

Résumé

Le fer est un élément fondamental pour la croissance et le développement de la majorité des organismes vivants. Cependant, si les réserves de fer augmentent, une saturation complète de la transferrine et ensuite de la ferritine se produit. Un groupe de molécules chimiques hautement réactives comportant un ou plusieurs électrons non appariés se forment. Lorsque l'équilibre entre la production de ces radicaux libres et leur élimination par les antioxydants est perturbée, un stress oxydatif se produit dans l'organisme. Bien que certains médicaments chélateurs du fer et antioxydants synthétiques aient été développés, leur utilisation dans le domaine de la santé a été limitée en raison de leurs effets secondaires indésirables. Au cours de la dernière décennie, les plantes médicinales ont généralement suscité plus d'intérêt en tant que sources potentielles d'antioxydants naturels et en tant que sources de précurseurs de médicaments. Les jujubiers sont des plantes du genre *Ziziphus*, connues pour leur richesse en métabolites secondaires avec des activités biologiquement pertinentes incluant des activités chélatrices et antioxydantes. Cette étude a pour objectif de faire un screening de la composition nutritionnelle, minérale, phénolique, du potentiel antioxydant, chélateur et cytotoxique des extraits des différentes parties du fruit du *Ziziphus spina christi* et *Ziziphus lotus*. Le test de l'effet protecteur potentiel des extraits les mieux classés (en fonction de l'espèce et des différentes parties des plantes et des solvants) contre les dommages oxydatifs de l'ADN induits par le chlorure de fer ($FeCl_2$) a été réalisé in vivo sur des souris et in vitro sur des cellules eucaryote (*Tetrahymena pyriformis*) après avoir mis au point et validé une nouvelle technique d'extraction et de purification d'ADN des cellules par un surfactant (SDS 20%/ Triton X-100). Les résultats obtenus suggèrent que la composition phénolique la plus riche a été observée dans les extraits aqueux. Les résultats ont également révélé que les graines de *Ziziphus spina christi* ont des teneurs en minéraux, en composés nutritionnels et en polyphénols plus élevés et une activité antioxydante et chélatrice du fer plus importante que celles des fruits entiers, de la pulpe et des amandes. L'étude de cytotoxicité a montré que les extraits de graines ne sont pas cytotoxiques à des concentrations allant jusqu'à 1 mg/mL. Le prétraitement avec l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* a réduit de manière significative l'impact de la toxicité induite par $FeCl_2$, en empêchant l'accumulation du fer, modulé l'activité des enzymes antioxydantes, réduit la peroxydation des lipides et considérablement inhibé les dommages causés à l'ADN in vitro et in vivo. On conclut que l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* pourrait agir comme un agent chélateur du fer ayant des propriétés antioxydantes offrant une protection efficace contre les dommages oxydatifs de l'ADN et la toxicité induite par la surcharge en fer.

Abstract

Iron is a fundamental element for the growth and development of most living organisms. However, if iron reserves increase, a complete saturation of transferrin and then ferritin occurs. A group of highly reactive chemical molecules with one or more unpaired electrons are formed. When the balance between the production of these free radicals and their elimination by antioxidants is disturbed, oxidative stress occurs in the body. Although some iron chelating drugs and synthetic antioxidants have been developed, their use in health care has been limited due to their undesirable side effects. Over the past decade, medicinal plants have generally attracted more interest as potential sources of natural antioxidants and as sources of drug precursors. Jujube trees are plants of the genus *Ziziphus Mill.* known for their richness in secondary metabolites with biologically relevant activities including chelating and antioxidant activities. This study aimed at screening the nutritional, mineral, phenolic, antioxidant, chelating and cytotoxic potential of extracts from different fruit parts of *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus*. The test of the potential protective effect of the highest ranked extracts (depending on the species and different parts of the plants and solvents) against oxidative DNA damage induced by iron chloride ($FeCl_2$) was performed in vivo on mice and in vitro on eukaryotic cells (*Tetrahymena pyriformis*) after developing and validating a new method of extraction and purification of DNA by a surfactant SDS (20%) / Triton X-100. The results suggest that the highest phenolic composition was observed in the aqueous extracts. The results also revealed that seeds of *Ziziphus spina christi* had higher levels of minerals, nutritional compounds and polyphenols and higher antioxidant and iron chelating activity than those of whole fruits, pulp and almonds. In addition, seed extracts were not cytotoxic at concentrations up to 1 mg/mL. Pretreatment with the aqueous extract of *Ziziphus spina christi* seeds significantly reduced the impact of toxicity induced by $FeCl_2$ by preventing iron accumulation, modulated the activity of antioxidant enzymes, reduced lipid peroxidation and significantly inhibited DNA damage in vitro and in vivo. It could be concluded that the aqueous extract of *Ziziphus spina christi* seeds could act as an iron chelating agent with antioxidant properties providing effective protection against oxidative DNA damage and iron overload-induced toxicity.

Ez-zouhra EL MAAIDEN

Evaluation des effets protecteurs de biomolécules issues du jujubier sur la toxicité induite par le fer in vitro sur *Tetrahymena pyriformis* et in vivo sur des souris2020-2021,
Biologie, santé et environnement

Université Hassan 1^{er}
Centre d'Études Doctorales



Faculté des Sciences et Techniques
Settat

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Science de la vie et de la santé

Formation Doctorale: Biologie, santé et environnement

Spécialité: Biochimie, Biologie cellulaire et Moléculaire

Sous le thème

Evaluation des effets protecteurs de biomolécules issues du jujubier sur la toxicité induite par le fer in vitro sur *Tetrahymena pyriformis* et in vivo sur des souris

Présentée par :

Ez-zouhra EL MAAIDEN

Soutenu le: 12/04/2021 à 10h00

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. Abdel Khalid ESSAMADI	PES	Faculté des Sciences et Techniques Settat	Président
Pr. Halima LEBRAZI	PES	Faculté des Sciences Ben M'sick Casablanca	Rapporteur
Pr. Mustapha KABINE	PES	Faculté des Sciences Ain Chock Casablanca	Rapporteur
Pr. Abderrahman MOUJAHID	PES	Faculté des Sciences et Techniques Settat	Rapporteur
Pr. Hassan TAKI	PES	Faculté des Sciences Ben M'sick Casablanca	Examineur
Pr. Khadija MOUSTAID	PES	Faculté des Sciences et Techniques Settat	Co-Directrice de thèse
Pr. Boubker NASSER	PES	Faculté des Sciences et Techniques Settat	Directeur de thèse

Année Universitaire: 2020/2021

Remerciements

*Je suis très redevable à mes superviseurs, les Professeurs **NASSER Boubker** et **MOUSTAID Khadija**, pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce projet et pour leur orientation et leur soutien.*

*Je tiens également à remercier Docteur **EL KHARRASSI Youssef** pour ses précieux conseils, sa présence et ses encouragements pendant toutes ces années.*

Je souhaite présenter mes remerciements aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer et de discuter mes travaux. Je vous exprime toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

*Je suis particulièrement reconnaissante à Mr **ESSAMADI Abdelkhalid** et à Mr **JIE Ma** pour leur temps et leur patience et pour m'avoir enseigné les nombreuses compétences nécessaires pour ce travail. Je voudrai également remercier Mr **ULLAH Najeeb** pour avoir effectué l'analyse HPLC et Mr **Abdelghani Chakhchar** pour ses conseils concernant les analyses statistiques.*

*À ma mère, Mme **ESSFADI NAFISA**, à ma sœur, à mes frères, et à mes professeur **TALBI Najat** et **RABIAA Eddoha**, merci pour votre amour constant et inconditionnel, votre patience, vos encouragements et votre soutien.*

*Enfin, ma plus profonde gratitude va à mon mari, et toute la famille **ELKHALILI** qui m'ont toujours soutenu par ses précieux conseils.*

Je suis reconnaissante pour votre collaboration et vos encouragements.

On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.

