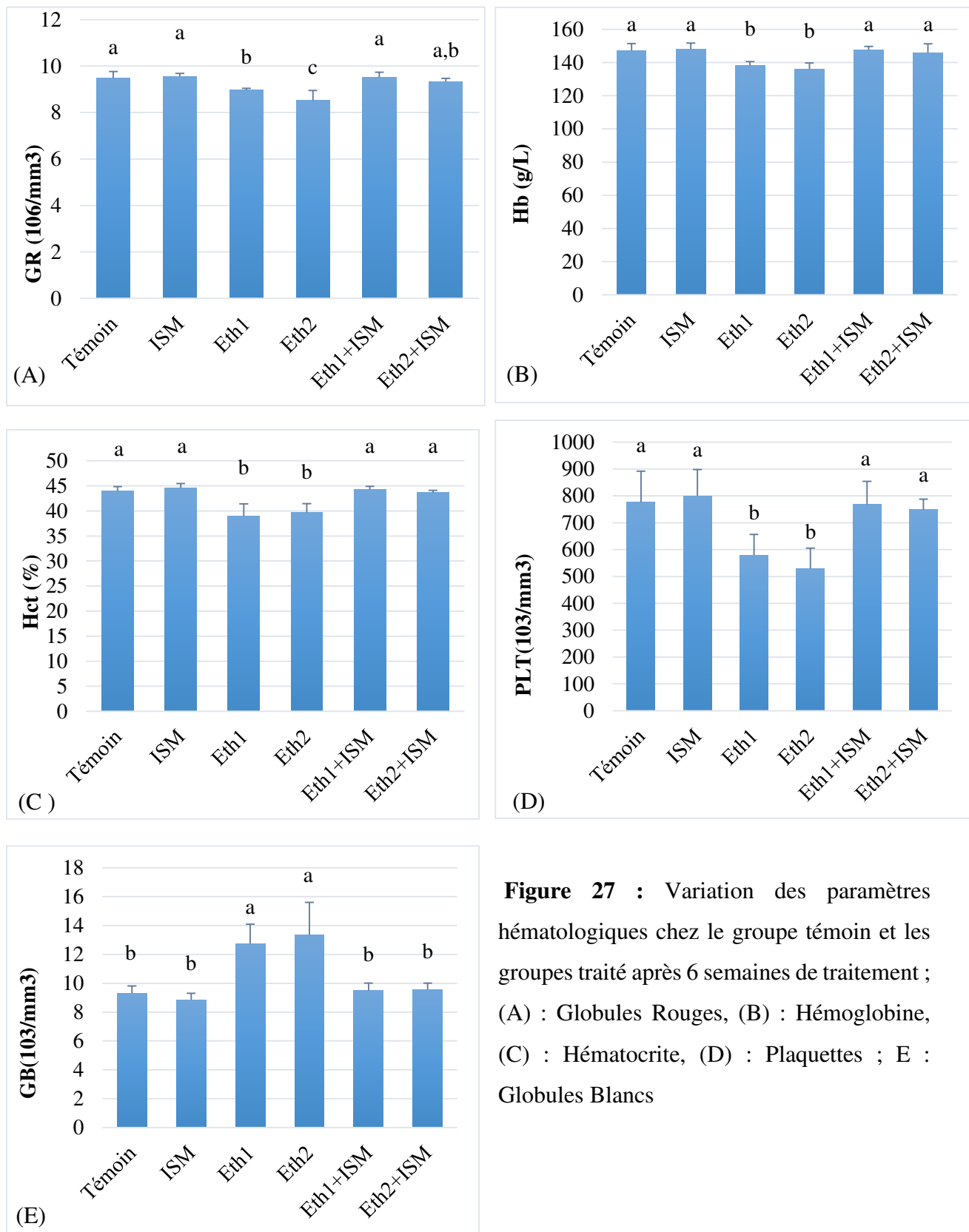


Figure 27 : Variation des paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traité après 6 semaines de traitement ; (A) : Globules Rouges, (B) : Hémoglobine, (C) : Hématocrite, (D) : Plaquettes ; E : Globules Blancs

❖ Discussion

L'évaluation de profile hématologiques des différentes espèces est devenue un paramètre important pour comprendre les processus normaux et pathologiques ainsi pour évaluer les impacts toxicologiques (**Liju et al., 2013**). Les paramètres hématologiques, les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes, sont couramment utilisés pour diagnostiquer diverses maladies telles que l'anémie, les paramètres inflammatoires, auto-immunes, allergiques, infectieux, cancéreux (**Gao et al., 2019**).

Dans notre étude nous avons tenté de voir l'effet de la consommation de l'éthanol pendant six semaines successive sur les paramètres hématologiques ainsi de démontrer la faisabilité de l'utilisation de l'infusion des graines de *Silybum marianum* comme agent préventif.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation montrent que le gavage oral de l'éthanol aux rats à 1g/kg et 2g/kg de poids corporel a provoqué une diminution significative des globules rouges, de l'hémoglobine, d'hématocrite et des plaquettes par rapport au groupe témoin. Nos résultats concernant la diminution des globules rouges, de l'hémoglobine et d'hématocrite induit par éthanol sont en accord avec l'étude de **Saihia et al., (2014)** réalisé sur des lapins et de **Doğan et al., (2020)** réalisé sur des rats. Tandis que **Jabri et al., (2016)** dans leur étude sur des rats ont rapporté que administration aiguë d'éthanol par voie orale (4 g / kg de poids corporel) a diminué le nombre des plaquettes.

Les effets pathologiques et toxicologiques de l'éthanol sur le sang ont été étudiés précédemment, où les chercheurs ont découvert que l'augmentation du stress oxydatif et la modification du profil biochimique sont responsables des effets toxique de l'éthanol (**Maturu et al., 2012**). En raison de la teneur élevée en fer et en acides gras polyinsaturés présents dans leur membrane, les globules rouges sont très sensibles aux dommages oxydatifs et augmentent la fragilité membranaire (**Alimi et al., 2012**). L'augmentation de stress oxydatif par l'éthanol provoque une diminution de la glutathion reductase qui joue un rôle important dans la protection des érythrocytes contre la peroxydation de protéine thiol conduisant à la diminution de la résistance à l'hémolyse (**Padmini & Sundari, 2008**).

De plus, nos résultats montrent que le gavage oral de l'éthanol à 1g/kg et 2g/kg de poids corporel a provoqué une augmentation significative des globules blancs par rapport au groupe témoin. **Kawashima et al., (2011)** et **Kurhaluk et al., (2017)** ont aussi observé que la

consommation de l'éthanol a provoqué une augmentation des globules blancs. Cette augmentation pourrait être expliquée par l'activation du marqueur des systèmes de défense et immunitaire et montré qu'il y avait des inflammations dans les tissus induit par l'éthanol (**Maturu et al., 2012**).

Cependant, d'après nos résultats, nous avons observé qu'il n'a aucun changement significatif dans les paramètres hématologique chez les groupes combinés (Eth1+ISM and Eth2+ISM) en comparant avec le groupe témoin. Nos résultats révèlent que l'infusion des graines de *Silybum marianum* a réussi à protéger les paramètres hématologiques contre la toxicité induit par éthanol. Nous supposons que cette propriété hémato-protectrice de l'infusion des graines de *Silybum marianum* probablement résulter de l'effet des composants de la plante.

Les résultats de cette étude s'harmonisent avec d'autres recherches qui ont montré le rôle protecteur de l'extrait de *Silybum marianum* ou l'un de ses composés actifs (silymarine ou silybin) contre divers produits chimiques induisant hématotoxicité. **Ali et al., (2015)** ont observé dans leur étude que le Silybin a protégé les paramètres hématologiques contre la toxicité induite par le nickel. **Mahmoud et al., (2020)** ont aussi rapporté que la silymarine a réussi de protéger les paramètres hématologiques de la toxicité induit par le rayonnement gamma.

Un tel effet pourrait être dû probablement aux propriétés antioxydantes de la silymarine qui permettent la régénération des cellules, réduisent le stress oxydatif et protègent les cellules contre l'apoptose (**Gharagozloo et al., 2013**). Plus spécifiquement, il a été rapporté que la silymarine pourrait s'intégrer dans la membrane érythrocytaire et conduire à sa stabilisation, ainsi prévenir les dommages physiques de la membrane et résultant en un effet de piégeage des radicaux libres plus efficace (**López-Revuelta et al., 2006**). Plus intéressant, il a été rapporter que le silybin peut supprimer efficacement les troubles hématologiques tels que β -thalassémie, leucémie myéloïde et lymphome anaplasique à grandes cellules (**Zou et al., 2017**).

V- L'effet de l'éthanol sur les paramètres du stress oxydatif : l'effet protecteur de Silybum marianum

❖ Résultats

Dans cette étude nous avons examiné le profile antioxydant dans les testicules, les épидидymes, le foie et les reins après l'administration de l'éthanol et l'infusion des graines de *Silybum marianum*.

Comme été illustré dans la figures (28, tableau 16), nous avons observé que le gavage oral de éthanol à 1g/kg et 2g/kg de poids corporel a provoqué une augmentation significative de la peroxydation lipidique, manifestée par l'augmentation significative du taux de MDA dans les testicules, les épидидymes et le foie par rapport aux autres groupes.

De plus, nous avons marqué que la concentration de glutathion réductase et l'activité de glutathion peroxydase testiculaire, épидидymaire et hépatique ont été diminué significativement chez les rats d'Eth1 et d'Eth2 par rapport aux autres groupes de l'expérience (figure 29 et 30, tableau 17 et 18).

Au niveau des reins, nous n'avons observé que seul le gavage oral d'éthanol à 2 g/kg de poids corporel a provoqué des changements dans le profile antioxydant, dont nous avons observé une l'augmentation significative du taux de MDA et une diminution significative la concentration de glutathion réductase et l'activité de glutathion peroxydase chez le groupe Eth2 par rapport aux autres groupes (Figure 28, tableau 16)

D'autre part, les groupes combinés (Eth1 + ISM et Eth2 + ISM) ont présenté une diminution notable de taux de MDA et une augmentation de la concentration de glutathion réductase et l'activité de glutathion peroxydase dans les testicules, épидидymes, foie et rein par rapport aux groupes Eth1 et Eth2, comme ils n'ont présenté aucun changement notable dans le profile antioxydant par rapport au groupe témoin

Tableau 16 : Les variations de taux du MDA chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
T	1.60±0.019 _c	1.57±0.020 ^a	1.82±0.245 ^b	2.07±0.155 _a	1.59±0.027 ^c	1.58±0.018 _c
E	1.56±0.026 _{b,c}	1.53±0.019 ^c	1.82±0.040 ^a	1.84±0.012 _a	1.57±0.032 ^b _c	1.58±0.024 _b
Foie	1.70±0.066 _b	1.73±0.041 ^b	2.11±0.150 ^a	2.18±0.058 _a	1.80±0.076 ^b	1.82±0.082 _b
Reins	1.58±0.05 ^b _c	1.54±0.011 ^c	1.66±0.077 ^a _b	1.70±0.049 _a	1.57±0.028 ^c	1.58±0.036 _c

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. T : Testicules ; E : Epididymes ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

Tableau 17 : Les variations de la concentration de glutathion réductase (GSH) chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M ± SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
T	31.66±3.10 _{a,b}	34.00±3.17 ^a	20.50±4.52 ^c	17.56±2.47 _c	28.92±3.75 ^b	28.17±0.96 _b
E	50.33±2.26 _{a,b}	58.56±7.01 ^a	34.05±2.18 ^c	28.93±5.50 _c	45.16±6.65 ^b	43.39±2.46 _b
Foie	25.36±3.68 _b	30.29±2.65 ^a	18.79±2.69 ^c	17.75±1.86 _c	24.79±2.44 ^b	24.52±2.32 _b
Reins	18.94±1.68 _{a,b}	21.97±2.38 ^a	17.10±2.56 ^b _c	13.99±1.45 _c	17.68±1.97 ^b	17.62±1.63 _b

*Les moyens ne partagent pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. T : Testicules ; E : Epididymes ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

Tableau 18 : Les variations de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines de traitement exprimé comme M \pm SD, N=6

	Témoin	ISM	Eth1	Eth2	Eth1+ISM	Eth2+ISM
T	34.62 \pm 4.57 a,b	38.59 \pm 5.30 ^a	16.10 \pm 1.85 ^c	13.42 \pm 3.17 c	30.90 \pm 6.38 ^a b	29.54 \pm 7.08 b
E	22.97 \pm 3.63 a,b	24.77 \pm 3.29 ^a	7.98 \pm 1.70 ^c	7.32 \pm 1.39 ^c	19.67 \pm 2.92 ^b	18.88 \pm 1.42 b
Foie	11.20 \pm 0.73 b	14.15 \pm 1.759 a	7.34 \pm 0.987 ^c	6.41 \pm 0.867 c	10.22 \pm 1.20 ^b	10.29 \pm 0.53 b
Reins	0.19 \pm 0.035 a,b	0.22 \pm 0.072 ^a	0.11 \pm 0.047 ^b c	0.08 \pm 0.010 c	0.17 \pm 0.069 ^a b	0.17 \pm 0.04 ^a b

*Les moyens ne partageant pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$). Selon le test d'analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey. T : Testicules ; E : Epididymes ; ISM : l'infusion des graines de *Silybum marianum*, Eth1 : 1g/ kg/j d'éthanol, Eth2 : 2g/kg/j d'éthanol.

