

EFFETS PROTECTEURS DU POLYSACCHARIDE DE *CHAETOMORPHA LINUM* SUR LA TOXICITE INDUITE PAR LE ZINC ET LE CUIVRE SUR LES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET HEPATIQUES CHEZ DES SOURIS

PROTECTIVE EFFECTS OF POLYSACCHARIDE OF *CHAETOMORPHA LINUM* ON ZINC AND COPPER-INDUCED TOXICITY ON HEMATOLOGICAL AND HEPATIC PARAMETERS IN MICE

A. HAMZAOU^{1,4*}; A. FEKI^{1,4}; M. ELAROU^{1,4}; A. HELALI^{2,4}; O. BOUDAWARA³ ET I. BEN AMARA^{1,4}

1 : Laboratoire de Chimie Médicinale et Environnementale, Institut Supérieur de Biotechnologie, Université de SFAX, PB 261, Sfax, 3000, Tunisie

2 : Laboratoire des Sciences et Technologies de la Santé, Institut Supérieur des Sciences de la Santé, Université Hassan Ier, Serrat, Maroc

3 : Laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques, Sfax, Tunisie

4 : Faculté de médecine de Sfax, Université de Sfax-Tunisie.

* E-mail de l'auteur correspondant : asmahamzaoui35@gmail.com

Résumé

A l'heure actuelle, une attention particulière est portée sur les éléments métalliques tels que le zinc et le cuivre en raison de leur ubiquité, leur toxicité et de leur persistance dans l'environnement. Le présent travail est focalisé sur l'étude de l'impact des teneurs élevées en zinc et en cuivre sur les paramètres hématologiques et hépatiques chez des souris et l'évaluation de l'effet correcteur possible d'un polysaccharide extrait à partir de l'algue *Chaetomorpha linum*. Les animaux sont répartis en 7 groupes: témoin, traités par le Zinc (60mg/kg p.c), traité par le cuivre (33mg/kg p.c), traités par le zinc et le cuivre, et 3 groupes co-traités avec le polysaccharide (PS) à une dose de 200mg/kg. Les résultats révèlent que le zinc et/ou le cuivre ont provoqué des perturbations significatives au niveau des paramètres hématologiques et hépatiques via l'installation d'un stress oxydant. Cependant le co-traitement par le PS a permis de contrecarrer cette toxicité, ce qui confirme l'effet antioxydant intéressant de ce polymère.

Mots - clés: Zinc ; Cuivre ; Toxicité ; Polysaccharides ; Paramètres hépatiques.

Abstract

At present, particular attention is paid to metallic elements such as zinc and copper because of their ubiquity, their toxicity and their persistence in the environment. The present work is focused on the study of the impact of high levels of zinc and copper on hematological and hepatic parameters in mice and the evaluation of the possible corrective effect of a polysaccharide extracted from seaweed *Chaetomorpha linum*. The animals are divided into 7 groups: control, treated with Zinc (60mg/kg bw), treated with copper (33mg/kg bw), treated with zinc and copper, and 3 groups co-treated with the polysaccharide (PS) at a dose of 200mg/kg. The results reveal that zinc and/or copper caused significant disturbances in hematological and hepatic parameters via the onset of oxidative stress. However, co-treatment with PS counteracted this toxicity, which confirms the interesting antioxidant effect of this polymer.

Key – words : Zinc; Copper; Toxicity ; Polysaccharides; Hepatic parameters.

ملخص

في الوقت الحاضر، هناك اهتماما خاص للعناصر المعدنية مثل الزنك والنحاس بسبب انتشارها في كل مكان وسميتها واستمرارها في البيئة. يركز العمل الحالي على دراسة تأثير المستويات العالية من الزنك والنحاس على مستوى مقاييس الدم والكبد في الفئران وتقييم التأثير التصحيحي المحتمل لعدد السكريات المستخرجة من الأعشاب البحرية *Chaetomorpha linum*. تنقسم الحيوانات إلى 7 مجموعات: مجموعة المقارنة، المعالجة بالزنك (60 ملجم / كجم) من وزن الجسم، المعالجة بالنحاس (33 ملجم / كجم من وزن الجسم)، المعالجة بالزنك والنحاس، و 3 مجموعات تمت معالجتها باستخدام عديد السكريات (PS) (200 ملجم / كجم). أظهرت النتائج أن الزنك والنحاس سببا اضطرابات معنوية في مقاييس الدم والكبد من خلال بداية الإجهاد التأكسدي. ومع ذلك، فإن المعالجة المشتركة مع PS تصدت لهذه السمية، مما يؤكد التأثير المثير للأكسدة لهذا المركب الكيميائي.

الكلمات المفتاحية: الزنك؛ النحاس؛ التسمم؛ معلمات الكبد.