HENRI POINCARÉ

Résumé

Le fer est un élément fondamental pour la croissance et le développement de la majorité des organismes vivants. Cependant, si les réserves de fer augmentent, une saturation complète de la transferrine et ensuite de la ferritine se produit. Un groupe de molécules chimiques hautement réactives comportant un ou plusieurs électrons non appariés se forment. Lorsque l'équilibre entre la production de ces radicaux libres et leur élimination par les antioxydants est perturbée, un stress oxydatif se produit dans l'organisme. Bien que certains médicaments chélateurs du fer et antioxydants synthétiques aient été développés, leur utilisation dans le domaine de la santé a été limitée en raison de leurs effets secondaires indésirables. Au cours de la dernière décennie, les plantes médicinales ont généralement suscité plus d'intérêt en tant que sources potentielles d'antioxydants naturels et en tant que sources de précurseurs de médicaments. Les jujubiers sont des plantes du genre *Ziziphus*, connues pour leur richesse en métabolites secondaires avec des activités biologiquement pertinentes incluant des activités chélatrices et antioxydantes. Cette étude a pour objectif de faire un screening de la composition nutritionnelle, minérale, phénolique, du potentiel antioxydant, chélateur et cytotoxique des extraits des différentes parties du fruit du *Ziziphus spina christi* et *Ziziphus lotus*. Le test de l'effet protecteur potentiel des extraits les mieux classés (en fonction de l'espèce et des différentes parties des plantes et des solvants) contre les dommages oxydatifs de l'ADN induits par le chlorure de fer (FeCl_2) a été réalisé in vivo sur des souris et in vitro sur des cellules eucaryote (*Tetrahymena pyriformis*) après avoir mis au point et validé une nouvelle technique d'extraction et de purification d'ADN des cellules par un surfactant (SDS 20%/ Triton X-100). Les résultats obtenus suggèrent que la composition phénolique la plus riche a été observée dans les extraits aqueux. Les résultats ont également révélé que les graines de *Ziziphus spina christi* ont des teneurs en minéraux, en composés nutritionnels et en polyphénols plus élevés et une activité antioxydante et chélatrice du fer plus importante que celles des fruits entiers, de la pulpe et des amandes. L'étude de cytotoxicité a montré que les extraits de graines ne sont pas cytotoxiques à des concentrations allant jusqu'à 1 mg/mL. Le prétraitement avec l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* a réduit de manière significative l'impact de la toxicité induite par FeCl_2 , en empêchant l'accumulation du fer, modulé l'activité des enzymes antioxydantes, réduit la peroxydation des lipides et considérablement inhibé les dommages causés à l'ADN in vitro et in vivo. On conclut que l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* pourrait agir comme un agent chélateur du fer ayant des propriétés antioxydantes offrant une protection efficace contre les dommages oxydatifs de l'ADN et la toxicité induite par la surcharge en fer.

Mots-clés : fer ; stress oxydatif; ADN; *Ziziphus*; toxicité; chélateur du fer

Abstract

Iron is a fundamental element for the growth and development of most living organisms. However, if iron reserves increase, a complete saturation of transferrin and then ferritin occurs. A group of highly reactive chemical molecules with one or more unpaired electrons are formed. When the balance between the production of these free radicals and their elimination by antioxidants is disturbed, oxidative stress occurs in the body. Although some iron chelating drugs and synthetic antioxidants have been developed, their use in health care has been limited due to their undesirable side effects. Over the past decade, medicinal plants have generally attracted more interest as potential sources of natural antioxidants and as sources of drug precursors. Jujube trees are plants of the genus *Ziziphus Mill.* known for their richness in secondary metabolites with biologically relevant activities including chelating and antioxidant activities. This study aimed at screening the nutritional, mineral, phenolic, antioxidant, chelating and cytotoxic potential of extracts from different fruit parts of *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus*. The test of the potential protective effect of the highest ranked extracts (depending on the species and different parts of the plants and solvents) against oxidative DNA damage induced by iron chloride (FeCl_2) was performed in vivo on mice and in vitro on eukaryotic cells (*Tetrahymena pyriformis*) after developing and validating a new method of extraction and purification of DNA by a surfactant SDS (20%) / Triton X-100. The results suggest that the highest phenolic composition was observed in the aqueous extracts. The results also revealed that seeds of *Ziziphus spina christi* had higher levels of minerals, nutritional compounds and polyphenols and higher antioxidant and iron chelating activity than those of whole fruits, pulp and almonds. In addition, seed extracts were not cytotoxic at concentrations up to 1 mg/mL. Pretreatment with the aqueous extract of *Ziziphus spina christi* seeds significantly reduced the impact of toxicity induced by FeCl_2 by preventing iron accumulation, modulated the activity of antioxidant enzymes, reduced lipid peroxidation and significantly inhibited DNA damage in vitro and in vivo. It could be concluded that the aqueous extract of *Ziziphus spina christi* seeds could act as an iron chelating agent with antioxidant properties providing effective protection against oxidative DNA damage and iron overload-induced toxicity.

Keywords: Iron; oxidative stress; DNA; *Ziziphus*; toxicity; iron chelator.

Table de matière

Remerciements	I
Résumé	IV
Abstract	VII
Table de matière	XI
Productions scientifiques	XIV
Liste des figures	XIX
Liste des tableaux	XXI
Liste des abréviations	XXII
Introduction générale	1
Étude bibliographique	6
I. Fer	7
1. Généralités	7
2. Origine du fer	7
3. Rôle biologique du Fer	11
4. Fer et toxicité	12
5. Troubles liés à la surcharge de Fer	14
6. Thérapie de chélation de fer	14
II. Le stress oxydatif	15
1. Généralités	15
2. Les Espèces réactives de l'oxygène	15
2.1. Superoxyde anion	16
2.2. Peroxyde d'hydrogène	16
2.3. Le radical hydroxyle	17
2.4. L'oxygène singulet	17
2.5. Peroxynitrite	17
3. Les effets néfastes du stress oxydatif	17
4. Les systèmes de défenses antioxydantes	19
4.1. Systèmes enzymatiques antioxydants	19
4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	20
III. Généralités sur le jujubier	21
1. Classification systématique du jujubier	21
2. Aire de répartition géographique	21
3. Description botanique	22

4. Intérêt socioéconomique	23
IV. Biomolécules à intérêt biologiques et pharmacologiques issues du jujubier	24
1. Composition phytochimique	24
1.1. Alcaloïdes cyclo-peptidiques.....	24
1.2. Flavonoïdes	25
1.3. Saponines.....	25
1.4. Terpénoïdes	25
1.5. Autres composés	25
2. Propriétés pharmacologiques	26
2.1. Activité antidiabétique	26
2.2. Activité anti-inflammatoire	27
2.3. Activité antimicrobienne	27
2.4. Activité anti-nociceptive.....	28
2.5. Activité antioxydante.....	28
2.6. Activité antiplasmodiale.....	29
Article 1. Genre <i>Ziziphus</i> : une revue complète des propriétés phytochimiques, ethnopharmacologiques et pharmacologiques	29
Matériels et méthodes	47
I. Composition phytochimique et activités antioxydantes de <i>Z. Spina Christi</i> et <i>Z. Lotus</i>	48
1. Matériel végétal	48
1.1. Récolte et séchage	48
1.2. Préparation des extraits	49
2. Composition chimique.....	49
2.1. Teneur en substances volatiles.....	49
2.2. Teneur en lipides	49
2.3. Teneur en matière minérale.....	50
2.4. Teneur en protéines	50
2.5. Teneur en sucre	51
2.6. Dosage des minéraux.....	51
2.7. Screening phytochimique	51
2.8. Dosage des polyphénols	52