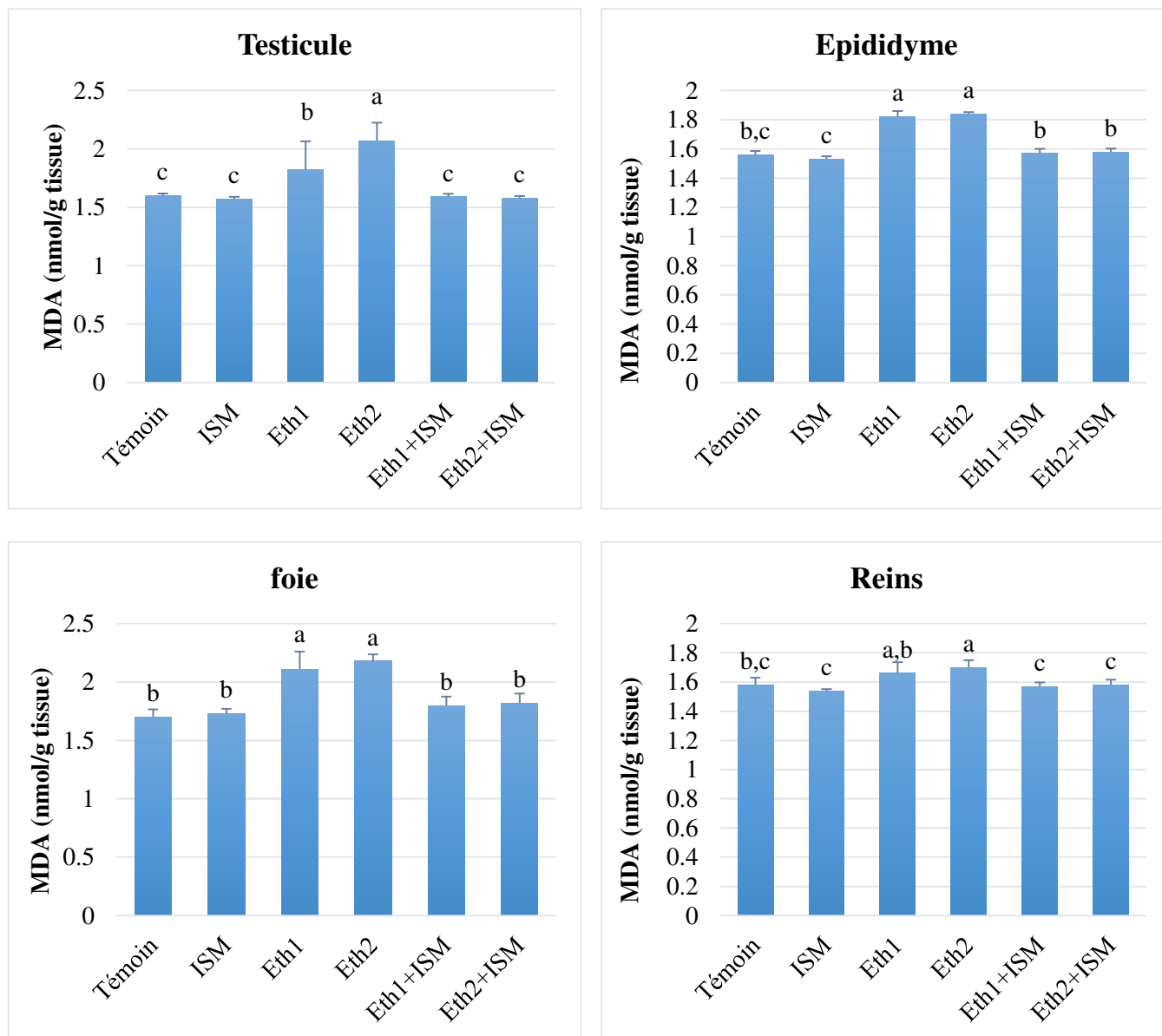


Figure 28: Variation de taux du MDA testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines

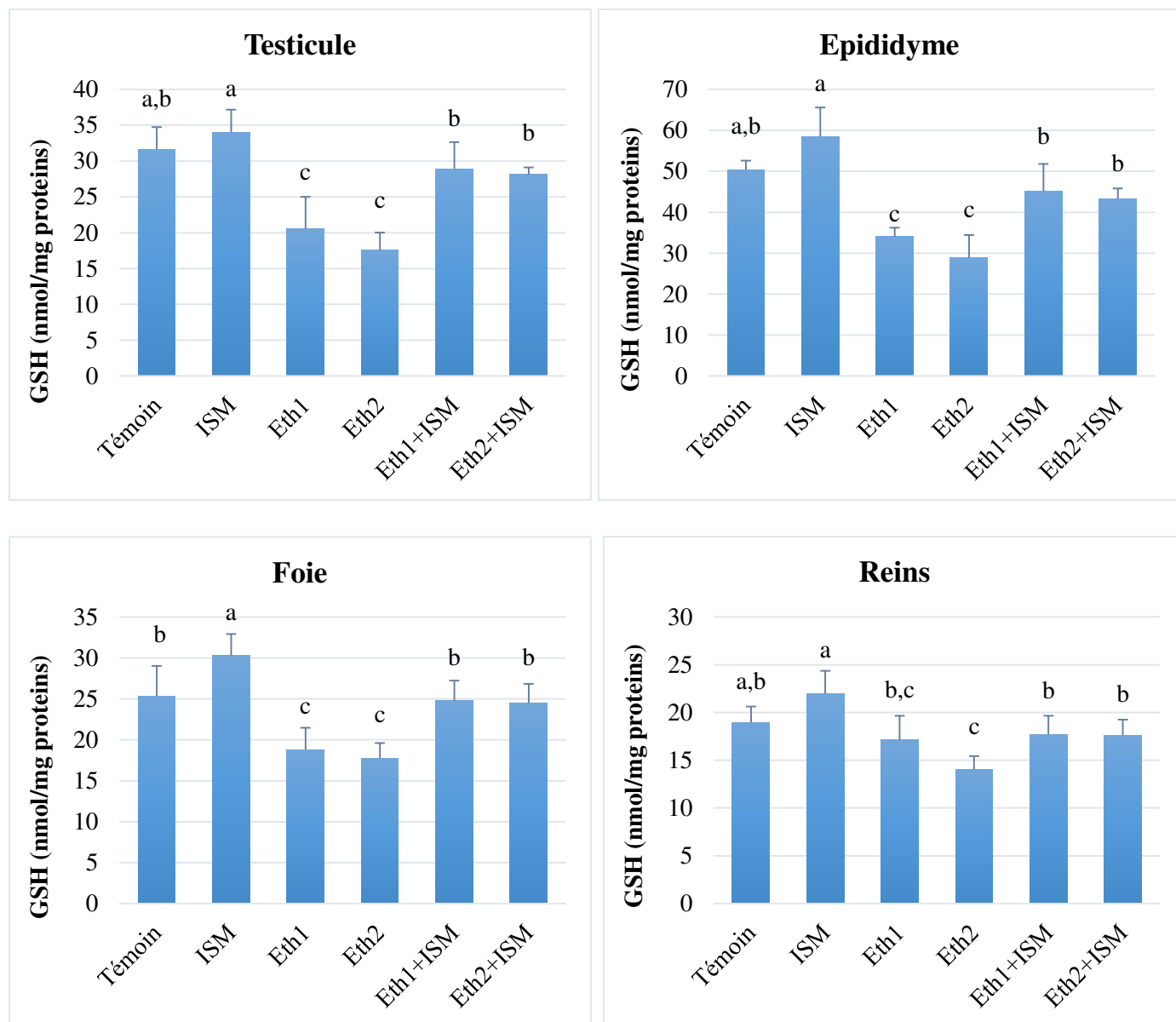


Figure 29 : Variation la concentration de glutathion réductase tissulaire testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines

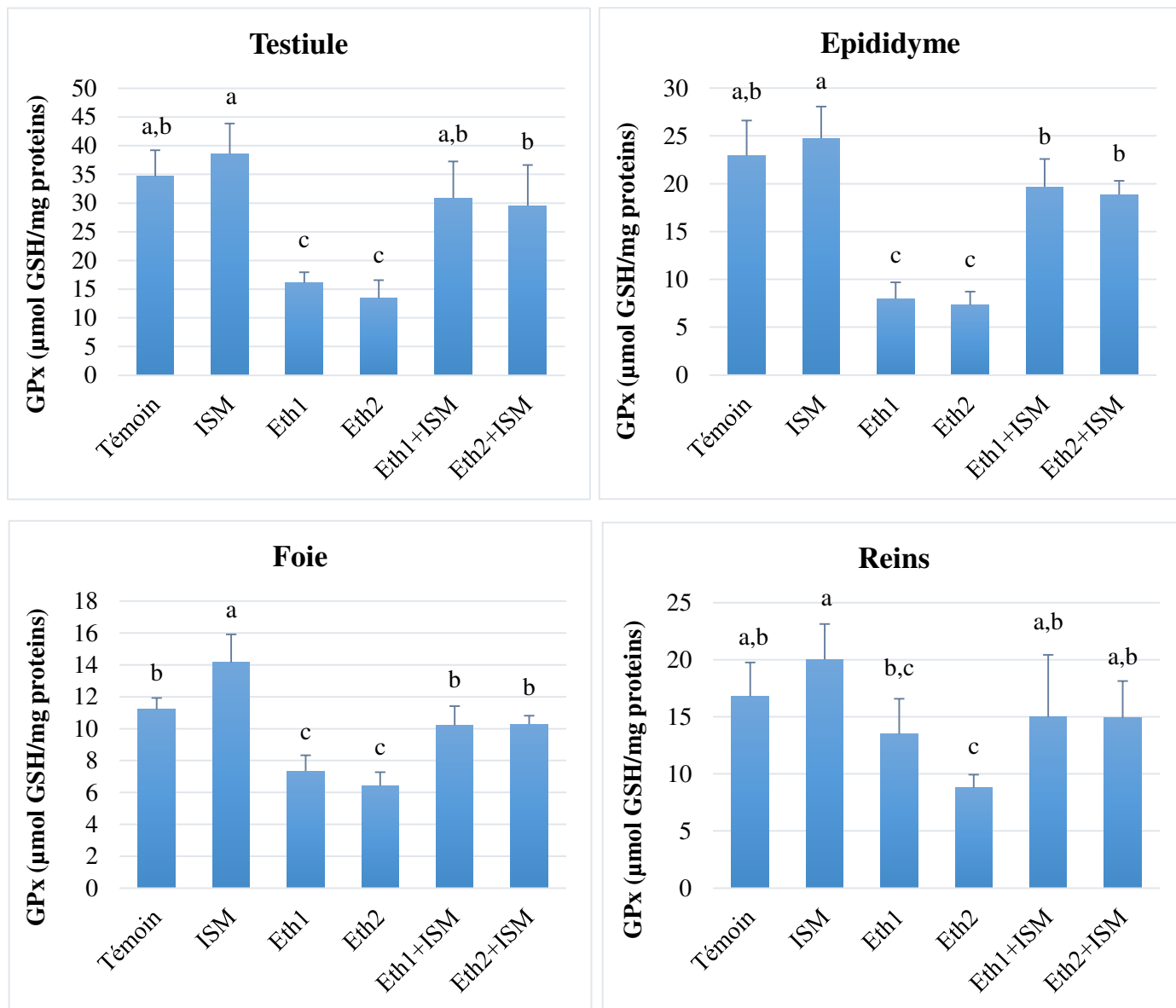


Figure 30 : Variation de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase testiculaire, épидидymaire, hépatique et rénal chez le groupe témoin et les groupes traités après 6 semaines

❖ Discussion

Étant donné que le stress oxydatif induit par l'éthanol a été prouvé d'être l'un des principaux mécanismes par lequel l'éthanol provoque des effets pathologiques, et à la lumière des fortes propriétés antioxydantes des composés de l'extrait des graines de *Silybum marianum*. Cette étude est également étendue à étudier l'effet du traitement sur les paramètres du stress oxydatif dans les testicules, l'épididyme, le foie et les reins.

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est l'un des principales réponses impliquée dans le mécanisme de l'éthanol induisant le stress oxydatif (Wang *et al.*, 2018), conduit généralement à la peroxydation des lipides, à l'oxydation des protéines et de l'ADN (Sugimoto & Takei, 2017), entraînant à la suite des dommages cellulaires et des dysfonctionnements des organes.

L'analyse statistique des résultats de cette étude a montré que le gavage oral de l'éthanol a provoqué une augmentation significative de la peroxydation lipidique, manifestée par l'augmentation significative du taux du MDA testiculaire, épидидymaire, hépatique par rapport aux autres groupes.