1. INTRODUCTION

Le problème de contamination environnementale est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents. Les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc, et le mercure ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. De plus, ils sont continuellement rajoutés dans les sols dans diverses activités : en agriculture pour l'application de boues d'épuration ou dans l'industrie métallurgique. L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement est toxique pour la santé des êtres humains et des animaux[1]. En particulier, le zinc et le cuivre sont indispensables à la croissance et au bien-être des organismes vivants. Cependant, à des concentrations élevées peuvent causer des lésions aux cellules germinales provoquant la stérilité[2].

Les êtres humains sont exposés au zinc et cuivre par inhalation des polluants aériens, la consommation d'eau contaminée, l'exposition à des sols contaminés de déchets industriels. En effet, il s'agit d'un problème d'actualité qui préoccupe toutes les régions soucieuses de maintenir leur patrimoine côtier à un haut degré de qualité [2]. Ces métaux peuvent être absorbés sous la forme inorganique ou sous la forme organique et peuvent être très dangereux pour la santé de l'Homme et pour les autres êtres vivants lorsqu'ils sont présents dans l'environnement à des concentrations élevée [3]. Dans le contexte de nombreuses études, la capacité des algues vertes d'accumuler les métaux lourds ainsi que la capacité de leurs molécules bioactives tels que les polysaccharides dans l'élimination des radicaux libres générés par ces métaux, a été étudiée [4]. Ces biopolymères sont connus et exploités depuis de nombreuses années du fait de leur abondance, de leur caractère renouvelable, de leur effet inoffensif, et de leur biodégradabilité[5]. En tant que biopolymères naturels, les polysaccharides sont stables, non toxiques, biodégradables et biocompatibles. Ils disposent de plusieurs ressources provenant des algues, des plantes, des micro-organismes et des animaux [6, 7]. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact des teneurs élevées en zinc et en cuivre sur les paramètres hématologiques et hépatiques ainsi l'évaluation de l'effet correcteur possible du polysaccharide extrait à partir l'algue verte *Chaetomorpha linum* sur des souris de souche Wistar, ont été réalisés.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Extraction de polysaccharide

50 g de la poudre végétale ont été mis avec 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est ensuite filtré sous vide pour récupérer le culot. On ajoute par la suite 1000 ml d'eau déionisée au culot, le mélange est centrifugé à 8000 rpm pendant 15 minutes pour séparer le culot du premier surnageant, cette opération a été répétée 2 fois successive. Les deux surnageants obtenus sont mélangés avec de l'éthanol absolu (v/2v). Le mélange a été mis en agitation pendant 18 h à +4°C, puis il est centrifugé à 8000 rpm pendant 30 minutes. Enfin le culot obtenu est séché par lyophilisation.

2.2 Animaux et élevage

Les animaux utilisés sont des souris de souche «Wistar» pèsent en moyenne prévenant 25 ± 2 g de la pharmacie centrale de Tunis. Les souris sont installées dans une animalerie dont la température et l'humidité sont voisines de 20°C et 60% avec une alternance de 12 h d'obscurité et 12 h de luminosité. Les animaux ont reçu une alimentation standard équilibrée énergétiquement composé de glucides, lipides, protides, vitamines et oligoéléments. L'eau de boisson est l'eau de robinet.

2.3 Protocole expérimental

Des souris sont subdivisées en 7 groupes :

- Le groupe 1 est considéré comme témoin ; Le groupe 2 reçoit $ZnSO_4$ (60mg/kg pc) par voie intraperitoneale ;
- Le groupe 3 reçoit $CuSO_4$ (33mg/kg pc) par voie intraperitoneale ;
- Le groupe 4 est traité simultanément par $ZnSO_4$ (60mg/kg pc) et $CuSO_4$ (33mg/kg pc) par voie intraperitoneale ;
- Le groupe 5 reçoit le $ZnSO_4$ (60mg/kg pc) avec une alimentation mélangée avec le polysaccharide extrait à partir de *Chaetomorpha linum* (200 mg/kg) ;
- Le groupe 6 reçoit $CuSO_4$ (33mg/kg pc) avec une alimentation mélangée avec le polysaccharide extrait à partir de *Chaetomorpha linum* (200 mg/kg) ;
- Le groupe 7 est traité simultanément avec le $ZnSO_4$ (60mg/kg pc) et le $CuSO_4$ (33mg/kg pc) via la voie intrapéritonéale et une alimentation

supplémentée du polysaccharide à une dose de 200 mg/kg (par gavage).

Les doses de cuivre ont été choisies de la littérature, elles provoquent une toxicité sans causer une mortalité [8], les doses de zinc ont été choisies selon Diwan et Al-Salim, (2010) [9].

La dose de polysaccharide est de 200 mg/kg a été testée dans notre laboratoire et a montré son efficacité à contrecarrer la toxicité [10].