2.8.1. Phénol.....	52
2.8.2. Flavonoïdes	53
2.8.3. Tanins	53
2.8.4. Anthocyanine	54
2.8.5. Proanthocyanidine.....	54
2.8.6. Flavan-3-ol.....	55
2.9. Identification et dosage des metabolites secondaires par chromatographie liquide à haute performance.....	55
3. Potentiel antioxydant des extraits	56
3.1. Activité de piégeage des radicaux 2,2-diphényl picryl-hydrazine.....	56
3.2. Chélation des ions ferreux	57
3.3. Activité de piégeage des radicaux 2,2'-azino-bis (acide 3 éthyl- benzothiazoline-6-sulfonique)	57
3.4. Capacité d'absorption des radicaux libres	58
3.5. Capacité de réduction des ions cuivriques	58
3.6. Pouvoir antioxydant réducteur ferrique	58
3.7. Blanchissement du β -carotène.....	59
II. Effet protecteur des extraits de Ziziphus contre la toxicité induite par le Fer : étude in vivo et in vitro	60
1. Modèle expérimental	60
1.1. Module Cellulaire.....	60
1.2. Modèle animal.....	60
2. Conditions de culture.....	60
2.1. Conditions de culture des cellules	60
2.2. Conditions d'élevage des souris	60
3. Traitements	60
3.1. Traitement des cellules.....	60
3.1.1. Traitement par chlorure de fer (II).....	60
3.1.2. Traitement par les extraits.....	61
3.1.3. Co-trématent.....	61
3.2. Traitement et sacrifice des souris.....	61
4. Évaluation de la toxicité de fer	62
4.1. Évaluation de la toxicité sur les cellules.....	62

4.2. Évaluation de la toxicité sur les souris	63
5. Évaluation de l'accumulation de fer in vitro	63
5.1. Test de ferrozine.....	63
5.2. Coloration de Perls.....	63
6. Préparation des homogénats.....	64
6.1. Homogénat des cellules	64
6.2. Homogénat des organes	64
7. Dosage des protéines.....	64
8. Évaluation des marqueurs de stress oxydatif	65
8.1. Catalase	65
8.2. Superoxyde Dismutase.....	65
8.3. Glutathion Peroxydase	66
8.4. Glutathion réduit	66
9. Dosage du malondialdéhyde	67
10. Évaluation du dommage d'ADN	67
10.1. Extraction de l'ADN.....	67
10.1.1. ADN de <i>Tetrahymena pyriformis</i>	67
10.1.2. ADN des organes des souris	67
10.2. Dosage d'ADN.....	69
10.3. Électrophorèse sur gel d'agarose	69
10.4. Amplification par réaction en chaîne de la polymérase du gène de la métallothionéine (MT).	69
10.5. Analyse du produit de digestion de PCR avec l'enzyme de restriction Hindi III Digestion.....	70
11. Analyse Statistique	70
Résultats et discussion.....	71
Chapitre 1. Etude comparative du contenu phytochimique de <i>Ziziphus spina christi</i> et de <i>Ziziphus lotus</i> du Maroc (Article 2)	72
Introduction.....	72
Article 2.....	72
Discussion	83

Chapitre 2. Variation des teneurs en minéraux, en polyphénols et de l'activité antioxydante des différentes parties de fruit des espèces de <i>Ziziphus</i> cultivées au Maroc (Article 3)	86
Introduction.....	86
Article 3.	87
Discussion	95
Chapitre 3. Effet protecteur de <i>Ziziphus spina-christi</i> contre le stress oxydatif et les dommages d'ADN induits par le Fer chez <i>Tetrahymena pyriformis</i> (Article 4 et 5)	97
Introduction.....	97
Article 4.....	99
Article 5.....	111
Discussion.....	123
Chapitre 4. Effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de <i>Ziziphus spina christi</i> contre le stress oxydatif induit par le fer chez les souris	127
I. Introduction	127
II. Résultats.....	152
1. Évaluation de l'effet des traitements sur les comportements des souris et suivi des masses relatives des organes	128
2. Évaluation de l'effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de <i>Z. spina christi</i> contre le stress oxydatif induit par le fer.....	152
3. Évaluation de l'effet protecteur d'extrait aqueux des graines de <i>Z. spina christi</i> contre la peroxydation lipidique induite par le fer	131
4. Évaluation de l'effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de <i>Z. spina christi</i> contre la fragmentation de l'ADN induite par le fer	131
III. Discussion.....	132
Conclusion générale et perspectives.....	135
Références bibliographiques	139
Annexes	152

*Productions
scientifiques*

Publications dans le cadre de thèse

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. **2018**. Comparative study of phytochemical profile between *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus* from Morocco. Journal of Food Measurement and Characterization. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9925-y>

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. **2019**. Improved Method for DNA Extraction and Purification from *Tetrahymena pyriformis*. Methods Protoc. 2 (2), 40. <https://doi.org/10.3390/mps2020040>

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Essamadi, A.K., Nasser, B., Moustaid, K. **2020**. Variation in minerals, polyphenolics and antioxidant activity of pulp, seed and almond of different *Ziziphus* species grown in Morocco. Brazilian Journal of Food Technology. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20619>

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Qarah, N.A.S., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B., **2020**. Genus *Ziziphus*: A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological properties, Journal of Ethnopharmacology. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112950>

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Qarah, N.A.S., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. **2021**. Chemical composition and evaluation of protective effect of *Ziziphus spina-christi* L. against iron-induced oxidative DNA damage in *Tetrahymena pyriformis*. Journal of Food Measurement and Characterization (*In press*).

Autres publications

Nagib A. S. Q., Sameer A. M., Faisal K., **El Maaidene, E.** **2019**. New applications for amoxicillin determination in pure form and pharmaceuticals based on iodate-iodide mixture: titrimetry and spectroscopy studies. Quim. Nova, Vol. XY, No. 00, 1-6, 200. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170455>

El Kharrassi, E., **El Maaiden, E.**, Abdelghani, C., Lamaoui, M., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. **2020**. Physicochemical, phytochemical and antioxydants proprieties of juice and seed oil of cactus pear *Opuntia aequatorialis* and *Opuntia leucotoricha*. [VTOS-D-20-00018](https://doi.org/10.1590/1981-6723.20-00018)

Ullah, N., **El Maaiden, E.**, Sahab Uddin, Md., Ashraf Ghulam, Md. **2020**. Synaptotagmin-1: A Multi-Functional Protein in Vesicle Docking, Priming and Fusion. Current Protein & Peptide Science. [BMS-CPPS-2020-HT9-677-13](#)

Sameer, A.M., Faisal, K.A., Qarah, N.A.S., Basavaiah, K., **El Maaiden, E.** **2021**. Development of non-aqueous titrimetric and spectrophotometric methods for the determination of valganciclovir hydrochloride in bulk drug and tablets. Ann Pharm Fr. S0003-4509(21) 00011-0. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2021.01.010>

Mabrouk, A., Abbas, Y., El Goumi, Y., **El Maaiden, E.**, El Kharrassi, Y., EL Antry-Tazi, S., EL Mzouri, E., Fakiri, M. **2021**. Optimization of the micropropagation of prickly pear *Cacti (opuntia spp)* using the response surface method. [D-1577-7479-1-4-20190422](#) (In press)

Oubaidou, R., Hentour, S., Houasli, S., Aboutayeb, R., El Goumi, Y., **El Maaiden, E.**, Gaboun, F., Lamsaouri, O., Fakiri, M. **2021**. Evaluating salt tolerance in doubled haploid barley lines using a multivariable screening approach. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (Under review).

Articles en cours de publication

El Maaidan, E., Ullah, N. **2021**. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): A brief perspective from the front line (Review)

El Maaiden, E., Chakhchar, A., El Kharassi, Y., Qarah, N.A.S., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. Phenolic profiling, cholinesterase, β -amyloid aggregation inhibitory and cytotoxic activities of *Ziziphus lotus Lam.*

El Maaiden, E., El Kharassi, Y., Qarah, N.A.S., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. Induction of Mitochondrial Dysfunction and DNA Oxidative damage in *tetrahymena pyriformis* by Chronic Exposure to Iron Chloride.