Le Malondialdéhyde (MDA) est le produit final de l'oxydation des acides gras polyinsaturés dans la membrane cellulaire et le marqueur de la peroxydation lipidique induite par le stress oxydatif. Selon You *et al.*, (2010), le MDA reflète un rôle causatif de la peroxydation lipidique dans les dommages induits par l'éthanol. L'augmentation du MDA, qui a été observé dans cette étude, peut être expliquée par l'effet de cytochrome P4502E1 (CYP2E1) induit par l'ingestion d'éthanol en générant les radicaux libres qui allouent des biomolécules cellulaires telles que les protéines, l'ADN et la réaction phospholipidique, sous l'action de l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyles qui causent, à leur tour, des dommages oxydatifs à la membrane cellulaire et provoquer la peroxydation lipidique manifestée par augmentation du MDA (Kamoun *et al.*, 2017).

De plus, nos résultats ont montré que la concentration de glutathion reductase GSH et l'activité enzymatique de glutathion peroxydase dans les tissus étudiés ont été diminués significativement chez les rats traités par l'éthanol.

Les systèmes antioxydants enzymatiques tel que le GPx et non enzymatiques (GSH) sont essentiels pour la réponse cellulaire offrent une protection contre le stress oxydatif dans des conditions physiologiques. Les dommages induit par la peroxydation lipidique dans les tissus ont servi à être attribuées à la réduction de taux des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Yang et al., 2011**). Le glutathion (GSH) est présent dans tous les tissus des mammifères comme le thiol non protéique le plus abondant qui se défend contre le stress oxydatif (**Lu, 2013**). Le GSH est utilisé par plusieurs enzymes principales dépendantes du GSH comme les glutathion peroxydases (GPx) pour réduire les peroxyde d'hydrogène, glutathion S-transférases (GST) pour détoxifier les composés xénobiotiques par la formation de conjugués GSH (GS-x) (**Ferguson & Bridge, 2019**). De cette manière, la diminution du taux de GSH qui a été observé après l'ingestion de l'éthanol, dans cette étude, pourrait s'expliquer par sa consommation par le glutathion peroxydase lors de la dégradation du peroxyde d'hydrogène et du peroxyde lipidique (**Arivazhagan et al., 2000**). De la même manière, le déclin de l'activité GPx observé dans cette étude pourrait être le résultat d'une diminution du niveau de GSH.

En ce que concerne les reins, notre résultats ont montré que seule la dose 2g/kg de poids corporelle a entraîné des perturbations dans le statu antioxydant, dont on a remarqué une augmentation significative du taux de MDA avec une diminution du concentration de glutathion reductase GSH et l'activité enzymatique de glutathion peroxydase. Ce qu'explique que l'éthanol, dans cette étude, a réagi d'une façon dose dépendant. Nos résultats peuvent indiquer aussi que l'éthanol a une action spécifique dans chaque organe.

Nos résultats concernant l'augmentation taux du MDA et la diminution de la concentration de glutathion reductase GSH et de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase ont en accord avec plusieurs études antérieures qui ont montré que l'ingestion de éthanol a provoqué des perturbations dans le statu antioxydant dans les organe de la reproduction (**Akomolafe et al., 2015; Siervo et al., 2015**), le foie (**Kim et al., 2014; Li et al., 2015**) et les reins (**Goc, 2020; Cikler-Dulger & Sogut, 2020**).

En revanche, dans l'étude actuelle, l'infusion des graines de *Silymarin marianum* a réussi à protéger les organes étudiés contre le stress oxydatif induit par l'éthanol et à maintenir les paramètres de stress oxydatif aux niveaux normaux. Dont, nous avons remarqué que le taux de MDA dans les testicules, les épидидymes, le foie et les reins été réduits significative chez les

groupes qui ont reçu l'éthanol et le ISM. En outre, l'administration d'ISM a maintenu la concentration de GSH et de GPx de ces organes en leurs niveaux normaux chez les groupes Eth1+ ISM et Eth2 + ISM.

Ces résultats sont en bon accord avec d'autres recherches qui ont montré l'avantage d'utilisation de l'extrait de *Silybum marianum* ou l'un de ses composés actifs (silymarine ou silybine) pour protéger contre le stress oxydatif induit par divers produits chimiques. **Yaman et al., (2018)** ont montré dans leur étude que la silymarine avait un effet protecteur comme un antioxydant contre les dommages causés par le méthotrexate dans les testicules des rats. **Heidari Khoei et al., (2018)** en leur tour ont reporté qu'ils ont réussi à prévenir le stress oxydative induit par le streptozotocine avec l'ingestion de silymarin. De même, **El-Shennawy et al., (2016)** ont démontré l'efficacité de l'administration orale d'extrait de silymarine dans la protection de foie contre le stress oxydatif et les dommages hépatique induites par l'exposition aux rayonnements γ . Ainsi, **Salama et al., (2015)** ont démontré que l'administration orale d'extrait de silymarine a protégé les reins contre le stress oxydatif induit par l'éthanol.

Tel effet est dû principalement au les composants actif de l'extrait de graines de *S. marianum*. Il a été rapporté que la silymarine avait montré un effet antioxydant en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et en inhibant la peroxydation des lipides (**Yaman et al., 2018**). Les mécanismes antioxydants possibles de silymarine ont lieu par piégeage direct des radicaux libres et de la chélation des ions de fer et de cuivre libres, ainsi que la prévention de la formation de radicaux libres en inhibant des enzymes spécifiques produisant des ERO (**El-Shennawy et al., 2016**).

La silymarine n'a pas seulement une forte propriété antioxydante, en réagissant avec l'ERO, mais également en augmentant la puissance des antioxydants physiologiques (**Surai, 2015**). Dont, il a été reporté que la silymarine a la capacité renforcer les systèmes de défense antioxydante en augmentant l'activité enzymatique et non enzymatique des cellules impliquant superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), GPx et GSH (**Kiruthiga et al., 2007**). Plus intéressant, il a été prouvé que la silymarine peut préserver la concentration de GSH en augmentant les niveaux de métabolites de la méthionine, de la S-adénosylméthionine et de la cystéine qui sont nécessaires pour synthétiser la GSH (**Kim et al., 2016**).

Conclusion & perspective

Conclusion et perspective

En conclusion, d'un part, nos résultats permettent d'affirmer l'effet toxique de l'éthanol sur la fonction reproductrice, la fonction hépatique et rénale, les paramètres hématologique ainsi la production de stress oxydatif. Dont nous avons observé que la consommation de l'éthanol a provoqué des altérations toxique dans la plupart des paramètres biologiques des spermatozoïdes, une diminution de la concentration de testostérone, des perturbations dans la plupart des paramètres biochimiques et hématologiques, perturbations dans le statu de stress oxydatif manifesté par l'élévation de la concentration de MDA et la diminution de la concentration de GSH de l'activité enzymatique de GPx des testicules, épидидymes, foie et les reins. D'autre part l'administration de l'infusion des graines de *Silybum marianum* avec de l'éthanol a réussi à maintenir la plupart des paramètres cités ci-dessus à des niveaux normaux.

En perspective, des futures études approfondies notamment aux niveaux cellulaire et moléculaire sont nécessaires pour comprendre les mécanismes par lesquels l'infusion des graines *Silybum marianum* réagit avec la toxicité de l'éthanol en particulier au niveau de système reproducteur masculin. Il est aussi important de déterminer toutes les molécules bioactives contenant dans l'infusion des graines *Silybum marianum* pour mieux caractériser ces effets protecteurs en particulier au niveau des voies de signalisation impliquées.

References

Références

A

- Abedi, H., Jahromi, H. K., Hashemi, S. M. A., Jashni, H. K., Jahromi, Z. K., & Pourahmadi, M. (2016).** The effect of silymarin on spermatogenesis process in rats. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 5(6), 146-150.
- Abenavoli, L., & Milic, N. (2017).** Silymarin for liver disease. In *Liver Pathophysiology*. Academic Press, (pp. 621-631).
- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., & Capasso, F. (2010).** Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423-1432.
- Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018).** Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202-2213.
- AbouZid, S. F., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2016).** Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt. *Industrial crops and products*, 83, 729-737.
- Adhikari, M., Dhaker, A., Adhikari, J., Ivanov, V., Singh, V., Chawla, R., ... & Arora, R. (2013).** In vitro studies on radioprotective efficacy of silymarin against γ -irradiation. *International journal of radiation biology*, 89(3), 200-211.
- Akhtar, R., Ali, M., Mahmood, S., & Sanyal, S. N. (2014).** Anti-proliferative action of silibinin on human colon adenomatous cancer HT-29 cells. *Nutricion hospitalaria*, 29(2), 388-392.
- Akomolafe, S. F., Oboh, G., Akindahunsi, A. A., & Afolayan, A. J. (2015).** Tetracarpidium conophorum ameliorates oxidative reproductive toxicity induced by ethanol in male rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 439.
- Al-Bairuty, G. A., Al-Shmgani, H. S., & Taha, M. N. (2016).** Ethyl alcohol induced pathological changes in male reproductive system of albino rats. *International Journal for Sciences and Technology*, 143(4093), 1-5.
- Al-Ghanim, K. A. (2014).** Effect of cypermethrin toxicity on enzyme activities in the freshwater fish *Cyprinus carpio*. *African Journal of Biotechnology*, 13(10).

- Ali, A., Dh, W., Khudair, A. N., & AL-Masoudi, E. A. (2015).** Influence of silymarin extracted from *Silybum marianum* seeds compared to legalon against nickel chloride induced hematological and biochemical changes in male rabbits. *Bas. J. Vet. Res*, *14*(2), 293-305.
- Alimi, H., Hfaeidh, N., Bouoni, Z., Sakly, M., & Rhouma, K. B. (2012).** Protective effect of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* prickly pear juice upon ethanol-induced damages in rat erythrocytes. *Alcohol*, *46*(3), 235-243.
- Alirezaei, M., Jelodar, G., & Ghayemi, Z. (2012).** Antioxidant defense of betaine against oxidative stress induced by ethanol in the rat testes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *18*(3), 239-247.
- Arivazhagan, P., Thilakavathy, T., & Panneerselvam, C. (2000).** Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, *11*(3), 122-127.
- Attia, Y. A., Hamed, R. S., Bovera, F., Abd El, A. E. H. E., Al-Harthi, M. A., & Shahba, H. A. (2017).** Semen quality, antioxidant status and reproductive performance of rabbits bucks fed milk thistle seeds and rosemary leaves. *Animal reproduction science*, *184*, 178-186.

B

- Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... & Coglianò, V. (2007).** Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The Lancet. Oncology*, *8*(4), 292-293.
- Bahmani, M., Shirzad, H., Rafeian, S., & Rafeian-Kopaei, M. (2015).** *Silybum marianum*: beyond hepatoprotection. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, *20*(4), 292-301.
- Bekatorou, A. (2016).** Alcohol: Properties and Determination. In *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Ltd, 80-96
- Beloued, A. (1998).** Plantes médicinales d'Algérie. *Ed office des publications universitaires INA EL HARACH*, p68
- Beniston, N.T., Beniston, W.S. (1984).** Fleures d'Algérie. *Ed Entreprise Nationale de livre, Alger* p274. N° ed. 1822 /84

- Bevan, R. J., Slack, R. J., Holmes, P., & Levy, L. S. (2009).** An assessment of potential cancer risk following occupational exposure to ethanol. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12(3), 188-205.
- Bhatia, N., & Agarwal, R. (2001).** Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. *The Prostate*, 46(2), 98-107.
- Bhattacharya, S. (2011).** Milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaert.) seeds in health. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 759-766). Academic Press.
- Bijak, M. (2017).** Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaert.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22(11), 1942.
- Blaising, J., Lévy, P. L., Gondeau, C., Phelip, C., Varbanov, M., Teissier, E., ... & Boulant, S. (2013).** Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cellular microbiology*, 15(11), 1866-1882.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bulle, S., Reddy, V. D., Hebbani, A. V., Padmavathi, P., Challa, C., Puvvada, P. K., ... & Nallanchakravarthula, V. (2016).** Nephro-protective action of *P. santalinus* against alcohol-induced biochemical alterations and oxidative damage in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 740-746.

C

- Cameron, D. (2007).** Structure and Function of the Male Reproductive System, in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, p 1-9
- Camini, F. C., & Costa, D. C. (2020).** Silymarin: not just another antioxidant. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 1(ahead-of-print).
- Cardile, A. P., & Mbuy, G. K. (2013).** Anti-herpes virus activity of silibinin, the primary active component of *Silybum marianum*. *Journal of Herbal Medicine*, 3(4), 132-136.