2.4 Etudes des paramètres hématologiques

2.4.1 Numération de la formule sanguine ou hémogramme

La numération de la formule sanguine (NFS) est automatisée par l'appareil Sysmex XT- 2000i du laboratoire d'hématologie, CHU Habib Bourguiba de Sfax. Plusieurs paramètres hématologiques ont été déterminés, à savoir :

Le nombre de globules rouges est exprimé en GR/ μ l de sang ;

L'hématocrite (Ht) est exprimé en % ;

La concentration en hémoglobine (Hb) est exprimée en g/100ml du sang ;

Le volume globulaire moyen (VGM) est exprimé en mm³/GR ;

Le nombre de globules blancs est exprimé en GB/ μ l de sang ;

La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). C'est la quantité d'Hb contenue dans la masse globulaire, exprimée en g/100 ml ;

2.5 Paramètres du stress oxydant au niveau du foie

2.5.1 Dosage du glutathion réduit (GSH)

La méthode utilisée est celle d'Ellman (1959) [11]. Le glutathion réduit (GSH) réagit avec l'acide dithiodinitrobenzoïque (DTNB) et le produit de la réaction prend une coloration jaune. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 412 nm.

2.5.2 Détermination de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité SOD par le test NBT « nitrobluetetrazolium » est une méthode de photo réduction : la réduction du NBT par l'anion superoxyde O²⁻ est utilisé comme base de détection de la présence de SOD [12]. La densité optique de la SOD est de 580 nm. Et son activité est exprimée en pourcentage d'inhibition / mg de protéine.

2.5.3 Evaluation de la peroxydation lipidique par le taux de dialdéhyde malonique (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) peut être détecté par une réaction colorimétrique avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La technique utilisée est celle de Draper et Hadley (1994) [13]. La densité optique de chaque échantillon est déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 532 nm.

2.5.4 Détermination de l'activité glutathion peroxydase (GPx)

Ce dosage a été effectué selon la technique décrite par Flohé and Gunzier (1984) [14]. La GPx catalyse l'oxydation de cumène. En présence de Glutathion réductase (GR) et de NADPH, la Glutathion oxydée (GSSG) a été immédiatement convertie sous une forme réduite avec oxydation concomitante du NADPH en NADP⁺. La réduction de cette absorbance a été mesurée à 340 nm.

2.6 Techniques histologiques

Après anesthésie des souris et prélèvement du sang, des échantillons du foie ont été prélevés chez des souris témoins et traitées par le zinc et/ou le cuivre. Ils ont été immédiatement fixés, après leur prélèvement, dans une solution de formaldéhyde tamponnée à 10% pendant au moins 48 heures afin d'assurer une meilleure conservation et interprétation histologique.

2.7 Analyses statistiques

Les valeurs moyennes sont exprimées avec leur écart type, représentés sur les figures par un trait vertical (barre d'erreur). La comparaison des moyennes est estimée en utilisant le test-t de Student entre les deux groupes témoins et traités (Excel, 2007). La différence est considérée significative pour $p < 0,05$.

3. RESULTATS

3.1 Les paramètres hématologiques

Les résultats obtenus dans le tableau 1 ont révélé une variation de quelques paramètres hématologiques chez seulement les souris injectés par le zinc ou le cuivre, en comparaison avec les souris témoins suivi d'une diminution du nombre de globules rouges ainsi que le taux d'hémoglobine Hb et le pourcentage de l'hématocrite Ht chez les groupes traités avec le Zn associé ou non au Cu.

Une augmentation des plaquettes a été révélée chez les groupes intoxiqués en comparaison avec les souris témoins. Cependant, le co-traitement par le

PS a contrecarré la toxicité induite par les métaux lourds et a permis de rétablir les paramètres hématologiques à la valeur normale (Tableau 1).

Tableau 1 : Hémogramme des souris témoins et traitées par le zinc et le cuivre associé ou non à l'algue verte« *Chaetomorpha linum*»