El Maaiden, E., El Kharassi, Y., Qarah, N.A.S., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. Protective effect of *Ziziphus spina christi* against Iron toxicity: Possible biochemical, oxidative stress and DNA damage in mice.

El Maaiden, E., El Kharassi, Y., Qarah, N.A.S., Essamadi, A.K., Moustaid, K., Nasser, B. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: The Mitochondria-Iron Link (Review).

Communication oral

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Moustaid Khadija, Essamadi, Abdel Khalid, Nasser Boubker. Comparative study of phytochemical profile between *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus* from Morocco. Afro-Mediterranean Conference on Multidisciplinary Research & Applications 07-08 July 2018, Rabat, Morocco.

Ezzouhra Elmaaiden, Youssef El Kharrassi, Khadija Moustaid, Habiba Bouchab, Abdel Khalid Essamadi and Nasser Boubker. Total phenolic content, radical scavenging activity and lipid peroxidation inhibition of the essential oil and various extracts from 25 Aromatic and Medicinal Plants. 1st International Congress of Green Biotechnology for Sustainable Agriculture (ICGB), November 1- 3, 2018, Taroudant, Morocco.

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Moustaid Khadija, Lamaoui Mouna, Essamadi Abdel Khalid, Boubker Nasser. Composition phénolique et évaluation du pouvoir antioxydants des extraits du jujubier (*Ziziphus spina christi* et *Ziziphus lotus*). 7eme Symposium international des plantes aromatiques et médicinales. 19 Avril 2019, El Jadida, Morocco.

Ezzouhra Elmaaiden, Youssef El Kharrassi, Khadija Moustaid, Abdel Khalid Essamadi and Nasser Boubker. Bioactive compounds and antioxidant effects of consecutive extracts from Moroccan *Ziziphus* (*Z. Spina-christi* and *Z. Lotus*). 7th International Congress of Toxicology Poison Control and Pharmacovigilance Center of Morocco (CAPM), October 11-13, 2018, Rabat, Morocco.

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Essamadi Abdel Khalid, Moustaid Khadija, Boubker Nasser. Essential nutriments and phytochemical compounds of *Ziziphus* grown in Morocco. 7eme Edition de la journée doctorants CEDOC, 02 Mai 2019, Settat, Morocco.

Communication par affiche

Ezzouhra Elmaaiden, Youssef El Kharrassi, Khadija Moustaid, Abdel Khalid Essamadi and Nasser Boubker. Biochemical characterization and nutritional properties of *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus*. pulp. 1st International Congress of Green Biotechnology for Sustainable Agriculture (ICGB), November 1- 3, 2018, Taroudant, Morocco.

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Moustaid Khadija, Lamaoui Mouna, Essamadi Abdel Khalid, Boubker Nasser. Effect of extraction solvents on bioactive

compounds and antioxidant activities of *Ziziphus lotus*. 2nd International Day in Process Engineering for Sustainable Development, November **2018**, Settat, Morocco.

Ezzouhra Elmaaiden, Youssef El Kharrassi, Khadija Moustaid, Habiba Bouchab, Abdel Khalid Essamadi and Nasser Boubker. Protective effects of *Ziziphus* extracts on iron induced in vivo toxicity (*Tetrahymena pyriformis*). 7th International Congress of Toxicology Poison Control and Pharmacovigilance Center of Morocco (CAPM), October 11-13, **2018**, Rabat, Morocco.

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Essamadi Abdel Khalid, Boubker Nasser, Moustaid Khadija. Variation in mineral phenolic and antioxidant composition of *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus*. Teme Edition de la journée doctorants CEDOC, 02 Mai **2019**, Settat, Morocco.

Liste des figures

Figure 1 :	Caractéristiques chimiques du fer	31
Figure 2 :	Structure d'hémoglobine humaine	32
Figure 3 :	Absorption intestinale du fer	33
Figure 4 :	Métabolisme et régulation du fer	36
Figure 5 :	Mécanisme de surcharge et de toxicité du fer	37
Figure 6 :	Origine des différents radicaux libres impliqués en stress oxydatif.	40
Figure 7 :	Effets néfastes du stress oxydatif	42
Figure 8 :	Principales classes de dommages de l'ADN	43
Figure 9 :	Principal système de défense antioxydant enzymatique in vivo	44
Figure 10 :	Différentes parties de <i>Ziziphus jujube</i>	47
Figure 11:	Conditions géographiques et écologiques des sites de récolte de <i>Ziziphus spina christi</i> et <i>Ziziphus lotus</i>	72
Figure 12:	Protocole d'extraction et purification d'AND de <i>Tetrahymena pyriformis</i> par le surfactant SDS 20%/Triton X-100	92
Figure 13 :	Évolution de la masse relative des organes ou cour des traitements	152
Figure 14 :	Effet protecteur d'extrait aqueux des graines de <i>Z. Spina christi</i> contre le stress oxydatif induit par le chlorure de fer (FeCl ₂) : a) Glutathion peroxydase (GPx), b) Catalase, c) Superoxyde dismutase (SOD).	154
Figure 15 :	Niveau de MDA dans les tissus des souris témoins et traités.	155
Figure 16 :	Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN provenant des différents organes par analyse du (A) foie (B) cerveau (C) reins (D) cœur.	156
Figure 17 :	L'activité cellulaire est évaluée par le test MTT.	181
Figure 18 :	Histogrammes de cytométrie en flux dérivés de diagrammes de dispersion montrant la fluorescence de <i>Tetrahymena pyriformis</i> vivant ou mort colorée par iodure Propidium (PI) après 24 h d'incubation avec du chlorure de fer (II) (0-3mM).	181
Figure 19 :	Teneur en fer intracellulaire évaluée par le dosage colorimétrique à base de ferrozine (A) et la coloration au bleu de Prusse de Perl (B).	182
Figure 20 :	Changements dans les activités des enzymes de stress oxydative après 24 h d'incubation avec du chlorure de fer (II) (0-3mM) pendant des intervalles de temps variables	183
Figure 21 :	Électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait de <i>Tetrahymena pyriformis</i> exposé à différentes concentrations de chlorure de fer (II) pendant des intervalles de temps variables	184
Figure 22 :	Analyse par électrophorèse pour l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase du gène de la métallothionéine (MT).	185
Figure 23 :	Analyse par électrophorèse du produit de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) après digestion avec l'enzyme de restriction Hindi III Digestion.	185

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Teneur en fer de divers aliments	34
Tableau 2 :	Répartition géographique des espèces de jujubier	46
Tableau 3 :	Composition des groupes expérimentaux des souris	86
Tableau 4 :	Séquences d'amorces, concentrations finales et températures d'annelage des amorces utilisées pour mesurer la dégradation de l'ADN	93
Tableau 5 :	Teneur en métabolites secondaires dans les différents extraits des diverses parties de <i>Z. spina christi</i> et <i>Z. lotus</i>	177
Tableau 6 :	Activité totale de piégeage des radicaux dans différents extraits des diverses parties de <i>Z. spina christi</i> et <i>Z. lotus</i>	178
Tableau 7 :	Analyse par HPLC-DAD-QTOF-MS de la teneur en composés phénoliques	180

Liste des abréviations

A

AB : Acide borique
ABTS : 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ADN : Acide désoxyribonucléique

B

BrEt : Bromure d'éthidium
BSA : bovin sérum albumine

C

Ca : Calcium
CAT : Catalase
CUPRAC: cupric reducing antioxydant capacity

D

DAD : Détecteur à barrettes de diodes
Dcyt b : Duodéal cytochrome b
DMT 1 : Divalent métal transporter 1
DNTPS : Désoxynucléotide
DPPH : Radicaux 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
DTNB : 5-5'-dithiobis (acide -2-nitrobenzoïque)

E

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
ERO : Espèces réactives de l'oxygène

F

FDA: Food and Drug Administration
Fe: Fer
Fe²⁺ : Fer ferreux
Fe³⁺ : Fer ferrique
FeCl₂ : Chlorure de fer (II)
FeCl₃ : Chlorure de fer (III)
Fe-S : Fer-soufre
Fpn1 : ferroprotéine 1
FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