- Carl, A.B., Edward, R.A., David, E.B. (2012).** Teitz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics (15th edition). *Elsevier, India*. 528, 574, 578,581, 1681.
- Cederbaum, A. I. (2013).** Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. In *Cytochrome P450 2E1: Its Role in Disease and Drug Metabolism*. Springer, Dordrecht (pp. 105-130).
- Ceni, E., Mello, T., & Galli, A. (2014).** Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(47), 17756.
- Cikler-Dulger, E., & Sogut, I. (2020).** Investigation of the protective effects of boric acid on ethanol induced kidney injury. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(3), 186-193.
- Clichici, S., Olteanu, D., Nagy, A. L., Oros, A., Filip, A., & Mircea, P. A. (2015).** Silymarin inhibits the progression of fibrosis in the early stages of liver injury in CCl4-treated rats. *Journal of medicinal food*, 18(3), 290-298.
- D**
- Das, S. K., Mukherjee, S., & Vasudevan, D. M. (2008).** Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin—an overview. *Natural Product Radiance*, 7(2):182-192.
- Dasgupta, A. (2019).** Alcohol: Pharmacokinetics, Health Benefits With Moderate Consumption and Toxicity. In *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing* (pp. 1-16). Academic Press.
- Dasgupta, A., (2015).** Liver Enzymes as Alcohol Biomarkers, in: *Alcohol and Its Biomarkers*. Elsevier Science, pp. 121–122.
- Derosa, G., D'Angelo, A., & Maffioli, P. (2016).** The role of a fixed Berberis aristata/Silybum marianum combination in the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Clinical Nutrition*, 35(5), 1091-1095.
- Ding, R. B., Tian, K., He, C. W., Jiang, Y., Wang, Y. T., & Wan, J. B. (2012).** Herbal medicines for the prevention of alcoholic liver disease: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 457-465.
- DOĞAN, A., DÖNMEZ, F., & ANUK, Ö. O. (2020).** Evaluation of the Erythrocyte Fragility, Haematological Parameters and Antioxidant Properties of Platanus orientalis Leaf Infusion Against Ethanol Toxicity in Rats. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*, 35(1), 1-1.

E

- Ebrahimipour-Koujan, S., Gargari, B. P., Mobasseri, M., Valizadeh, H., & Asghari-Jafarabadi, M. (2018).** Lower glycemic indices and lipid profile among type 2 diabetes mellitus patients who received novel dose of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.(silymarin) extract supplement: A Triple-blinded randomized controlled clinical trial. *Phytomedicine*, *44*, 39-44.
- El-Ashmawy, I. M., Saleh, A., & Salama, O. M. (2007).** Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *101*(5), 320-327.
- El-Demerdash, F. M., Taher, H. M., & Abbassy, M. S. (2015).** REMOVED: Silymarin attenuates neurotoxicity, oxidative stress and antioxidant enzymes perturbations induced by lead in rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *47*, 71.
- El-Newary, S. A., Shaffie, N. M., & Omer, E. A. (2017).** The protection of *Thymus vulgaris* leaves alcoholic extract against hepatotoxicity of alcohol in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *10*(4), 361-371.
- El-Shennawy, H. M., El Shahat, A. N., Ahmed, A. G., & Abdelaziz, N. (2016).** Ameliorative Effect of Silymarin Against Radiation-Induced Oxidative Stress in the Liver of Male Rats. *Pakistan Journal of Zoology*, *48*(6).
- Emanuele, M. A., LaPaglia, N., Steiner, J., Jabamoni, K., Hansen, M., Kirsteins, L., & Emanuele, N. V. (1998).** Reversal of ethanol-induced testosterone suppression in peripubertal male rats by opiate blockade. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *22*(6), 1199-1204.
- Emanuele, M. A., Wezeman, F., & Emanuele, N. V. (2002).** Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Research & Health*, *26*(4), 274.
- Eo, H. J., Park, G. H., & Jeong, J. B. (2016).** Inhibition of Wnt signaling by silymarin in human colorectal cancer cells. *Biomolecules & therapeutics*, *24*(4), 380.

European Food Safety Authority. (2009). Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substances of concern on request of EFSA. *European Food Safety Authority Journal*, **7**, 281. 100 pp. URL www.efsa.europa.eu.

F

Fan, L., Ma, Y., Liu, Y., Zheng, D., & Huang, G. (2014). Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *European journal of pharmacology*, **743**, 79-88.

Fatehi, D., Mohammadi, M., Shekarchi, B., Shabani, A., Seify, M., & Rostamzadeh, A. (2018). Radioprotective effects of Silymarin on the sperm parameters of NMRI mice irradiated with γ -rays. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **178**, 489-495.

Feng, R., Chen, J. H., Liu, C. H., Xia, F. B., Xiao, Z., Zhang, X., & Wan, J. B. (2019). A combination of *Pueraria lobata* and *Silybum marianum* protects against alcoholic liver disease in mice. *Phytomedicine*, **58**, 152824.

Ferguson, G. D., & Bridge, W. J. (2019). The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. *Redox biology*, **24**, 101171.

Fernandes, L.M.P., Fontes de Andrade, E., Monteiro, M.C., Cartágenes, S.C., Lima, R.R., ... & Maia, C.S.F. (2017) Chapter 20 - Ethanol: Neurotoxicity and Brain Disorders. In Addictive Substances and Neurological Disease, *Academic Press*. Pages 201-215

Fernandez-Checa, J. C., García-Ruiz, C., Ookhtens, M., & Kaplowitz, N. (1991). Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *The Journal of clinical investigation*, **87**(2), 397-405

Flohe, L., & Gunzler, WA. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, **105**, 114-121.

G

Gao, X., Yin, J., Wang, X., Petersen, F., & Yu, X. (2019). A comprehensive comparison of hematological parameters among 39 common diseases. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, **79**(4), 251-259.

- Gharagozloo, M., Jafari, S., Esmaeil, N., Javid, E. N., Bagherpour, B., & Rezaei, A. (2013).** Immunosuppressive Effect of Silymarin on Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling Pathway: the Impact on T Cell Proliferation and Cytokine Production. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 113(3), 209-214.
- Giannessi, F., Giambelluca, M. A., Grasso, L., Scavuzzo, M. C., & Ruffoli, R. (2008).** Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. *Medical Science Monitor*, 14(11), BR237-BR242.
- Goc, Z., Kapusta, E., Formicki, G., Martiniaková, M., & Omelka, R. (2019).** Effect of taurine on ethanol-induced oxidative stress in mouse liver and kidney. *Chinese Journal of Physiology*, 62(4), 148.
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2009).** The LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(4), 431-438.
- Graf, T. N., Cech, N. B., Polyak, S. J., & Oberlies, N. H. (2016).** A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 126, 26-33.
- Greenlee, H., Abascal, K., Yarnell, E., & Ladas, E. (2007).** Clinical applications of silybum marianum in oncology. *Integrative cancer therapies*, 6(2), 158-165.

H

- Habib-ur-Rehman, M., Mahmood, T., Salim, T., Afzal, N., Ali, N., Iqbal, J., ... & Khan, A. (2009).** Effect of silymarin on serum levels of ALT and GGT in ethanol induced hepatotoxicity in albino rats. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 21(4), 73-75.
- Hamza, R. Z., & Al-Harbi, M. S. (2015).** Silymarin and *Nigella sativa* extract ameliorate paracetamol induced oxidative stress and renal dysfunction in male mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5, S169-S174.
- Heidari Khoei, H., Fakhri, S., Parvardeh, S., Shams Mofarahe, Z., Ghasemnejad-Berenji, H., Nazarian, H., & Baninameh, Z. (2019).** Testicular toxicity and reproductive performance

of streptozotocin-induced diabetic male rats: the ameliorating role of silymarin as an antioxidant. *Toxin reviews*, 38(3), 223-233.

Heidarian, E., & Nouri, A. (2019). Hepatoprotective effects of silymarin against diclofenac-induced liver toxicity in male rats based on biochemical parameters and histological study. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-7.

Hirano, A., Kaplowitz, N., Tsukamoto, H., Kamimura, S., & Fernandez-Checa, J. C. (1992). Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology*, 16(6), 1423-1427.

I

Imai-Sumida, M., Chiyomaru, T., Majid, S., Saini, S., Nip, H., Dahiya, R., ... & Yamamura, S. (2017). Silibinin suppresses bladder cancer through down-regulation of actin cytoskeleton and PI3K/Akt signaling pathways. *Oncotarget*, 8(54), 92032.

INRS. (2019). Éthanol, Fiche toxicologique n°48, PDF disponible sur http://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_48-2/FicheTox_48.pdf

J

Jabri, M. A., Sani, M., Rtibi, K., Marzouki, L., El-Benna, J., Sakly, M., & Sebai, H. (2016). Chamomile decoction extract inhibits human neutrophils ROS production and attenuates alcohol-induced haematological parameters changes and erythrocytes oxidative stress in rat. *Lipids in health and disease*, 15(1), 1-10.

Jedlinszki, N., Kálomista, I., Galbács, G., & Csupor, D. (2016). Silybum marianum (milk thistle) products in Wilson's disease: a treatment or a threat?. *Journal of Herbal Medicine*, 6(3), 157-159.

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228.

- Jin, Z., Zhang, M., Yang, A., Shi, Y., Niu, H., Wang, Q., ... & Wang, X. (2018).** Protective Effect of Ginsenoside Rg1 Against Ethanol-Induced Male Infertility in Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Pharmacology*, 14(4), 513-521.
- Johnson, V. J., He, Q., Osuchowski, M. F., & Sharma, R. P. (2003).** Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice. *Planta medica*, 69(01), 44-49.
- Jones, A. W. (2011).** Pharmacokinetics of ethanol-issues of forensic importance. *Forensic Sci Rev*, 23(2), 91-136.
- Jones, A. W., Hahn, R. G., & Stalberg, H. P. (1990).** Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood; inter- and intra-individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*, 50(7), 775–780

K

- Ka, S. O., Kim, K. A., Kwon, K. B., Park, J. W., & Park, B. H. (2009).** Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway. *International journal of molecular medicine*, 23(5), 633-637.
- Kalla, P. K., Chitti, S., Aghamirzaei, S. T., Senthilkumar, R., & Arjunan, S. (2014).** Anti-cancer activity of silymarin on MCF-7 and NCIH-23 cell lines. *Adv Biol Res*, 8(2), 57-61.
- Kamal, A. (2014).** Estimation of blood urea (BUN) and serum creatinine level in patients of renal disorder. *Indian J Fundam Appl Life Sci*, 4(4), 199-202.
- Kamoun, Z., Kamoun, A. S., Bougateg, A., Kharrat, R. M., Youssfi, H., Boudawara, T., ... & Zeghal, N. (2017).** Hepatoprotective and nephroprotective effects of sardinelle (*Sardinella aurita*) protein hydrolysate against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1432-1441.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. (1999).** Clinical biochemistry of domestic animals., Academic Press, London, 5th Ed, 44-829.

- Kang, J. S., Park, S. K., Yang, K. H., & Kim, H. M. (2003).** Silymarin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS letters*, 550(1-3), 89-93.
- Kawaratani, H., Tsujimoto, T., Douhara, A., Takaya, H., Moriya, K., Namisaki, T., ... & Fukui, H. (2013).** The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Kawashima, Y., Someya, Y., Shirato, K., Sato, S., Ideno, H., Kobayashi, K., ... & Imaizumi, K. (2011).** Single administration effects of ethanol on the distribution of white blood cells in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(3), 347-355.
- Khalil, E. A. (2003).** Hormonal profile and histopathological study on the influence of silymarin on both female and male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 13(1), 112-122.
- Khan, F. A., Zahoor, M., Ullah, N., Khan, S., Khurram, M., Khan, S., & Ali, J. (2014).** A general introduction to medicinal plants and silybum marianum. *Life Science Journal*, 11(9s), 471-481.
- Khan, M. A., Blackshaw, R. E., & Marwat, K. B. (2009).** Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. *Weed Biology and Management*, 9(2), 99-105.
- Kim, H. G., Kim, J. M., Han, J. M., Lee, J. S., Choi, M. K., Lee, D. S., ... & Son, C. G. (2014).** Chunggan extract, a traditional herbal formula, ameliorated alcohol-induced hepatic injury in rat model. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(42), 15703.
- Kim, S. H., Oh, D. S., Oh, J. Y., Son, T. G., Yuk, D. Y., & Jung, Y. S. (2016).** Silymarin prevents restraint stress-induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response. *Molecules*, 21(4), 443.
- Kiruthiga, P. V., Shafreen, R. B., Pandian, S. K., & Devi, K. P. (2007).** Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H₂O₂ exposure in erythrocytes. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 100(6), 414-419.
- Koh, P. O., & Kim, M. O. (2006).** Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. *Journal of veterinary medical science*, 68(10), 1013-1017.

Kong, L. Z., Chandimali, N., Han, Y. H., Lee, D. H., Kim, J. S., Kim, S. U., ... & Kwon, T. (2019). Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2712.

Kuki, A., Nagy, L., Deák, G., Nagy, M., Zsuga, M., & Kéki, S. (2012). Identification of silymarin constituents: an improved HPLC–MS method. *Chromatographia*, 75(3-4), 175-180.

Kurhaluk, N., Sliuta, A., Kyriienko, S., & Winklewski, P. J. (2017). Melatonin restores white blood cell count, diminishes glycated haemoglobin level and prevents liver, kidney and muscle oxidative stress in mice exposed to acute ethanol intoxication. *Alcohol and Alcoholism*, 52(5), 521-528.

L

LaHood, A. J., & Kok, S. J. (2020). Ethanol Toxicity. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Lampiao, F., Opperman, C. J., Agrwal, A., Stefan, S. P. (2013). Oxidative stress. In parekattil S.J and Agarwal A., editor. *Antioxidants in Male Infertility: A Guide for Clinicians and Researchers*. Springer, p. 117.

Lands, W. E. (1998). A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*, 15(2), 147-160.