Paramètres et traitement	GR 10 ⁶ / μ L	GB10 ³ / μ L	Hgb g/100ml	Ht %	VGM mm ³ /GR	MCH pg/GR	MCHC g/100 ml	Plt 10 ³ /mm ³
Témoin	11,68± 0,17	8,38± 0,87	13,11± 1,52	45,03± 4,95	53,63± 1,66	15,61± 0,76	29,1± 0,64	387,6± 8,66
Cu	8,9± 0,24**	6,79± 0,73*	11,26± 0,24*	40,46± 0,82	52,24± 0,96	14,07± 0,08	27± 0,2	1204,4± 163,29***
Zn	7,87± 0,75**	5,38± 0,06	8,9± 0,08**	30,22± 0,3***	51,22± 0,93***	12,67± 0,53***	29,45± 0,19	1474,75± 22,48***
Zn+ Cu	6,95± 0,66***	7,75± 0,03	11,2± 0,18*	34,4± 1,39***	48,75± 0,95	12,62± 0,74*	22,75± 2,5*	1580, 5± 9***
Zn+ PS	12,14± 0,38	8,93± 0,55	13,43± 0,91	46,01± 4,54	55,33± 1,03	15,03± 0,13	29,28± 1,35	359± 7,50
Cu +PS	11,17± 0,23	8,28± 0,02	12,27± 0,42	46,25± 1,70	52,7± 0,53	14,95± 0,41	29,15± 0,58	335± 0,95
Zn+ Cu+ PS	12,38± 0,16	8,22± 0,15	12,8± 0,27	48,4± 3,04	54,68± 1,53	15,7± 0,23	29,24± 1,25	457± 12,98

Traitées vs témoins : * p<0,05; ** : p<0,01 ; ***: p<0,001.

3.2 Stress oxydatif au niveau du foie

L'évaluation de la toxicité du Zn et du Cu sur les paramètres du stress oxydant au niveau du foie a révélé une augmentation significative des taux de

MDA (Figure 1), en comparaison au groupe témoin. En revanche, on a noté une diminution des taux des antioxydants de défense; SOD(Figure 2), GPx(Figure 3)et GSH (Figure 4) par rapport au groupe témoin.

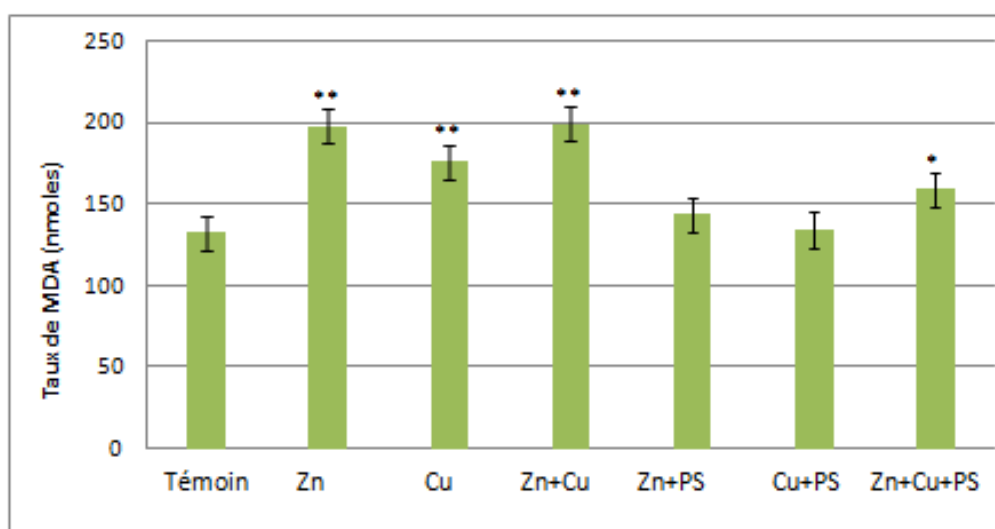


Fig 1 : Taux du MDA au niveau du foie chez des souris adultes, témoins et traités au zinc et au cuivre associés ou non au polysaccharide de l'algue verte «*Chaetomorpha linum*». Traités vs témoins : * p<0,05 ** : p<0,01;***: p<0,001

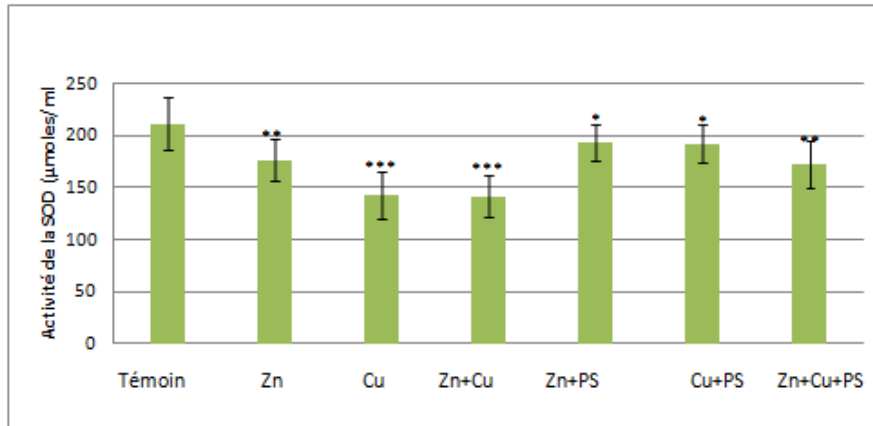


Fig 2 : Activité de la SOD au niveau du foie chez des souris adultes, témoins et traités au zinc et au cuivre associés ou non au polysaccharide de l’algue verte «*Chaetomorpha linum*». Traitées vs témoins: * p<0,05 ** : p<0,01;***: p<0,001