G

GPx : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit

H

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAB : Hydroxyanisole butyle
HBT : Hydroxytoluène butyle
HFE : Hémochromatose héréditaire

L

LIP : pool de fer labile
LO[•] : Radicaux alcoyle
LOOH : Hydroperoxydes lipidiques

M

MDA : Malondialdehyde
Mg : Magnésium
MM : Matières minérales
MT : Métallothionéine
MTT : 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

N

Na : Sodium
NADH : Ubiquinone oxydoréductase
NBT : Nitrobleu de tétrazolium
NO[•] : Oxyde nitrique
NO₂: Dioxide d'azote

O

O₂^{•-} : Superoxyde anion
ONOO⁻ : Peroxynitrite
ORAC : Capacité d'absorption des radicaux libres

P

PG : Gallate de propyle
PBS : Solution saline tamponnée au phosphate
PRAP : Puissance antioxydant réductrice de phosphomolybdène

S

SOD : Superoxyde dismutase
SDS : sulfate de dodécyl de sodium

T

TEP : Tetrahymena pyriformis
Tf : Transferrine
TL : Teneur en lipides
TMO : Teneur en matière organique
TNB : 5-Thio-2-nitrobenzoate
TPTZ : 2,4,6-tri(2-pyridyl) -striaizine

U

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

Introduction générale

Le fer est un élément cofacteur qui joue un rôle critique dans de nombreuses procédures biologiques, comme le transport de l'oxygène et des électrons ou la synthèse de l'ADN (Halliwell, et al., 2007). Les organismes vivants développent des systèmes de protéines pour transporter le fer à travers les membranes cellulaires et le stocker sous une forme non toxique qui peut être facilement mobilisée en cas de besoin (Beaumont, et al., 2000). Ainsi, une proportion importante du fer se trouve dans l'hémoglobine, et les enzymes respiratoires (Silva, et al., 2015). Le fer des réserves est totalement capturé par la ferritine, la principale protéine de stockage intracellulaire (Low, et al., 2016). Enfin, une petite fraction du fer est présente dans le plasma lié à la transferrine (Tf), une protéine plasmatique qui le transporte vers les cellules (Silva, et al., 2015). Il existe une autre forme de fer qui joue un rôle important dans l'homéostasie du fer mitochondrial : les structures fer-soufre (Fe-S), assemblées dans les mitochondries, qui sont des cofacteurs pour de nombreuses protéines mitochondriales et certaines protéines cytosoliques (Chen, et al., 2012). Lorsqu'il est sous forme libre, le fer est sensible aux réactions redox conduisant à la formation de radicaux libres, qui peuvent générer un stress oxydatif (Khali, et al., 2017). Les dommages d'ADN par le fer reposent très probablement sur la production intermédiaire d'espèces réactives de l'oxygène et sur l'induction du stress oxydatif (Pietrangel, 2016). La formation des radicaux hydroxyles induits par le fer peut générer une multiplicité de modifications des bases de l'ADN dans la chromatine rénale des animaux, et des réticulations des protéines de l'ADN isolé (Toyokuni, et al., 1994). Ainsi, l'accumulation de lésions de l'ADN pourrait avoir des conséquences considérables pour la cellule en termes de mutagenèse et de carcinogenèse (Floyd, 1994).

Les processus d'oxydation sont intrinsèques à la gestion de l'énergie de tous les organismes vivants et sont, par conséquent, maintenus sous un contrôle strict par plusieurs mécanismes cellulaires (Halliwell, et al., 2007). Cependant, le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la formation et la neutralisation des prooxydants (Harza, et al., 2008). Le stress oxydatif induit la dégradation de diverses macromolécules cellulaires, cette dégradation pouvant entraîner de nombreuses maladies, notamment le diabète, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'arthrite, l'anémie, l'asthme, l'inflammation, les maladies neurodégénératives et la carcinogenèse (Frohlich, et al., 2008). Les antioxydants sont considérés comme de possibles agents de protection réduisant les dommages oxydatifs du corps humain lorsque les mécanismes enzymatiques internes échouent ou sont insuffisamment efficaces (Halliwell, et al., 2007). Les polyphénols, tels que les dérivés phénoliques et les flavonoïdes, sont également connus pour leur capacité à empêcher les acides gras de se dégrader par oxydation et à apporter une valeur ajoutée aux plantes utilisées comme ingrédients alimentaires (Fecka,

et al., 2007). Ces composés ont des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Les composés phénoliques sont capables de régénérer le tocophérol endogène dans la bicouche phospholipidique des particules lipoprotéiques pour lui redonner sa forme antioxydante active (Sarikurkcu, et al., 2009). Les antioxydants synthétiques les plus couramment utilisés sont L'hydroxyanisole butylé (HAB) et l'hydroxytoluène butylé (HTB) qui sont introduits dans les aliments gras et huileux pour prévenir la détérioration oxydative (Li, et al., 2008). Cependant, ces antioxydants synthétiques sont avérés cancérigènes chez les animaux de laboratoire (Sarikurkcu, et al., 2009). À l'origine, l'hydroxyanisole butyrique semblait avoir une action d'initiation et de promotion des tumeurs (Botterweck, et al., 2000). Les produits naturels d'origine végétale ont été proposés comme source potentielle d'antioxydants naturels ayant des effets toxiques minimales et une forte activité (Lim, et al., 2001). Par conséquent, une plus grande attention a été portée aux antioxydants et chélateurs de fer naturels d'origine végétale.

Les jujubiers sont des plantes du genre *Ziziphus*, appartenant à la famille des Rhamnaceae (Liu, et al., 2004), très répandus dans les régions tropicales et subtropicales : Asie, Afrique, Amérique du Nord, Amérique du Sud, Océanie et Europe (Hamedi, et al., 2016). Bien qu'il existe environ 58 espèces de *Ziziphus* dans le monde, seules deux espèces, *Ziziphus spina-christi* (Lam.) et *Ziziphus lotus* (L.), sont présentes au Maroc (Benammar, et al., 2010). Le jujubier, *Ziziphus lotus* (L.), est un arbuste épineux, qui forme des touffes pouvant atteindre 2 mètres de hauteur (Amara, et al., 2017). La répartition du *Ziziphus lotus* (L.) s'étend sur tout le nord du Maghreb ; c'est une espèce largement répandue dans les régions arides du Maroc (Abdeddaim, et al., 2014). *Ziziphus lotus* est largement utilisé en médecine populaire pour le traitement de diverses maladies telles que la bronchite, la diarrhée, les abcès, les troubles gastro-intestinaux, les problèmes de foie, les infections urinaires, les infections cutanées, l'insomnie et le diabète (Mahboba, et al., 2010). Plusieurs effets des fruits du *Ziziphus lotus* ont été signalés comme étant anti-âge, anti-tumoraux, anti-inflammatoires, anti-ulcérogène et antibactériens (Mahboba, et al., 2010). *Ziziphus spina-christi* (Lam.) est un arbre, qui peut atteindre une hauteur de 20 mètres (Zakaria, et al., 2008), communément appelé Christ's thorn ou Jerusalem thorn en anglais et sidr en arabe. C'est un arbre tropical d'origine soudanaise. Ses fruits sont différents de ceux du *Ziziphus lotus*, ils sont ovales, et sont également consommés frais. Comme *Ziziphus lotus*, *Ziziphus spina-christi* est également utilisé en médecine populaire dans la gestion de la douleur et des problèmes liés à l'inflammation (Kadioglu, et al., 2016). En outre, il a été signalé qu'il est actif contre les

pathogènes bactériens et fongiques qui sont normalement assez résistants aux médicaments modernes (Verma, et al., 2018). Les graines sont sédatives et sont parfois prises pour arrêter les nausées, les vomissements et les douleurs abdominales associées à la grossesse, tandis que l'infusion d'écorce de fruit est utilisée traditionnellement en Afrique comme remède contre les maux d'estomac et autres problèmes du tube digestif (Shahat, et al., 2001). Des études pharmacologiques ont démontré que *Ziziphus spina-christi* possède des activités hypoglycémiques, hypotensives, hépatoprotectrices, antioxydantes, antidiurétiques, anti-tumorales et immuno-stimulatrices (Sobhani, et al., 2019). Ces activités biologiques pourraient être attribuées à la présence de métabolites secondaires (Li, et al., 2008). Avec la consommation croissante et l'utilisation empirique du *Jujubier* dans la médecine populaire, une attention considérable est requise pour l'analyse de ses nutriments et de ses composés poly-phénoliques. Bien que plusieurs travaux de recherches soulignent l'importance des fruits de *Jujubier*, par contre on note d'après nos recherches bibliographique que il y'a un manque d'informations sur la composition chimique et la teneur en métabolites secondaires des différentes parties du fruit.