Latchoumycandane, C., Nagy, L. E., & McIntyre, T. M. (2014). Chronic ethanol ingestion induces oxidative kidney injury through taurine-inhibitable inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 69, 403-416.

Lee, H. M., Park, M. Y., Kim, J., Shin, J. H., Park, K. S., & Kwon, O. (2016). Persimmon vinegar and its fractions protect against alcohol-induced hepatic injury in rats through the suppression of CYP2E1 expression. *Pharmaceutical Biology*, 54(11), 2437–2442.

Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26087-26124.

Liju, V. B., Jeena, K., & Kuttan, R. (2013). Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food and Chemical Toxicology*, 53, 52-61.

Logsdon, J. E. (2000). Ethanol. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.

López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J. I., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., & Llanillo, M. (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico-biological interactions*, 161(1), 79-91.

Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.

M

Mahmoud, A. Z., Ibrahim, H. A., El-Sawi, M. R., & Habza, M. N. (2020). Effects of silymarin and mesenchymal stem cells on hematological and some biochemical changes induced by gamma radiation in albino rats. *International Journal of Radiation Biology*, 96(2), 220-227.

Maneesh, M., Jayalekshmi, H., Dutta, S., Chakrabarti, A., & Vasudevan, D. M. (2005). Role of oxidative stress in ethanol induced germ cell apoptosis—an experimental study in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(2), 62-67.

Maralla, S., Kesireddy, S. R., & Wudayagiri, R. (2012). Effect of ginger consumption on serum markers of general metabolism, liver and kidney functions and lipid profiles in ethanol induced withdrawal rats. *J Pharm Res*, 5(1), 485-91.

Maturu, P., Reddy, V. D., Padmavathi, P., & Varadacharyulu, N. (2012). Ethanol induced adaptive changes in blood for the pathological and toxicological effects of chronic ethanol consumption in humans. *Experimental and toxicologic pathology*, 64(7-8), 697-703.

McClure, J., Margineantu, D. H., Sweet, I. R., & Polyak, S. J. (2014). Inhibition of HIV by Legalon-SIL is independent of its effect on cellular metabolism. *Virology*, 449, 96-103.

Messegué, M. (1975). Mon herbier de santé, les plantes qui guérissent. Ed Robert Laffont, Paris, p334

Milić, N., Milošević, N., Suvajdžić, L., Žarkov, M., & Abenavoli, L. (2013). New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Natural product communications*, 8(12), 1801–1810.

Mintah, S. O., Asafo-Agyei, T., Archer, M. A., Junior, P. A. A., Boamah, D., Kumadoh, D., ... & Agyare, C. (2019). Medicinal plants for treatment of prevalent diseases. In *Pharmacognosy-Medicinal Plants*. IntechOpen.

Moshtaghion, S. M., Malekinejad, H., Razi, M., & Shafie-Irannejad, V. (2013). Silymarin protects from varicocele-induced damages in testis and improves sperm quality: evidence for E2f1 involvement. *Systems biology in reproductive medicine*, 59(5), 270-280.

Mouillé-Richard, T. (2014). Utilisation du chardon-marie (*Silybum marianum*) dans les affections hépatiques chez les oiseaux et le furet: présentation de quelques cas cliniques. *Thèse de doctorat*, p 72.

Muthusami, K. R., & Chinnaswamy, P. (2005). Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and sterility*, 84(4), 919-924.

N

Nallagangula, K. S., Nagaraj, S. K., Venkataswamy, L., & Chandrappa, M. (2017). Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Science OA*, 4(1), FSO250.

Nelson, D. E., Jarman, D. W., Rehm, J., Greenfield, T. K., Rey, G., Kerr, W. C., ... & Naimi, T. S. (2013). Alcohol-attributable cancer deaths and years of potential life lost in the United States. *American Journal of Public Health*, 103(4), 641-648.

Noble, J. M., & Weimer, L. H. (2014). Neurologic complications of alcoholism. *Continuum: lifelong learning in neurology*, 20(3), 624-641.

Noh, E. M., Yi, M. S., Youn, H. J., Lee, B. K., Lee, Y. R., Han, J. H., ... & Jung, S. H. (2011). Silibinin enhances ultraviolet B-induced apoptosis in mcf-7 human breast cancer cells. *Journal of breast cancer*, 14(1), 8-13.

O

Oh, S. (2014). Disturbance in testosterone production in leydig cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Development & Reproduction*, 18(4), 187.

- Ohkawa, H., Ohishi N, Yagi K. (1979).** Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Biochem.*, 95,351-358.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (1993).** Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical, éd. INSERM, 1993, 55-56
- Onalan, A. K., Tuncal, S., Kilicoglu, S., Celepli, S., Durak, E., Kilicoglu, B., ... & Kismet, K. (2016).** Effect of silymarin on oxidative stress and liver histopathology in experimental obstructive jaundice model. *Acta chirurgica brasileira*, 31(12), 801-806.
- Oufi, H. G., Al-Shawi, N. N., & Hussain, S. A. (2012).** What are the effects of silibinin on testicular tissue of mice?. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(11), 9.

P

- Padmini, E., & Sundari, B. T. (2008).** Erythrocyte glutathione depletion impairs resistance to haemolysis in women consuming alcohol. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 42(1), 14-20.
- Peris, J.B., Stubing, G., Figuerola, R. (1996).** Guide des Plantes Médicinales de la Communauté de Valence. Valence: Les Provinces, p127
- Petrovska, B. B. (2012).** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.
- Piano, M. R. (2017).** Alcohol's effects on the cardiovascular system. *Alcohol research: current reviews*, 38(2), 219.
- Pitzele, H. Z., & Tolia, V. M. (2010).** Twenty per hour: altered mental state due to ethanol abuse and withdrawal. *Emergency medicine clinics of North America*, 28(3), 683-705.
- Preston, B. T., Stevenson, I. R., Lincoln, G. A., Monfort, S. L., Pilkington, J. G., & Wilson, K. (2012).** Testes size, testosterone production and reproductive behaviour in a natural mammalian mating system. *Journal of animal ecology*, 81(1), 296-305.

Q

- Qavami, N., Labbafi, M. R., Dehghani-Meshkani, M. R., & Mehrafarin, A. (2012).** Determination of seed and oil yield and yield components in two variety of milk thistle (*Silybum marianum* Gaetrn.) based on path analysis and regression. *Journal of Medicinal Plants*, 4(44), 78-85.
- Qavami, N., NAGHDI, B. H., Labbafi, M. R., & Mehrafarin, A. (2013).** A review on pharmacological, cultivation and biotechnology aspects of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaetrn.). *Journal of Medicinal Plants*, 19-37.
- Qin, N. B., Li, S. G., Yang, X. Y., Gong, C., Zhang, X. Y., Wang, J., ... & Hua, H. M. (2017).** Bioactive terpenoids from *Silybum marianum* and their suppression on NO release in LPS-induced BV-2 cells and interaction with iNOS. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(10), 2161-2165.
- Quezel, P., & Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales, Tome II. Edition CNRS, Paris.

R

- Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E. A., & Elam, M. B. (2008).** SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in endocrinology & metabolism*, 19(2), 65-73.
- Ramasamy, K., & Agarwal, R. (2008).** Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer letters*, 269(2), 352-362.
- Raskovic, A., Jakovljevic, V., Popovic, M., Sabo, A., and Piljevic, O. (2002).** Effect of Methoxsalen and an Infusion of *Silybum marianum* on Enzymes Relevant to Liver Function. *Pharmaceutical biology*, 40, (1), 70–73.
- Reguieg, L. (2011).** Using medicinal plants in Algeria. *Am J Food Nutr*, 1(3), 126-127.
- Rodrigo, R., & Rivera, G. (2002).** Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 409-422.

S

- Sadighi Gilani, Z. A. H. R. A., & Sadighi Gilani, M. A. (1998).** The correlation between sperm morphology and motility in fertile and infertile men. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI)*, 11(4), 319-324.
- Saihia, A., Khelili, K., & Boulakoud, M. S. (2014).** Ethanol exposure induces liver and kidney injury in adult male Rabbits. *Annals of Biological Research*, 5(4), 23-26.
- Saihia, A., Khelili, K., & Boulakoud, M. S. (2015).** Effets d'éthanol sur la fertilité du lapin mâle adulte *Oryctolagus cuniculus*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 1910-1917.
- Salama, A. F., Tousson, E., Elfetoh, E. M., Elhaak, M., & Elawni, M. (2015).** Effect of Egyptian plant *Silybum marianum* on the kidney during the treatment of liver fibrosis in female albino rats induced by alcohol in comparison to the medical silymarin from China. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 4(3), 557-570.
- Saleh, R. A., & Agarwal, A. (2002).** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of andrology*, 23(6), 737-752.
- Salehi, M., Hasanloo, T., Mehrabian, S., & Farahmand, S. (2010).** Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi in vitro compare to clotrimazol. *Pharmaceutical Sciences*, 16(4), 203-210.
- Sarkar, S., Zaidi, S., Chaturvedi, A. K., Srivastava, R., Dwivedi, P. K., & Shukla, R. (2015).** Search for a herbal medicine: anti-asthmatic activity of methanolic extract of *curcuma longa*. *J Pharmacogn Phytochem*, 3, 59-72.
- Seitz, H. K., Pelucchi, C., Bagnardi, V., & Vecchia, C. L. (2012).** Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. *Alcohol and alcoholism*, 47(3), 204-212.
- Sengupta, P., Borges Jr, E., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2018).** Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Human & experimental toxicology*, 37(3), 247-255.

- Serviddio, G., Bellanti, F., Stanca, E., Lunetti, P., Blonda, M., Tamborra, R., ... & Giudetti, A. M. (2014).** Silybin exerts antioxidant effects and induces mitochondrial biogenesis in liver of rat with secondary biliary cirrhosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 117-126.
- Sharma, S. C., & Chaudhury, R. R. (1970).** Studies on mating. II. The effect of ethanol on sperm transport and ovulation in successfully mated rabbits. *The Indian journal of medical research*, 58(4), 501–504
- Shayakhmetova, G. M., Bondarenko, L. B., Matvienko, A. V., & Kovalenko, V. M. (2014).** Chronic alcoholism-mediated metabolic disorders in albino rat testes. *Interdisciplinary toxicology*, 7(3), 165-172.
- Siervo, G. E., Vieira, H. R., Ogo, F. M., Fernandez, C. D., Gonçalves, G. D., Mesquita, S. F., ... & Fernandes, G. S. (2015).** Spermatid and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology*, 330, 1-8.
- Sigman, M., Jarow, J.P. (2007).** Male infertility. In : Wein AJ, Kavoussi LR, et al., (eds). Campbell-walsh urology. 9th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, p 609-53.
- Singh, R. P., Dhanalakshmi, S., Mohan, S., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2006).** Silibinin inhibits UVB-and epidermal growth factor–induced mitogenic and cell survival signaling involving activator protein-1 and nuclear factor- κ B in mouse epidermal JB6 cells. *Molecular cancer therapeutics*, 5(5), 1145-1153.
- Singh, T., Prasad, R., & Katiyar, S. K. (2016).** Therapeutic intervention of silymarin on the migration of non-small cell lung cancer cells is associated with the axis of multiple molecular targets including class 1 HDACs, ZEB1 expression, and restoration of miR-203 and E-cadherin expression. *American journal of cancer research*, 6(6), 1287.
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014).** The regulation of spermatogenesis by androgens. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 30, 2-13.
- Spichiger, R. E., Figeat-Hug, M., & Jeanmonod, D. (2002).** *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales*. PPUR presses polytechniques.
- Strohm, B. (2014).** Ethanol. In *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier BV, 488-491

- Sugimoto, K., & Takei, Y. (2017).** Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research*, 47(1), 70-79.
- Suh, H. J., Cho, S. Y., Kim, E. Y., & Choi, H. S. (2015).** Blockade of lipid accumulation by silibinin in adipocytes and zebrafish. *Chemico-biological interactions*, 227, 53-62.
- Sun, H., Mu, T., Liu, X., Zhang, M., & Chen, J. (2014).** Purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) anthocyanins: Preventive effect on acute and subacute alcoholic liver damage and dealcoholic effect. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(11), 2364-
- Sun, Y., Guan, Z., Zhao, W., Jiang, Y., Li, Q., Cheng, Y., & Xu, Y. (2017).** Silibinin suppresses bladder cancer cell malignancy and chemoresistance in an NF- κ B signal-dependent and signal-independent manner. *International journal of oncology*, 51(4), 1219-1226.
- Surai, P. F. (2015).** Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204-247.

T

- Talebi, A. R., Sarcheshmeh, A. A., Khalili, M. A., & Tabibnejad, N. (2011).** Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol*, 45(4), 403-409.
- Tousson, E., Ali, E. M., Ibrahim, W., & Mansour, M. A. (2011).** Proliferating cell nuclear antigen as a molecular biomarker for spermatogenesis in PTU-induced hypothyroidism of rats. *Reproductive sciences*, 18(7), 679-686.
- Trakulsrichai, S., Sriapha, C., Tongpoo, A., Udomsubpayakul, U., Wongvisavakorn, S., Srisuma, S., & Wananukul, W. (2017).** Clinical characteristics and outcome of toxicity from Amanita mushroom poisoning. *International Journal of General Medicine*, 10, 395-400

U

- Ulas, T., Tursun, I., Demir, M. E., Dal, M. S., & Buyukhatipoglu, H. (2013).** Comment on: Infusion of lin⁻/sca-1⁺ and endothelial progenitor cells improves proinflammatory and oxidative stress markers in atherosclerotic mice. *International journal of cardiology*, 164(1), 128.