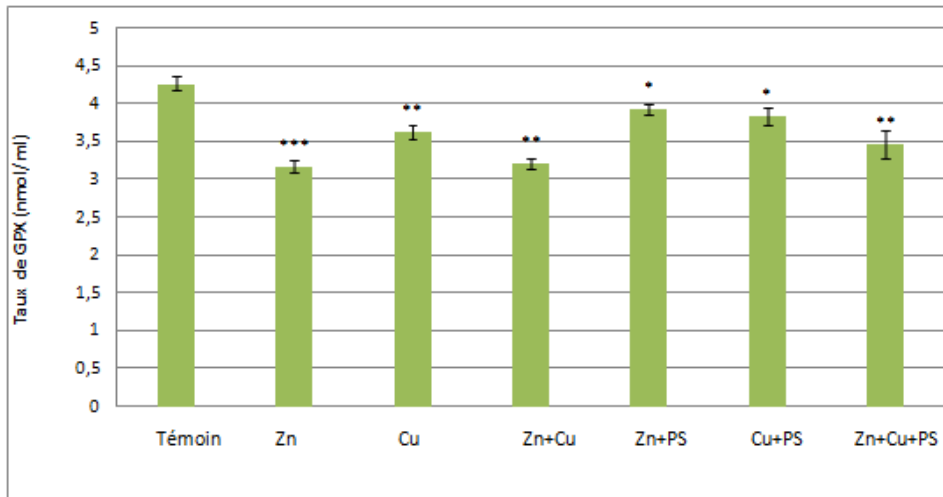


Fig 3 : Taux de GPx au niveau du foie chez des souris adultes, témoins et traités au zinc et au cuivre associés ou non au polysaccharide d’algue verte «*Chaetomorpha linum* ». Traitées vs témoins: * p<0,05 ** : p<0,01;***: p<0,001

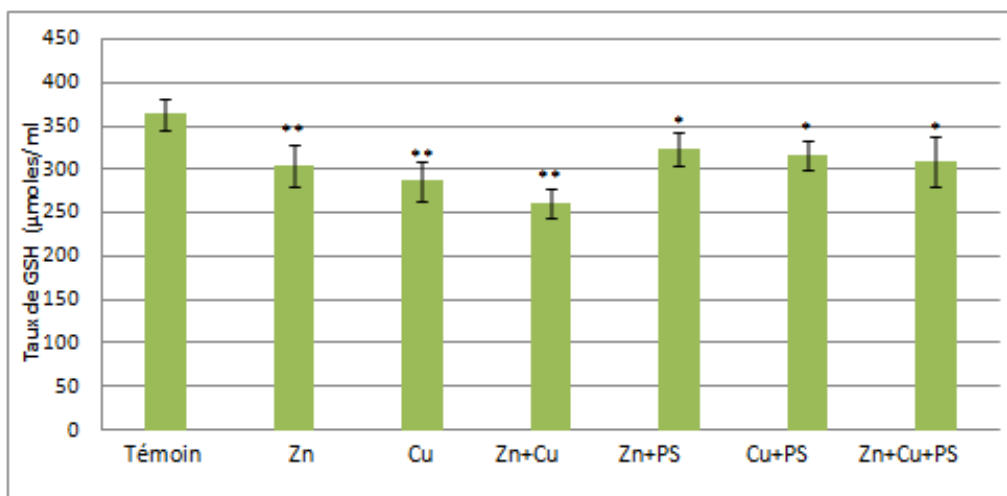


Fig 4 : Taux de GSH au niveau du foie chez des souris adultes, témoins et traitées pendant 21 jours au zinc et au cuivre associés ou non au polysaccharide d’algue verte «*Chaetomorpha linum* ». Traitées vs témoins : * p<0,05 ** : p<0,01;***: p<0,001

3.3 Observation histologique

Les coupes histologiques réalisées au niveau du foie sont présentées sur la figure 5. Selon les résultats, le traitement des souris par le zinc et le

cuivre a induit des dommages au niveau du foie en comparaison avec le témoin. En revanche, l'ajout du PS chez les souris traitées par ces métaux a permis de maintenir l'architecture du foie (**Figure 5**).