Les travaux de la présente thèse s'inscrivent dans le cadre de la continuité des séries de recherches thérapeutiques visant à utiliser des extraits issus des fruits entiers, des pulpes, des graines et des amandes des espèces de *Jujubier* cultivées au Maroc (*Ziziphus spina-christi* et *Ziziphus lotus*) pour pallier la toxicité induite par le chlorure de fer ($FeCl_2$) in vitro sur des cellules de *Tetrahymena pyriformis* et in vivo sur des souris. Le *Tetrahymena pyriformis* (protozoaire) est intensément étudié en tant qu'organisme modèle, offrant de nombreux avantages dans les études complètes et multidisciplinaires utilisant des méthodes morphologiques ou moléculaires (Darcy, et al., 2002). L'extraction de l'ADN étant une étape essentielle de toute expérience moléculaire. Jusqu'à présent il n'y a pas une méthode validée pour l'extraction d'ADN de *Tetrahymena pyriformis*.

Pour la réalisation de ces travaux de recherche nous avons abordé deux approches différentes et complémentaire la première chimique et la deuxième biochimique et moléculaire :

- La première approche s'intéresse à l'analyse photochimique des différentes parties du fruit de *Ziziphus spina-christi* et de *Ziziphus lotus* permettant de caractériser les extraits dotés d'une activité antioxydante et /ou chélatrice du fer.
- La seconde approche consiste à la mise au point et la validation d'une nouvelle méthode d'extraction d'ADN de *Tetrahymena pyriformis* et l'évaluation de l'effet

protecteur des extraits d'intérêt contre la toxicité induite par le chlorure de fer (FeCl₂) sur un modèle cellulaire (*Tetrahymena pyriformis*) et sur un modèle animal (souris).

Le manuscrit de cette thèse est articulé essentiellement dans quatre parties, le travail est présenté sous forme de quatre parties principales :

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique détaillant en premier lieu le jujubier en présentant sa classification systématique, sa localisation géographique, son aspect botanique, son intérêt socioéconomique, sa composition photochimique et ses propriétés pharmacologiques. Cette partie présente également le stress-oxydatif, ses effets néfastes et les défenses des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques contre le stress oxydatif. Elle s'achève par la présentation du fer, son origine, son rôle biologique, sa toxicité et sa thérapie de chélation.
- La seconde partie dédiée aux Matériels et Méthodes, décrit les méthodologies utilisées pour la réalisation de ce travail.
- La troisième partie exposant les résultats obtenus pour les différentes études réalisées et les discussions de l'ensemble des résultats présentés au regard des données expérimentales disponibles dans la littérature.
- La quatrième partie présente une conclusion générale de l'étude et aborde les perspectives qui s'y rapportent.

Étude bibliographique

I. Fer

1. Généralités

Le fer (Fe) est un élément chimique classé 4^{ème} dans l'ordre d'importance (5%) dans la croûte terrestre après l'oxygène, le silicium et l'aluminium (Emsley, 2001). Il appartient aux métaux de transition avec une électronégativité de 1,83 et des états d'oxydation allant de -2 à 6 (Crichton, et al., 2002). Le nombre atomique de l'élément de fer est 26, sa masse atomique relative 55,85 (**Figure 1**). Il se trouve dans la nature sous 3 états d'oxydation : Fer (0) ou fer en métal (Fe); Fer (II) ou fer ferreux (Fe²⁺) et Fer (III) ou fer ferrique (Fe³⁺).

Masse atomique	55,845	26	Numéro atomique
1 ^{er} énergie d'ionisation	762,5	1,83	Electronégativité
Symbole chimique	Fe		
Nom	FER	-1	Etats d'oxydations

Figure 1 : Caractéristiques chimiques du fer (Emsley, 2001)

2. Origine du fer

Le fer est un élément abondant sur terre et un composant biologiquement essentiel à tout organisme vivant (Crichton, et al., 2002). Cependant, malgré son abondance géologique, le fer est souvent un facteur limitant la croissance dans l'environnement. Ce paradoxe apparent est dû au fait qu'au contact de l'oxygène, le fer forme des oxydes, qui sont très insolubles, et n'est donc pas facilement disponible pour être absorbé par les organismes (Dickson, et al., 2009). En réponse, divers mécanismes cellulaires ont évolué pour capturer le fer de l'environnement sous des formes biologiquement utiles. On peut citer comme exemple les sidérophores sécrétés par les microbes pour capturer le fer dans un complexe hautement spécifique ou les mécanismes permettant de réduire le fer du fer ferrique insoluble (Fe⁺³) à la forme ferreuse soluble (Fe⁺²) comme dans les levures (Wilson, et al., 2008). Beaucoup de mécanismes trouvés dans les organismes inférieurs ont des homologues analogues dans les

organismes supérieurs, y compris l'Homme. Les besoins de l'organisme en fer sont remplis à partir de deux sources principales :

Le recyclage du fer de l'hémoglobine dérivé des globules rouges mortes. L'hémoglobine est composée de 4 chaînes de globines (2 α et 2 β) portant chacune un groupement prosthétique (**Figure 2**). Cette hémoglobine qui est libérée dans la circulation se lie facilement à la protéine plasmatique du foie : l'haptoglobine. Le complexe hémoglobine / haptoglobine est récupéré par les macrophages via l'endocytose cellulaire médiée par les récepteurs CD163 (Wassell, 2000). Ces cellules sont adaptées pour dégrader l'hémoglobine afin de libérer le centre du sang (Wassell, 2000). Tout hémoglobine libre est libérée dans la circulation et se lie ensuite à la protéine d'hémopoxine du foie (Tolosano, et al., 2002). Le complexe hème / hémopoxine est retiré de la circulation par les cellules du foie qui jouent un rôle dans le stockage systémique du fer (Herz, et al., 2001).

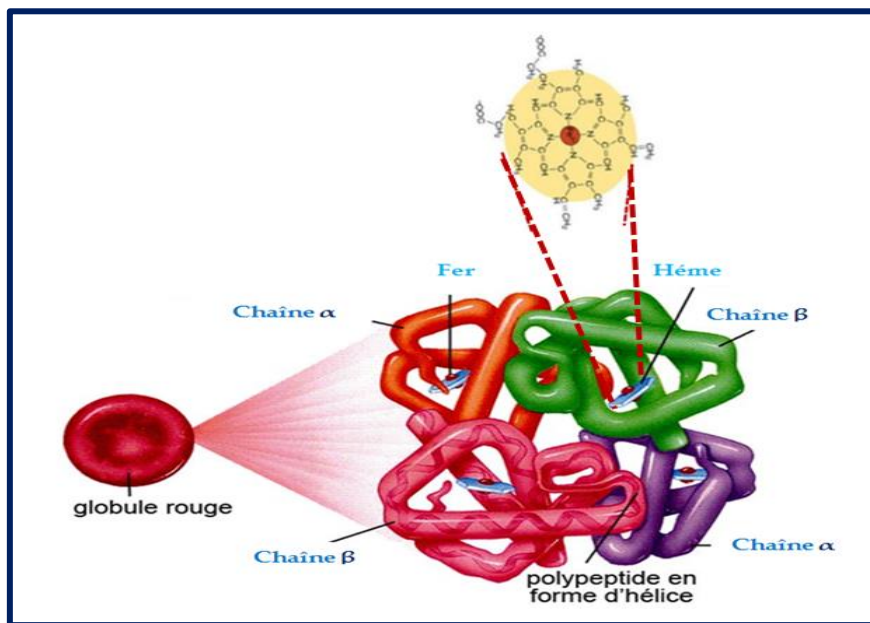


Figure 2 : Structure d'hémoglobine humaine (Herz, et al., 2001)

L'absorption intestinale du fer alimentaire. On distingue deux types de fer alimentaire :

-Le fer héminique, lié à l'hème qui se trouve en quantité élevée dans la viande, les abats, les poissons et les produits de la mer. Sa biodisponibilité est de 25%. Autrement dit, il est très bien assimilé.