Uygun, R., Yagmurca, M., Alkoc, O. A., Genc, A., Songur, A., Ucok, K., & Ozen, O. A. (2014). Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. *Andrologia*, 46(4), 356-369.



Van Heertum, K., & Rossi, B. (2017). Alcohol and fertility: how much is too much?. *Fertility research and practice*, 3(1), 10.

Van Thiel, D. H., Lester, R., & Sherins, R. J. (1974). Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. *Gastroenterology*, 67(6), 1188-1199.

Varga, Z. V., Matyas, C., Paloczi, J., & Pacher, P. (2017). Alcohol misuse and kidney injury: epidemiological evidence and potential mechanisms. *Alcohol research: current reviews*, 38(2), 283.

Venkat, K. K., Arora, M. M., Singh, P., Desai, M., & Khatkhatay, I. (2009). Effect of alcohol consumption on bone mineral density and hormonal parameters in physically active male soldiers. *Bone*, 45(3), 449-454.

Vilahur, G., Casaní, L., Peña, E., Crespo, J., Juan-Babot, O., Ben-Aicha, S., ... & Badimon, L. (2018). Silybum marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis. *International journal of cardiology*, 270, 28-35.

Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., Addolorato, G., & Alcoholism Treatment Study Group. (2008). Acute alcohol intoxication. *European journal of internal medicine*, 19(8), 561–567



Wang, M., Zhang, X. J., Liu, F., Hu, Y., He, C., Li, P., ... & Wan, J. B. (2015). Saponins isolated from the leaves of *Panax notoginseng* protect against alcoholic liver injury via inhibiting ethanol-induced oxidative stress and gut-derived endotoxin-mediated inflammation. *Journal of Functional Foods*, 19, 214-224.

- Wang, X., Liu, M., Zhang, C., Li, S., Yang, Q., Zhang, J., ... & Jia, L. (2018).** Antioxidant activity and protective effects of enzyme-extracted *Oudemansiella radiata* polysaccharides on alcohol-induced liver injury. *Molecules*, 23(2), 481.
- Wang, Y. X., Cai, H., Jiang, G., Zhou, T. B., & Wu, H. (2014).** Silibinin inhibits proliferation, induces apoptosis and causes cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via STAT3 pathway inhibition. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(16), 6791-6798.
- Wang, Z., Yao, T., & Song, Z. (2010).** Chronic alcohol consumption disrupted cholesterol homeostasis in rats: down-regulation of low-density lipoprotein receptor and enhancement of cholesterol biosynthesis pathway in the liver. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(3), 471-478.
- Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40(3), 257-264.
- Wesołowska, O., ŁANIA-PIETRZAK, B., Kuźdzał, M., Stańczak, K., Mosiądz, D., Dobryczycki, P., ... & Michalak, K. (2007).** Influence of silybin on biophysical properties of phospholipid bilayers 1. *Acta pharmacologica sinica*, 28(2), 296-306.
- WHO. (2018)** Alcohol, Global status report on alcohol and health. World Health Organization. disponible sur: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf>>
- Won, D. H., Kim, L. H., Jang, B., Yang, I. H., Kwon, H. J., Jin, B., ... & Cho, S. D. (2018).** In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumor Biology*, 40(5), 1010428318776170.
- Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2003).** Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 27(4), 277.
- Wu, K., Zeng, J., Li, L., Fan, J., Zhang, D., Xue, Y., ... & He, D. (2010).** Silibinin reverses epithelial-to-mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by targeting transcription factors. *Oncology reports*, 23(6), 1545-1552.

Y

- Yaman, T., Uyar, A., Kaya, M. S., Keles, Ö. F., Uslu, B. A., & Yener, Z. (2018).** Protective effects of silymarin on methotrexate-induced damages in rat testes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1).
- Yang, X., Dong, C., & Ren, G. (2011).** Effect of soyasaponins-rich extract from soybean on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(4), 1138-1144.
- You, M., & Arteel, G. E. (2019).** Effect of ethanol on lipid metabolism. *Journal of hepatology*, 70(2), 237-248.
- You, M., Fischer, M., Deeg, M. A., & Crabb, D. W. (2002).** Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29342-29347.
- You, Y., Yoo, S., Yoon, H. G., Park, J., Lee, Y. H., Kim, S., ... & Jun, W. (2010).** In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food and chemical toxicology*, 48(6), 1632-1637.

Z

- Zaki, D. A., Abdel-Ghany, A. S., & Gomaa, A. (2019).** Therapeutic Effect of Milk Thistle (*Silybum Marianum* L) Seeds on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Alexandria Science Exchange Journal*, 40(JANUARY-MARCH), 19-29.
- Zi, X., & Agarwal, R. (1999).** Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7490-7495.
- Zou, H., Zhu, X. X., Zhang, G. B., Ma, Y., Wu, Y., & Huang, D. S. (2017).** Silibinin: an old drug for hematological disorders. *Oncotarget*, 8(51), 89307.

Annexe

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,2	3,8	2,5	1,3									
	90	13,3	11,8	10,4	9,1	7,7	6,4								
	85	20,5	19,1	17,6	16,2	14,7	13,3	6,6							
	80	28,6	27,0	25,5	24,0	22,5	21,0	13,8	6,8						
	75	37,6	35,9	34,3	32,7	31,1	29,5	21,9	14,5	7,2					
	70	47,8	46,0	44,3	42,5	40,9	39,2	31,1	23,1	15,4	7,6				
	65	59,4	57,5	55,6	53,8	52,0	50,2	41,5	33,0	24,7	16,4	8,2			
	60	72,8	70,8	68,8	65,9	64,9	63,0	53,7	44,5	35,4	26,5	17,6	8,8		
	55	88,6	86,4	84,3	82,2	80,1	78,0	67,9	57,9	48,1	38,3	28,6	19,0	9,5	
	50	107,4	105,1	102,8	100,4	98,2	95,9	84,7	73,9	63,0	52,4	41,7	31,3	20,5	11,4
	45	130,3	127,7	125,1	122,6	120,1	117,6	105,3	93,3	81,4	69,5	57,8	46,1	34,5	25,6
	40	158,6	155,7	152,8	150,0	147,2	144,5	130,8	117,3	104,0	90,8	77,6	64,5	51,4	43,6
	35	194,6	191,4	188,2	185,0	181,9	178,7	163,3	148,0	132,9	117,8	102,8	87,9	73,1	67,5
	30	242,4	238,7	235,0	231,3	227,7	224,1	206,2	188,6	171,1	153,6	136,0	118,9	101,7	100,7
	25	308,9	304,5	300,2	295,9	291,6	287,3	266,1	245,2	224,3	203,6	182,8	162,2	141,7	150,6
	20	408,5	403,1	397,8	392,5	387,2	381,9	355,8	329,8	304,0	278,3	252,6	227,0	201,4	233,6
15	574,8	567,4	560,5	553,6	546,6	539,7	505,3	471,0	436,9	402,8	368,8	334,9	301,1	399,9	
10	907,1	896,7	886,4	876,1	865,2	855,2	804,5	753,7	702,9	652,2	601,6	551,1	500,5	11,4	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (**en bleu**) pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°. Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

Préparation des solutions pour le dosage du stress oxydatif :

Préparation des solutions pour la mesure du malone-dialdéhyde (MDA) :

❖ Tampon phosphate (0,1M) :

Solution (A) : dissoudre 35,8 g de Na_2HPO_4 dans 1 L d'eau distillée

Solution (B) : dissoudre 13,8 g de NaH_2PO_4 dans 1 L d'eau distillée

Mélanger 61,5 ml de la solution (A) et 438,5 ml de la solution (B), et ajouter 21,39 g de saccharose.

❖ Solution TCA (20 %) :

Dissoudre 20 g d'acide trichloracétique TCA dans 100 ml d'eau distillée

❖ Solution Tris :

Dissoudre 0,15 g de tris dans 50 ml d'eau distillée

❖ Solution TBA (0,67 %) :

Dissoudre 0,33 g d'acide thiobarbiturique TBA dans 50 ml de la solution tris

Préparation des solutions pour la mesure du Glutathion réduit (GSH)

❖ Solution EDTA (0,02 M) :

Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750ml d'eau distillée.

❖ Solution DTNB (0,01 M) :

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

❖ Solution d'acide salicylique (0,25 %) :

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée

Préparation des solutions pour la mesure de l'activité enzymatique du Glutathion Peroxydase (GPx)

❖ Solution TBS : Tris (50 mM, NaCl (150 mM) :

Dissoudre 8,775g NaCl dans 1L d'eau distillée, puis peser 6,057g Tris et compléter le volume à 1L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant HCl ou NaOH.

❖ Solution du GSH (0.1 mM) :

Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.

❖ Solution TCA (1 %) :

Dissoudre 1g TCA dans 100 ml d'eau distillée.

❖ Solution DTNB (1,0 mM) :

Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

Préparation des solutions pour le dosage des protéines**❖ Solution BSA (1 mg/ml) :**

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

❖ Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95 %). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85 %) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 l de solution).

Ce réactif doit être filtré puis conservé pendant 1 mois au maximum à une température de 4 °C et à l'abri de la lumière.

*Everything comes to an end
The end will be happy only
when we succeed in all we've done*

....

***Silybum marianum* seeds protected biochemical and oxidative stress markers in ethanol-induced toxicity of Wistar rat**

Amina Talbi*, Kamel Khelili, Ferial Remita, Cherif Abdennour

Laboratory of Animal Ecophysiology, Department of Biology, Faculty of Sciences,
University Badji Mokhtar-Annaba, Annaba 23000, Algeria

*Email: aminatalbi.bio@gmail.com ; amina.talbi@univ-annaba.org

Received : 16.09.20 ; Revised : 01.10.20 ; Accepted: 04.10.20

ABSTRACT

In the present study, an attempt was made to evaluate the potential activity of Silybum marianum seeds infused solution (SMI) against ethanol (Eth) toxicity of Wistar rat liver and kidneys. Thirty six males (control, SMI positive control (200 mg/kg b.w./day), the Eth1 (01 g/kg b.w./day), the Eth2 (02 g/kg b.w./day), the Eth1+SMI and the Eth2+SMI) were orally administered for six successive weeks to measure serum biochemical parameters as well as hepatic and renal malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) levels. According to the results, the Eth1+SMI and the Eth2+SMI alleviated ethanol-induced increased levels of ALT, AST, ALP, total cholesterol, triglycerides, LDL, urea, creatinine and MDA. Furthermore, the co-administration of SMI has maintained hepatic and renal GSH concentration and GPx activity close to that of the control. The SMI has alleviated ethanol-induced toxicity via the improvement of hepatic and renal markers.

Keywords: Ethanol, kidney, liver, oxidative stress, *Silybum marianum*.

INTRODUCTION

Ethanol is a substance commonly abused in many communities and considered as one of the lifestyle habits around the world. According to the world health organization, alcohol consumption increased since 2000 in almost all regions of the world, in which African consumers drink an average of 40 g/day of pure alcohol (WHO, 2018). Acute and excessive abuse of ethanol has been shown to have toxic effects inducing many pathological disturbances affecting a number of organs. Due to its propriety of being a small molecule and soluble in both lipids and water, ethanol could penetrate to all tissues of the body and affects the most vital functions including liver and kidney (Lieber, 2000). Oxidative stress was believed to be the major responsible of alcohol-induced pathogenesis. Wherein the production of reactive oxygen species (ROS) is involved in the mechanism of ethanol inducing oxidative stress (Wang *et al.*, 2018), typically leads to the peroxidation of lipids, oxidation of protein and DNA (Sugimoto and Takei, 2017), resulting in cell damage and organ dysfunction.

Currently, interest of medicinal plants have been growing faster in worldwide after realizing their benefits on health (Nandi and Ghosh, 2016).

Wherein, modern pharmacopeia use about 25 % of drugs are derived from plants (Rahman and Fakir, 2015). The growing interest by the supplementations of plant products back to their antioxidant activity and free radical scavenging potential to prevent the diseases progression (Bouhalit and Kechrid, 2018). *Silybum marianum* or Milk thistle, known in Algeria as *choukahmar*, is one of the famous plants used in traditional medicine. It contains active compounds obtained mainly from the dried seeds where it is present in higher concentrations than in other parts of the plant and consist of four flavonolignans which are collectively known as silymarin (Onalan *et al.*, 2016). Silymarin have shown multiple pharmacological activities including antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiallergic, antiviral, antimutagenic, antineoplastic, and antithrombotic agent (El-Demerdash *et al.*, 2015). In addition, silymarin has been reported to regulate cellular and mitochondrial membrane permeability and increase membrane stability (Onalan *et al.*, 2016). The activity of silymarin results from the direct scavenging of free radicals and other oxidizing intermediates, from the chelation of iron or copper ions, as well as from preventing free radical formation (El-Shennawy *et al.*, 2016). In addition to reacting with ROS, silymarin could

increase cell physiological antioxidant power (Surai, 2015).