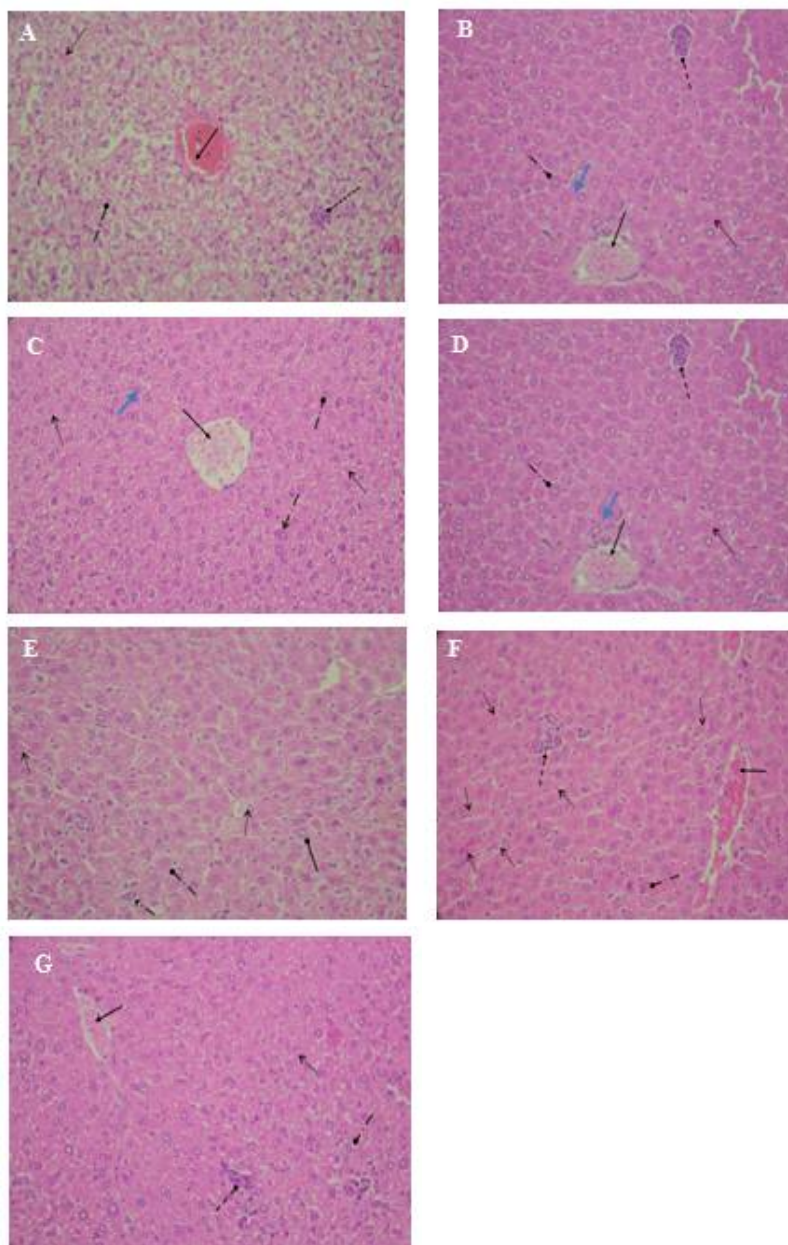


Fig 5 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine, réalisées au niveau du foie des souris témoins (A) ou traitées avec le Zn (B), Cu (C), Zn + Cu (D), Zn + PS (E), Cu + PS (F), Zn + PS + Cu (G), (G×400).

Les flèches indiquent :
 —> Veine centrale, —> Mitose, - - -> Infiltration
 —> leucocytaire, —> stéatose, - · -> vacuolisation, ·····> Nécrose, - · -> Hépatocyte, —●

4. DISCUSSION

Les éléments traces métalliques sont particulièrement toxiques pour l'environnement et l'homme. Certains d'entre eux n'ont pas une fonction biologique essentielle (ex : cadmium, plomb, mercure) alors que d'autres (ex : cuivre, zinc, fer, sélénium) sont indispensables à faibles concentrations pour le déroulement des processus biologiques, mais ils peuvent, cependant, être toxiques dès que leur concentration dans l'organisme dépasse un seuil variable qui va dépendre de la nature de l'élément et du tissu de l'organisme considéré [15, 16]. Ces éléments peuvent pénétrer dans le corps humain par inhalation, ingestion ou exposition cutanée. La présente étude a été conçue pour évaluer, chez des souris de souche Wistar, l'effet correcteur de polysaccharide extrait à partir de *Chaetomorpha linum* sur la toxicité induite par le zinc et le cuivre au niveau des paramètres hématologiques et hépatiques.