- Et le fer non héminique provenant des légumineuses, des végétaux, des oléagineux, du tofu, des œufs, etc. Sa biodisponibilité est de 5 à 10%. Nous l'assimilons moins bien que le fer provenant des produits animaux. Le **tableau 1** fournit la teneur en fer de certains nutriments (U.S.Department of Agriculture, 2016). L'absorption intestinale du fer se fait principalement au niveau du duodénum où le fer non héminique alimentaire (**Figure 3A**), sous forme ferrique (Fe^{3+}), est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par une enzyme, la ferriréductase Dcyt b (duodenal cytochrome b), puis est internalisé par une protéine, le transporteur DMT1 (divalent métal transporter 1) au niveau de la membrane des cellules intestinales (les entérocytes), pour rejoindre le pool de fer labile (LIP). En ce qui concerne le fer héminique, son mécanisme d'absorption est mal connu mais il ne représente qu'une faible partie du fer ingéré. Une fois dans l'entérocyte, Fe^{2+} est libéré vers la circulation sanguine par une protéine transmembranaire, la Fpn1 (ferroprotéine 1), oxydé en Fe^{3+} par une enzyme ferroxidase, l'héphaestine, puis transporté dans le sang lié à une protéine, la transferrine (**Figure 3B**).

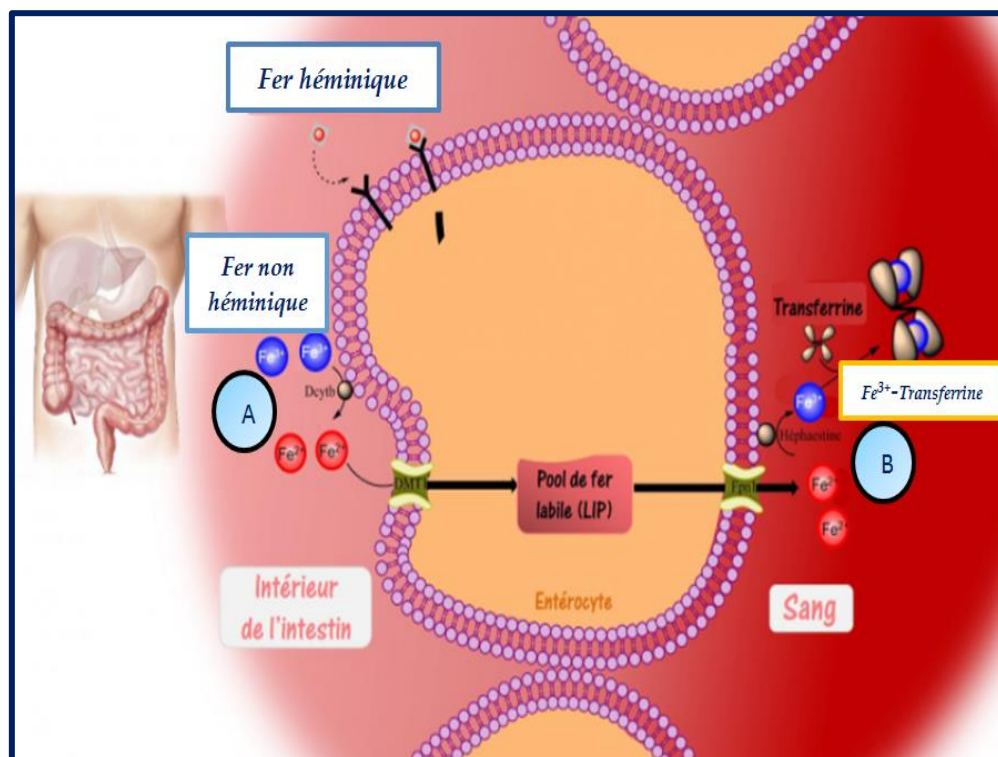


Figure 3 : Absorption intestinale du fer (Merlot, et al., 2013)

Tableau 1: Teneur en fer de divers aliments (U.S. Department of Agriculture, 2016)

Légumes	mg /100 g	Viande et charcuterie	mg /100 g
Salsifis	3,3	Boudin	29,4
Epinard, côte de bettes	2,7	Foie de porc	18,0
Salade de rampon	2,1	Viande séchée des Grisons	9,8
Petits pois	1,9	Foie de veau	7,9
Brocoli, chicorée	1,4	Viande de chevreuil	3,0
Cresson alénois	1,3	Canard	2,5
Chou de Bruxelles	1,1	Viande de bœuf	2,1
Laitue pommée, haricots verts	1,0	Viande de veau	2,0
Poireau, asperges, betterave rouge	0,9	Viande d'agneau	1,8
Radis	0,8	Lapin	1,6
Chou de Milan	0,6	Viande de porc	1,4
Chou choucroute, tomates	0,5	Jambon	1,1
Pommes de terre, piment, radis	0,4	Poulet	0,7
Aubergines, carottes, oignons	0,3	Poisson et fruits de mer	mg /100 g
Endives	0,2	Huîtres, moules	5,8
Brüsseler / Chicorée	0,2	Sardines à l'huile	2,5
Graines de soja, sèches	9,7	Crustacés	2,0
Lentilles, sèches	8,0	Crevettes	1,8
Haricots blancs, secs	7,0	Homard, perche	1,0
Pois chiches, secs	6,1	Carrelet	0,9
Tofu	5,4	Sole, églefin	0,6
Fruits	mg /100 g	Cabillaud, flétan	0,5
Cassis	1,3	Colin	0,2
Groseilles, mangue	1,2	Produits laitiers, œufs	mg /100 g
Avocat, mûres	1,0	Parmesan	0,7
Figues fraîches	0,8	Fromage fondu	0,9
Framboises	0,7	Lait écrémé en poudre	0,8
Groseilles à maquereau	0,6	Fromage	0,3
Myrtilles, mirabelles, citrons	0,5	Lait, yaourt, crème	0,1
Abricots, fraises, kaki, cerises, kiwi	0,4	Crème, cottage cheese	0
Mandarines, pêches, raisins, bananes	0,4	Lait de soja	0,4
Ananas, prunes, rhubarbe	0,3	Jaune d'œuf	5,5
Oranges	0,1	Céréales	mg /100 g
Pommes, poires, melon	0,2	Son de blé	16,0
Amandes	4,2	Flocons de millet	9,0
Noisettes	3,7	Germe de blé	7,6
Noix	2,5	Flocons d'avoine, blé vert	4,2
Cacahuètes	2,4	Blé noir	3,5
Châtaignes	1,0	Gruau d'orge	2,8
Abricots séchés	5,2	Farine de seigle	2,1
Figues séchées	2,5	Riz complet	1,7
Raisins secs, pruneaux séchés	2,3	Farine de blé	1,5
Dattes	3,0	Riz étuvé	1,4
Pommes séchées	2,0	Semoule de blé	1,1

3. Rôle biologique du Fer

Le fer, bien que présent en très faible quantité dans l'organisme (0,005 % du poids corporel) joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques (Halliwell, et al., 2007). Indispensable au fonctionnement de l'organisme, le fer entre dans la composition de l'hémoglobine, une protéine qui sert à transporter l'oxygène dans le sang. Ce minéral essentiel se trouve dans toutes les cellules du corps. Il est également présent dans la myoglobine, une protéine qui fixe l'oxygène aux muscles. Il intervient enfin dans la constitution d'enzymes jouant un rôle capital dans de nombreuses réactions métabolique (Halliwell, et al., 2007).