In this study, we sought to highlight the ameliorative role of *S. marianum* seeds infused solution against ethanol toxicity in rat via the evaluation of blood biochemical parameters and oxidative stress status of liver and kidneys.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Absolute ethanol at 99.8% (Honeywell Laboratory, Germany) was diluted in distilled water to make the desired concentration of 40% (Eth).

Plant

Silybum marianum (Milk thistle) dry seeds were harvested from Ain-Berda, Annaba province, Algeria. Ten g of crushed seeds were poured over 100 ml of boiled distilled water and left to infuse for 30 minutes (Raskovic *et al.*, 2002). The infused solution (SMI) was prepared daily during the six week experimental period and was given to animals at the dose of 200 mg/kg/day by gavage (Dose was 200 mg/kg; it means that we gave 200 mg of the plant to each kilogram of rat. We prepared the infusion by pouring 100 ml of water to 10g of crashed seeds. Then, we calculated how many milliliters in 200mg by applying the rule of three).

Animals and the experimental design

In this experiment, 36 male adult Albinos Wistar rats weighing between 200-220g were obtained from the Algiers Pasteur Institute (Algeria) were used. The experiment was carried out at the animal house under conventional conditions and were fed a standard diet (by GAC-ORAC, Bejaia, Algeria) (GAC-ORAC, is a national company produce Cattle and Rodents Feed) and given drinking water *ad libitum*. Animals were divided equally into 6 groups; the first represented the control, the second was the positive control SMI (200 mg *S. marianum*/kg b.w./day) (using *S. marianum* infusion as positive control to prove its safety for rats, in case the combined treatment provoked toxicity), the third and the fourth groups received Eth1 (1g ethanol/kg b.w./day and Eth2 (2g ethanol/kg b.w./day), respectively. Rats of the fifth (Eth1+SMI) and the sixth (Eth2+SMI) groups were treated respectively with ethanol at 1g/kg b.w./day and 2g/kg b.w./day, followed after one hour, by SMI at

200 mg/kg b.w./day. The treatment was performed orally using a gastric tube for six consecutive weeks.

Rats were sacrificed by decapitation under ether anesthesia after an overnight fast. Ether can be ethically used as an anesthetic in animals; it is being used by most researchers. According to White Animal Care and Use Committee, (2006) ether is safe to use as anesthetic for rodent. Blood was collected in dry tubes, centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes, and then serum was separated and stored at -20 °C to study the biochemical parameters. Liver and kidneys were dissected, cleaned from their adipose tissues, and then stored at -20 °C until used to study the oxidative stress status. Animals' treatments were authorized by the Ethical Committee of Animal Sciences at the University of Badji Mokhtar-Annaba, before starting the experimental work. Experiments were carried out in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

Measurement of the biochemical parameters

In this study, alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC), triglycerides (TG) low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), creatinine (CREA) and urea were measured using an auto analyzer following the technical instructions of the commercial kits obtained from Spinreact (manufactured by SA - Santa Coloma, Spain).

Measurement of oxidative stress parameters

- Lipid peroxidase was measured as Malondialdehyde (MDA) concentration according to Ohkawa *et al.* (1979) method. This method is based on the formation between MDA and thiobarbituric acid (TBA) of a colored pigment absorbing at 530 nm and extractable by butanol in an acidic hot medium.

- Reduced Glutathione (GSH) levels was measured according to Weckbercker and Cory (1988), which is based on the measurement of the optical absorbance of 2-nitro-5-mercapturic acid that it results from the reduction of 5,5'-dithio-bis-

Table 1: Plasma biochemical parameters of control and the treated groups after 6 weeks of treatment

	Control	SMI	Eth1	Eth2	Eth1+SMI	Eth2+SMI
AST (UI/L)	190.47±3.9 ^b	175.62±8.32 ^b	207.49±7.87 ^a	212.04±6.09 ^a	182.63±17.37 ^b	86.25±3.09 ^b
ALT (UI/L)	34.60±7.75 ^b	29.50±0.43 ^b	41.23±1.49 ^a	41.71±2.08 ^a	30.81±1.60 ^b	32.23±1.66 ^b
PAL(UI/L)	105.67±13.05 ^b	91.83±10.36 ^b	144.00±4.52 ^a	153.50±5.92 ^a	97.92±6.14 ^b	01.00±4.90 ^b
TC (g/l)	0.59±0.06 ^b	0.58±0.02 ^b	0.69±0.04 ^a	0.77±0.05 ^a	0.59±0.05 ^b	0.60±0.05 ^b
TG (g/l)	0.86±0.027 ^{bc}	0.78±0.073 ^c	0.94±0.029 ^{ab}	1.04±0.060 ^a	0.79±0.072 ^c	0.80±0.061 ^c
LDL-C (g/l)	0.10±0.018 ^{bc}	0.09±0.020 ^c	0.14±0.018 ^{ab}	0.15±0.023 ^a	0.11±0.018 ^{bc}	0.11±0.017 ^{bc}
HDL-C (g/l)	0.37±0.019 ^{ab}	0.39±0.013 ^a	0.26±0.035 ^c	0.26±0.040 ^c	0.32±0.031 ^b	0.32±0.031 ^b
Crea(mg/l)	4.43±0.35 ^b	4.14±0.11 ^c	4.66±0.18 ^{ab}	4.88±0.19 ^a	4.33±0.22 ^{bc}	4.42±0.29 ^{bc}
Urea (g/l)	0.48±0.03 ^b	0.41±0.01 ^c	0.58±0.05 ^a	0.63±0.02 ^a	0.48±0.04 ^{bc}	0.49±0.03 ^b

^{a-c}. Means do not share the same letter are significantly different (P < 0.05), According to one-way by Tukey test. SMI: *Silybum marianum* seeds infused solution; Eth1:01 g/kg b.w./day; Eth2: 02 g/kg b.w./day; TC: Total cholesterol; TG:triglycerides; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; Crea: Creatinine.

2-nitrobenzoic acid (DTNB) by the groups (-SH) of glutathione. For this, deproteinization of the homogenate is essential in order to keep only the specific thiol groups of glutathione.

- The enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) were evaluated by the method of Flohe and Günzler (1984). The method is based on the reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the presence of reduced glutathione (GSH); the latter is transformed into (GSSG) under the influence of GPx. The results of GSH and GPx were expressed in GSH (nmol/mg proteins) and μmol of GSH/mg proteins, respectively. Thus, liver and kidneys total protein concentration was determined according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

The differences between the groups were tested for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test for multiple comparisons, where Minitab 18 Software application was used. Statistical significance was set at p < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical parameters

As shown in table 1, a significant increase in the enzymatic activity of ALT, AST, and ALP was observed in both groups exposed to ethanol compared to the rest of experimental groups. So far, the measurement of serum AST, ALT, and ALP

has been commonly used as reliable markers for assessment of hepatotoxicity (Sun *et al.*, 2014). Results harmonize with Wang *et al.* (2018) who matched that alcohol intake successfully induce liver damage as remarked by the elevations of serum activity of AST, ALT and ALP. The aminotransferases can be elevated in cases where the integrity of the liver cells is affected (Nallagangula *et al.*, 2017). However, ALP can be released in the blood stream when the parenchymal liver cells were injured (Carl *et al.*, 2012).

Conversely, the co-administrated groups showed a lowered serum activities of ALT, AST and ALP compared to ethanol treated groups (Table 1). These results are in harmony with previous investigations that documented the ability of *S. marianum* or one of its compounds to restore the elevated serum activities of ALT, AST and ALP induced by different xenobiotics (Heidarian *et al.*, 2019; Zaki *et al.*, 2019). Our results might indicate that SMI prevented the leakage of these enzymes into the serum. Accordingly, silymarin regulates membrane permeability and increases its stability when exposed to xenobiotic damage (Abenavoli *et al.*, 2010). Additionally, silymarin was found to stimulate RNA polymerase enzyme in the nucleus of liver cells leading to an elevation of ribosomal protein synthesis and regenerates hepatocytes (Bahmani *et al.*, 2015).

Lipid profile is important marker used for monitoring liver damage. In the current study, the gavage of ethanol caused lipid profile disorder

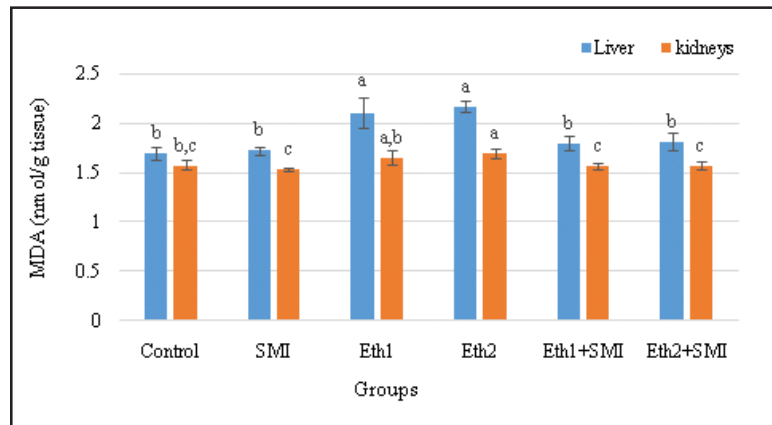


Fig. 1: Variation of hepatic and renal MDA concentration (mean ± SD) of the control and the treated groups with Ethanol and *S. marianum* after 6 weeks of experiment. Means that do not share the same letter are significantly different at $p < 0.05$.

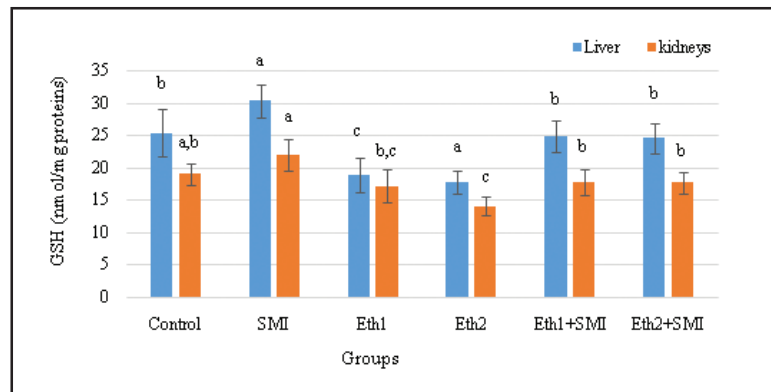


Fig. 2: Variation of hepatic and renal GSH (mean ± SD) of the control and the treated groups with Ethanol and *S. marianum* after 6 weeks of experiment. Means that do not share the same letter are significantly different at $p < 0.05$.

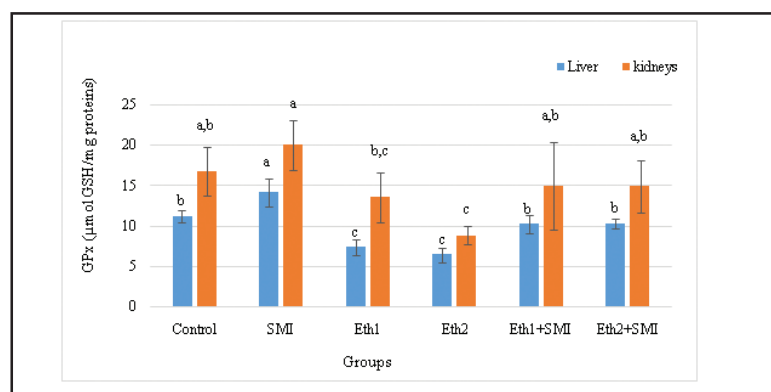


Fig. 3: Variation of hepatic and renal GPx activity (mean ± SD) of the control and the treated groups with Ethanol and *S. marianum* after 6 weeks of experiment. Means that do not share the same letter are significantly different at $p < 0.05$.

characterized by, an increase in serum total cholesterol, triglycerides and low-density lipoprotein cholesterol levels with a decrease in high-density lipoprotein cholesterol levels (Table 1). The results obtained are consistent with several other studies including that of Kamoun *et al.* (2017). According to You and Arteel, (2019), ethanol was found to be the unique among toxins, which disrupts almost all aspect of liver lipid metabolism.

Contrariwise, as appeared for data of table 1, rats treated concomitantly with ethanol and SMI (Eth1+SMI and Eth2+SMI) kept the normal level of the cited parameters like that of the control. The observed results could be related to the action of silybin or silibinin, one of the structural isomers of silymarin. Wherein, silybin was found to have an inhibitor of lipid accumulation by down regulation of LPIN1 (also known as LIPIN1), a major enzyme in the triglycerides synthesis pathway, and FASN, an important enzyme in fatty acid synthesis involved in triglycerides and fatty acids synthesis (Suh *et al.*, 2015). More interestingly, it was reported that silibinin have an anti-adipogenic effect, which associated with upregulation of INSIG proteins, the transcriptional inhibitors of Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP1-c) (Ka *et al.*, 2009). SREBP-1c is an essential transcription factor that stimulates the expression of lipid synthesis genes, including fatty acid synthase (FAS), stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) (Raghow *et al.*, 2008), stimulated by alcohol exposure leading to hepatic steatosis (You *et al.*, 2002). Those circumstances, could explain the mechanism by which SMI restored the normal level of the lipid profile in this study.