Les résultats montrent une variation des paramètres hématologiques chez les souris traitées pendant 15 jours par le zinc et/ou cuivre par rapport aux témoins. En effet nous avons obtenu une diminution du nombre de globules rouges ainsi que le taux d'hémoglobine (Hb) et le pourcentage de l'hématocrite (Ht) chez les groupes traités avec le zinc et le cuivre. Cette augmentation témoigne une anémie probablement microcytaire. Par contre, une augmentation du nombre de globules blancs généralement liée à une inflammation avec une augmentation des taux de plaquettes témoignant d'une thrombocytose, ont été notés. Le co-traitement par le polysaccharide extrait à partir de *Chaetomorpha linum* a corrigé ces perturbations. L'effet toxique du zinc pourrait être expliqué par l'accumulation des radicaux libres d'ions zinc (non connectés avec métallo-thionine) dans les cellules. En particulier les cellules graisseuses ont causé l'accumulation des lipides acides présents dans les globules rouges membranaires ce qui augmente la fragilité osmotique et facilite la destruction des RBC [9]. Le zinc peut aussi affecter le métabolisme du fer en augmentant la rotation du fer et en diminuant la durée de vie étendue des érythrocytes induisant ainsi une anémie. Également l'excès de cuivre peut être lié à sa capacité de générer les radicaux hydroxyle entraînant la production de réaction de fenton [17] et par conséquent l'installation d'un stress oxydant. Ce dernier est défini comme étant un déséquilibre entre la balance oxydant -antioxydant en faveur des premiers.

L'évaluation de la toxicité du Zn et Cu sur les paramètres du stress oxydant au niveau du foie des souris a été effectuée. Les résultats ont révélé une augmentation significative des taux de MDA en comparaison avec le groupe témoin. En revanche, on note une diminution des taux des antioxydants de défense; GPx, GSH et SOD par rapport au groupe témoin. Plusieurs études ont montré également la production des radicaux libres suite à l'intoxication avec ces métaux lourds [18, 19]. Cette toxicité semble également inhiber les glutathions réductases et les peroxydases; enzymes majeures et responsables des défenses antioxydantes [20]. Cette inhibition se fait essentiellement par interaction du Zn avec les groupements thiols localisés dans ou proche des sites actifs. Ces observations sont confortées par d'autres données qui ont suggéré que l'exposition des cellules du foie à 30 μ M de Zn se traduisait par une inhibition des enzymes à glutathion (GSH). Cette inhibition a pour conséquence la diminution du GSH, l'augmentation du GSSG et un déséquilibre de la balance oxydative en faveur des radicaux libres [21]. Le co-traitement du PS a significativement réduit les dommages hépatiques induits par l'excès de Zn et/ou Cu. L'amélioration du statut antioxydant est due à la capacité du PS à réduire le stress oxydant net de rétablir l'équilibre oxydant -antioxydant. Le rôle de protection du PS pourrait être attribué à ses activités antioxydantes importantes [22].

Les coupes histologiques des souris témoins ont montré un nombre important de leucocytes et d'hépatocytes normaux disposés radialement avec une veine centrale intacte et des voies biliaires. Pour les groupes traités par le Zn associé ou non au Cu une perturbation dans l'histo-architecture tissulaire hépatique a été notée, objectivée par une infiltration leucocytaire, une vacuolisation des hépatocytes, une dégénérescence des noyaux, une apparition de cellules nécrotiques et une stéatose. L'apparition d'une infiltration leucocytaire est considérée comme étant une réponse du tissu de l'organisme face à une intoxication. Ces anomalies confirment bien la toxicité du Zn et du Cu via l'installation d'un stress oxydatif qui pourrait endommager les constituants cellulaires en lipides, protéines et ADN [23, 24]. Toutefois, la supplémentation du PS réduit l'endommagement du foie et améliore les changements histologiques. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures réalisées par Kammoun et al, (2007) [10], suggérant l'efficacité des polysaccharides dans la réparation des dommages

causés par une intoxication chimique. Le mécanisme par lequel le polysaccharide exerce son action hépatoprotectrice peut être dû à ses propriétés biologiques à savoir son pouvoir antioxydant, son activité antibactérienne et anti-inflammatoire. En effet plusieurs études ont montré que les polysaccharides peuvent agir en tant qu'excellent piègeur de radicaux libres, inhibant l'oxydation des lipides et des protéines[25].

5. CONCLUSION

La toxicité induite par le zinc et le cuivre chez des souris de souche Wistar a induit des perturbations hématologiques objectivées par une anémie accompagnée par une inflammation. De plus, une hépatotoxicité a été également enregistrée chez les souris objectivées par l'installation d'un stress oxydant au niveau du foie suite à un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants. Des anomalies ont été signalés au niveau de l'histo-architecture du tissu hépatique ce qui confirme l'effet délétères des métaux au niveau du foie. Cependant le co-traitement des souris par le PS de *Chaetomorpha linum* a atténué significativement cette toxicité en améliorant les paramètres hématologiques, le système de défense antioxydant et l'aspect histologique du foie.

6. RÉFÉRENCES

- [1]M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B.B. Mathew, K.N. Beeregowda. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals, *Interdiscip Toxicol.* 2014; 60–72.
- [2]H.B. Bouih, H. Nassali, M. Leblans, A. Srhiri. Contamination en métaux traces des sédiments du lac Fouarat (Maroc), *Afr. Sci. Rev. Int. Sci. Technol.* 2005.
- [3]M. Nanda, D. Sharma, A. Kumar. Removal of heavy metals from industrial effluent using bacteria. *Int. J. Environ. Sci.* 2011; 765–780.
- [4]I. Moreno-Garrido, L.M. Lubián, A.M.V.M. Soares. Influence of Cellular Density on Determination of EC50 in Microalgal Growth Inhibition Tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000; 47: 112–116.
- [5]H.J. alipour, R. Masoud, B. Shabanpour. Effects of sulfated polysaccharides from green alga *Ulva intestinalis* on physicochemical properties and microstructure of silver carp surimi. *Food Hydrocoll.* 2018; 74 : 87–96.
- [6]N. Florez, M. Jesus, Gonzalez-Munoz, D. Ribeiro, E. Fernandes, H. Dominguez, M. Freitas, Algae polysaccharides' chemical characterization and their role in the inflammatory process, *Curr. Med. Chem.* 2017; 24:149–175.
- [7]B.G. Andryukov, N.N. Besednova, T.A. Kuznetsova, T.S. Zaporozhets, S.P. Ermakova, T.N. Zvyagintseva et al. Sulfated Polysaccharides from Marine Algae as a Basis of Modern Biotechnologies for Creating Wound Dressings: Current Achievements and Future Prospects. *Biomedicines.* 2020; 8: 301.
- [8]M.A. Fahmy, Potential Genotoxicity in Copper Sulphate Treated Mice. *Cytologia (Tokyo).* 2000; 65: 235–242.
- [9]M.A.A.- Diwan, I.J.H. Al-Salim. Effect of zinc toxicity on the blood parameters of the laboratory mice. *Kufa J. Vet. Med. Sci.* 2010; 1 : 132–145.
- [10]I. Kammoun, I. Bkhairia, F. Ben Abdallah, I. Jaballi, N. Ktari, O. Boudawara et al. Potential protective effects of polysaccharide extracted from *Ulva lactuca* against male reprotoxicity induced by thiachlopid. *Arch. Physiol. Biochem.* 2017; 123: 334–343.
- [11]G.L. Ellman. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82 : 70–77.
- [12]C. Beauchamp, I. Fridovich, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971; 44: 276–287.
- [13]H.H. Draper, M. Hadley. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation - ScienceDirect. 1990.
- [14]L. Flohé, W.A. Günzler, [12] Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol. Academic Press.* 1984: pp. 114–120.
- [15]P. Chappuis, J. Arnaud, M.C. Jaudon, R. Zawislak, J. Bellanger. Concentration of zinc, copper, selenium and aluminium in nutritive solutions for parenteral administration. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 1991: pp. 421–427.
- [16]L.M. Plum, L. RinK, H. Haase. *IJERPH | Free Full-Text | The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health.* 2010.
- [17]V. Kumar, J. Kalita, H.K. Bora, U.K. Misra. Temporal kinetics of organ damage in copper toxicity: A histopathological correlation in rat model. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2016; 81 : 372–380.
- [18]V. Erseçkin, H. Mert, K. İrak, S. Yildirim, N. Mert. Nephroprotective effect of ferulic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in female rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2020; 1–7.
- [19]Y. Farbood, A. Sarkaki, M. Mahdavinia, A. Ghadiri, A. Teimoori, F. Seif et al. Protective Effects of Co-administration of Zinc and Selenium Against Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease: Behavioral, Mitochondrial Oxidative Stress, and GPR39 Expression Alterations in Rats. *Neurotox. Res.* 2020.
- [20]A.G. Splittgerber, A.L. Tappel. Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions, *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 197 : 534–542.
- [21]M.-O. Parat, M.-J. Richard, J.-C. Béani, A. Favier. Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biol. Trace Elem. Res.* 1997; 60: 187–204.
- [22]A. Hamzaoui, M. Ghariani, I. Sellem, M. Hamdi, A. Feki, I. Jaballi, et al. Extraction, characterization and biological properties of polysaccharide derived from green seaweed "Chaetomorpha linum" and its potential application in Tunisian beef sausages. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020; 148 : 1156–1168.
- [23]L. Cai, X.-K. Li, Y. Song, M.G. Cherian. Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12: 2753–2763.
- [24]G.M. Bishop, R. Dringen, S.R. Robinson. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 42: 1222–1230.
- [25]N. Ktari, A. Feki, I. Trabelsi, M. Triki, H. Maalej, S.B. Slima et al. Structure, functional and antioxidant properties in Tunisian beef sausage of a novel polysaccharide from *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017; 98 : 169–181.