Urea and creatinine are good index for testing the normal functioning of kidney, in which the increase of these substances in the serum is an indicator of kidney dysfunction (Kamal, 2014). In the actual investigation, as illustrated in Table 1 rats exposed to ethanol (Eth1 and Eth2) had remarkably raised urea levels. Nevertheless, creatinine level was increased only in the higher ethanol dose. The marked elevation of serum urea and creatinine levels after ethanol administration in agreement with the results obtained by other researchers used different doses of ethanol (Maralla

et al., 2012; Bulle *et al.*, 2016). Thus, several potential mechanisms by which alcohol may directly or indirectly affect the kidneys functions was suggested (Varga *et al.*, 2017). However, the increases of urea and creatinine concentrations could be an index of failure in renal filtration function. According to Latchoumycandane *et al.* (2014), both kidney architecture and its functional filtration were altered after ethanol consumption. Similarly, Bulle *et al.* (2016) in their study have remarked that renal filtration was reduced after ethanol consumption accompanied with increases in circulation of both urea and creatinine. Moreover, Ethanol-induced oxidative stress was suggested as one of the mechanisms associated with alcoholic kidney injury (Varga *et al.*, 2017). It was stated that, the abundance of long chain polyunsaturated fatty acids in renal lipids makes membrane of renal tissue defenseless against reactive oxygen species induced by oxidative stress (Rodrigo and Rivera, 2002).

On the other hand, rats treated concomitantly with ethanol and SMI have the same level of urea and creatinine as that of the control, while in the positive control (SMI), urea and creatinine levels were the lowest (table 1). Salama *et al.* (2015) reported that feeding *Silybum marianum* extraction to rat treated with ethanol succeeded in maintaining the levels of the sited parameters to the normal range. The observed results could be related to the effect of the main *S. marianum* compound, the silymarin. Silymarin may have therapeutic potential for the treatment of nephropathy by increasing the activity of antioxidant enzymes in kidneys and repairing renal morphology (Hamza *et al.*, 2015).

Oxidative stress parameters

Keeping in mind that ethanol-induced oxidative stress is one of the main pathologic mechanisms in liver (Kim *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) as in kidneys (Varga *et al.*, 2017; Cikler-Dulger and Sogut, 2020) and in the light of the strong antioxidant properties of *S. marianum* extract seed compounds (Surai, 2015), this study was extended to oxidative stress parameters in both liver and kidneys. Consistently with the previous investigations (Dogan and Anuk, 2019; Goc *et al.*, 2020), the actual data showed results show a significant rise of hepatic MDA levels in Eth1 and

Eth2 in comparison to control and other treatments groups. In other hand, results indicate an increase of renal MDA level of Eth2 group compared to the other groups, while renal MDA level of Eth1 group remains not changed in comparison with other treatments groups. In addition, results demonstrate a significant decrease in the levels of hepatic GSH and GPx of Eth1 and Eth2 groups compared to other groups. Regarding the kidneys, the levels of GSH and GPx decreased only in Eth2 group compared to the other groups (Figure 1-3).

Conversely, when it administrated concomitantly with ethanol, SMI has Kept MDA, GSH and GPx levels to the normal level (Figure 1-3). Results are in good agreement with other researches that demonstrated the advantage of using *S. marianum* extract or one of its active compounds to neutralize oxidative stress induced by various chemicals in liver and kidneys (Salama *et al.*, 2015; El-Shennawy *et al.*, 2016). Such effect could be reasonably assumed to the ability of *S. marianum* to participate as an antioxidant defender by preventing free radical formation thought the inhibition of specific enzymes responsible for the formation of free radicals (Surai, 2015). More interestingly, silymarin might promote protein synthesis such as glutathione causing an elevation of GPx activity (Fatehi *et al.*, 2018). In the same manner, silymarin could preserve GSH concentration by increasing the levels of methionine, S-adenosylmethionine, and cysteine metabolites that are needed to synthesize GSH (Kim *et al.*, 2016).

CONCLUSION

In this experiment, ethanol intake disrupted most parameters related to hepatic and renal functions. On the other hand, the co-administration of *S. marianum* infused solution together with ethanol succeeded in maintaining the levels of the majority of parameters cited above at normal ranges. The actual investigation is an add to a growing corpus of researches that discussed the negative effects of ethanol on hepatic and renal functions and the benefit of using *S. marianum* to neutralize such toxicity.

REFERENCES :

- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N. and Capasso, F. 2010. Milk thistle in liver diseases: past, present and future. *Phytotherapy Research*, **24**(10):1423-1432.
- Animal Care and Use Committee, 2006. Use of Ether for Animal Anesthesia at Johns Hopkins University (Revised by the JHU Joint Health Safety and Environment/Animal Care and Use Committee 02/22/06).
- Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S. and Rafieian-Kopaei, M. 2015. Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, **20**(4): 292-301.
- Bouhalit, S. and Kechrid, Z. 2018. Protective Effect of Silymarin Extracted from Silybum marianum Seeds upon Nickel-Induced Hepatotoxicity in Albino Wistar Rats. *Ann Microbiol Immunol*, **1**(1): 1005.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, **72**: 248- 254.
- Bulle, S., Reddy, V. D., Hebbani, A. V., Padmavathi, P., Challa, C., Puvvada, P. K. and Nallanchakravarthula, V. 2016. Nephro-protective action of *P. santalinus* against alcohol-induced biochemical alterations and oxidative damage in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **8**:740-746.
- Carl, A.B., Edward, R.A. and David, E.B. 2012. Teitz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics (15th edition). Elsevier, India, p. 528, 574, 578, 581, 1681.
- Cikler-Dulger, E. and Sogut, I. 2020. Investigation of the protective effects of boric acid on ethanol induced kidney injury. *Biotechnic & Histochemistry*, **95**(3):186-193.
- Dogan, A., and Anuk, O. O. 2019. Investigation of the phytochemical composition and antioxidant properties of chinar (*Platanus orientalis* L.) leaf infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Molecular Biology Reports*, **46**(3): 3049-3061.

- El-Demerdash, F.M, Taher, H.M. and Abbassy, M.S. 2015. Silymarin attenuates neurotoxicity, oxidative stress and antioxidant enzymes perturbations induced by lead in rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci*, **47**:71.
- El-Shennawy, H. M., El Shahat, A.N., Ahmed, A. G. and Abdelaziz, N. 2016. Ameliorative effect of silymarin against radiation induced oxidative stress in the liver of Male Rats. *Pakistan J. Zool.*, **48**:1905-1909.
- Fatehi, D., Mohammadi, M., Shekarchi, B., Shabani, A., Seify, M. and Rostamzadeh, A. 2018. Radioprotective effects of Silymarin on the sperm parameters of NMRI mice irradiated with λ -rays. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **178**: 489-495.
- Flohe, L. and Gunzler, W.A. 1984. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, **105**:114-121.
- Goc, Z., Kapusta, E., Formicki, G., Martiniaková, M. and Omelka, R. 2019. Effect of taurine on ethanol?induced oxidative stress in mouse liver and kidney. *Chin J. Physiol*, **62**:148-56.
- Hamza, R. Z., and Al-Harbi, M. S. 2015. Silymarin and Nigella sativa extract ameliorate paracetamol induced oxidative stress and renal dysfunction in male mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **5**: S169-S174.
- Heidarian, E., and Nouri, A. 2019. Hepatoprotective effects of silymarin against diclofenac-induced liver toxicity in male rats based on biochemical parameters and histological study. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-7.
- Ka, S. O., Kim, K. A., Kwon, K. B., Park, J. W., and Park, B. H. 2009. Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, **23**(5):633-637.
- Kamal, A. 2014. Estimation of blood urea (BUN) and serum creatinine level in patients of renal disorder. *Indian J. Fundam Appl Life Sci*, **4**(4):199-202.
- Kamoun, Z., Kamoun, A.S., Bougatef, A., Kharrat, R.M., Youssfi, H., Boudawara, T., Chakroun, M., Nasri, M. and Zeghal, N. 2017. Hepatoprotective and nephroprotective effects of sardinelle (*Sardinella aurita*) protein hydrolysate against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, **24**(2):1432-1441.
- Kim, H.G, Kim, J.M., Han, J.M., Lee, J.S., Choi, M.K., Lee, D.S., Park, Y.H. and Son, C.G. 2014. Chunggan extract, a traditional herbal formula, ameliorated alcohol-induced hepatic injury in rat model. *World Journal of Gastroenterology*, **20**(42):15703-15714.
- Kim, S.H., Oh, D.S., Oh, J. Y., Son, T.G, Yuk, D.Y. and Jung, Y.S. 2016. Silymarin Prevents Restraint Stress-Induced Acute Liver Injury by Ameliorating Oxidative Stress and Reducing Inflammatory Response. *Molecules*, **21**:443.
- Latchoumycandane, C., Nagy, L.E. and McIntyre, T.M. 2014. Chronic Ethanol Ingestion Induces Kidney Oxidative Injury through Taurine-inhibitable Inflammation. *Free Radic Biol. Med.*, **69**:403-416.
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W. and Feng, Y. 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(11): 26087-26124.
- Lieber, C.S. 2000. ALCOHOL: Its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr.*, **20**:395-430.
- Maralla, S., Kesireddy, S. R. and Wudayagiri, R. 2012. Effect of ginger consumption on serum makers of general metabolism, liver and kidney functions and lipid profiles in ethanol induced withdrawal rats. *J. Pharm Res.*, **5**(1), 485-91.
- Nallagangula, K. S., Nagaraj, S. K., Venkataswamy, L. and Chandrappa, M. 2017. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Science, OA*, **4**(1): FSO250.
- Nandi, P. and Ghosh, S. N. 2016. Effect of medicinal plants as intercrop on plant and soil of Mosambi sweet orange grown in laterite oil. *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*, **2**(2), 11-13.

- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Biochem*, **95**: 351-358.
- Onalan, A.K., Tuncal, S., Kilicoglu, S., Celepli, S., Durak, E., Kilicoglu, B., Devrim, E., Barlas, A.M. and Kismet, K. 2016. Effect of silymarin on oxidative stress and liver histopathology in experimental obstructive jaundice model. *Actacirurgicabrasileira*, **31**(12): 801-806.
- Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E. A. and Elam, M. B. 2008. SREBPs: The crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **19**(2): 65-73.
- Rahman, M. M., and Fakir, M. S. A. 2015. Biodiversity of Medicinal Plants in Bangladesh: Prospects and Problems of Conservation and Utilization. *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*, **1**(1), 1-9.
- Raskovic, A., Jakovljevic, V., Popovic, M., Sabo, A. and Piljevic, O. 2002. Effect of Methoxsalen and an Infusion of Silybum marianum on Enzymes Relevant to Liver Function. *Pharmaceutical Biology*, **40**(1): 70-73.
- Rodrigo, R. and Rivera, G. 2002. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**(3):409-422.
- Salama, A. F., Tousson, E., Elfetoh, E. M., Elhaak, M. and Elawni, M. 2015. Effect of Egyptian plant Silybum marianum on the kidney during the treatment of liver fibrosis in female albino rats induced by alcohol in comparison to the medical silymarin from China. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **4**(3):557-570.
- Sugimoto, K. and Takei, Y. 2017. Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research*, **47**: 70-79.
- Suh, H. J, Cho, S. Y, Kim, E. Y. and Choi, H.S. 2015. Blockade of lipid accumulation by silibinin in adipocytes and zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, **227**:53-62
- Sun, H., Mu, T., Liu, X., Zhang, M. and Chen, J. 2014. Purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) anthocyanins: Preventive effect on acute and subacute alcoholic liver damage and dealcoholic effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(11): 2364-2373.
- Surai, P.F. 2015. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants*, **4**:204-247.
- Varga, Z. V., Matyas, C., Paloczi, J. and Pacher, P. 2017. Alcohol misuse and kidney injury: epidemiological evidence and potential mechanisms. *Alcohol research: current reviews*, **38**(2): 283-288.
- Wang, X., Liu, M., Zhang, C., Li, S., Yang, Q., Zhang, J., Gong, Z., Han, J. and Jia, L. 2018. Antioxidant activity and protective effects of enzyme-extracted *Oudemansiella radiata* polysaccharides on alcohol-induced liver injury. *Molecules*, **23**(2):481.
- Weckbercker G. and Cory, JG. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depended mouse leukaemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Lett.*, **40**:257-264.
- World Health Organization. WHO. 2018. Alcohol, Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf>
- You, M., and Arteel, G. E. 2019. Effect of ethanol on lipid metabolism. *Journal of Hepatology*, **70**(2):237-248.
- You, M., Fischer, M., Deeg, M.A. and Crabb, D. W. 2002. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *Journal of Biological Chemistry*, **277**(32): 29342-29347.
- Zaki, D., Abdel-Ghany, A. and Gomaa, A. 2019. Therapeutic Effect of Milk Thistle (*Silybum Marianum* L) Seeds on Carbon Tetrachloride - Induced Hepatotoxicity in Rats. *Alexandria Science Exchange Journal*, **40**:19-29.