Dans le corps humain, le fer existe principalement sous des formes complexes liées aux protéines (hémoprotéines), sous forme de composés héminiques (hémoglobine ou myoglobine), d'enzymes héminiques ou de composés non héminiques (enzymes flavine-fer, transferrine et ferritine) (Wassell, 2000). Le corps a besoin de fer pour la synthèse de ses protéines de transport de l'oxygène, en particulier l'hémoglobine et la myoglobine, et pour la formation d'enzymes héminiques et d'autres enzymes contenant du fer impliqué dans le transfert d'électrons et l'oxydoréduction.

Près des deux tiers du fer corporel se trouvent dans l'hémoglobine présente dans les érythrocytes en circulation, 25 % sont contenus dans une réserve de fer facilement mobilisable, et les 15 % restants sont liés à la myoglobine dans le tissu musculaire et dans diverses enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif et de nombreuses autres fonctions cellulaires (Beaumont, et al., 2000). Le fer est recyclé et donc conservé par le corps. Le fer est délivré aux tissus par la transferrine (Tf) circulante, un transporteur qui capte le fer libéré dans le plasma principalement par les entérocytes intestinaux ou les macrophages réticulo-endothéliaux. Le complexe $[(\text{Fe}^{3+})\text{-transferrine}]$ est capté par les cellules par endocytose, réduit en Fe^{2+} dans l'endosome, avant de rejoindre le pool de fer labile (LIP, « labile iron pool »). À partir du LIP, le fer peut être soit directement utilisé par une enzyme (pour la synthèse protéique, la synthèse d'ADN, la synthèse mitochondriale...), soit exporté, ou bien stocké sous forme de ferritine (Bowling, 2003) (**Figure 4**).

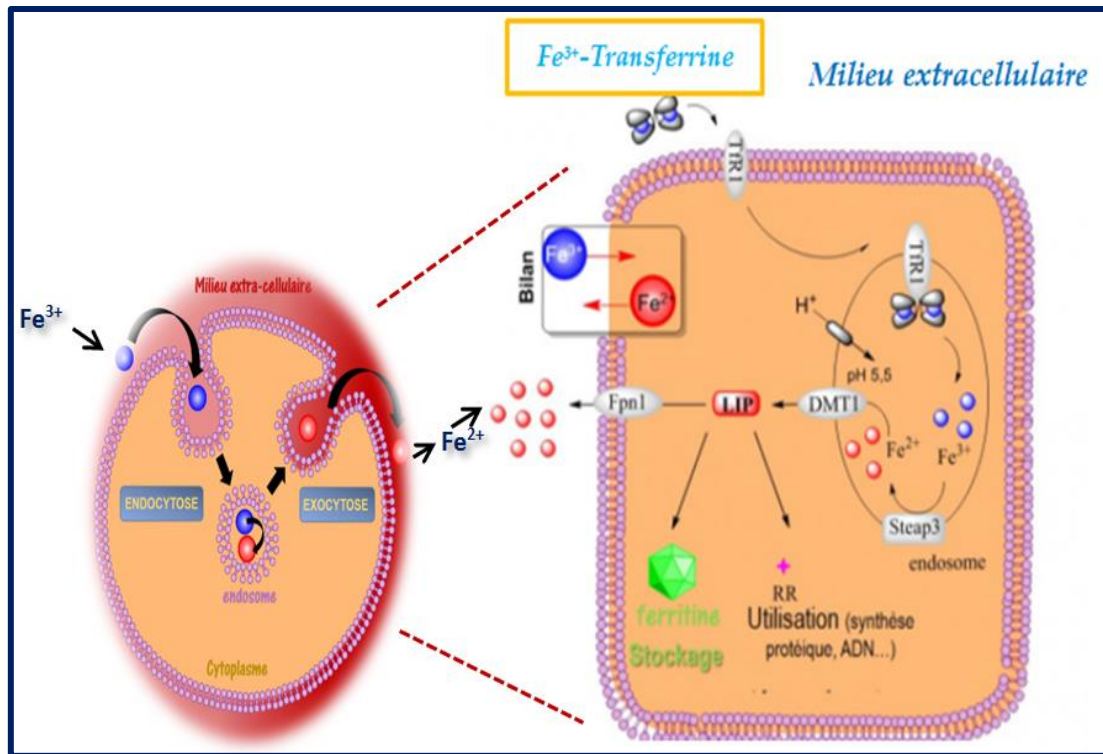


Figure 4 : Métabolisme et régulation du fer (Merlot, et al., 2013)

4. Fer et toxicité

Tout déséquilibre entre le fer disponible dans l'organisme et les besoins de ce dernier peut aboutir à une anémie par carence en fer ou une surcharge de fer par l'augmentation des réserves de fer dans l'organisme. Cependant, si les réserves de fer augmentent, il se produit une saturation complète de la transferrine et ensuite de la ferritine. Le fer se lie à d'autres molécules circulantes (non-transferrin-Bound iron), ce qui provoque une accumulation de complexes ferriques réactifs à l'intérieur de cellules (Figure 5). Lors du transfert d'électrons entre molécules de fer de valences différentes (Fe^{3+} et Fe^{2+}), il se forme des radicaux libres (RL) extrêmement réactifs avec lésions d'organes subséquentes (Koppenol, et al., 1978). Cependant, ce fer est potentiellement toxique pour les membranes cellulaires, qu'il s'agisse de membranes plasmiques ou de membranes des différentes organelles intra-cytoplasmiques comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique granulaire, la protéine et l'ADN. Cette attaque membranaire peut conduire à la destruction cellulaire puis à l'atteinte tissulaire. Le fer est également capable de provoquer la peroxydation des lipides par la décomposition des hydroperoxydes lipidiques préformés (Halliwell, et al., 1985). Le fer ferreux (Fe^{2+}) peut réagir avec les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) pour former des radicaux alcoyle (LO^{\bullet}), et le fer ferrique (Fe^{3+}) peut réagir avec les hydroperoxydes lipidiques pour former des radicaux

peroxyde (LOO^\bullet). Les radicaux peroxydes lipidiques formés peuvent perpétuer la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique en extrayant des atomes d'hydrogène des lipides voisins ou peuvent réagir avec d'autres constituants cellulaires. Il a été démontré que le fer produit des cassures de brins d'ADN lorsqu'il est incubé in vitro avec de l'ADN purifié ou avec des mitochondries de foie de rat isolées ou des noyaux (Sadrzadeh, et al., 1988). En plus de ces données in vitro, les données d'expériences avec des cellules de mammifères ont démontré que le fer endogène joue un rôle clé dans les corrections des dommages de l'ADN produits par le peroxyde d'hydrogène, car le prétraitement avec des agents chélateurs du fer diminue ces dommages. Un peu de fer est lié à l'ADN in vivo et au fer, en présence de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, peut catalyser la formation de radicaux hydroxyles "dirigés", qui causent des dommages à l'ADN (Sadrzadeh, et al., 1988). La surcharge en fer est une conséquence de maladies telles que la thalassémie et l'hémochromatose héréditaire (HFE), et la neurodégénérescence avec accumulation de fer dans le cerveau. Dans l'hémochromatose héréditaire, le fer augmente le risque de développer des cancers hépatocellulaires et colorectaux. L'excès de fer résultant de perturbations de l'homéostasie normale du fer peut s'accumuler dans les principaux organes, notamment le foie, le cœur et le cerveau, et a des effets dévastateurs s'il n'est pas traité (Vujić, 2014).

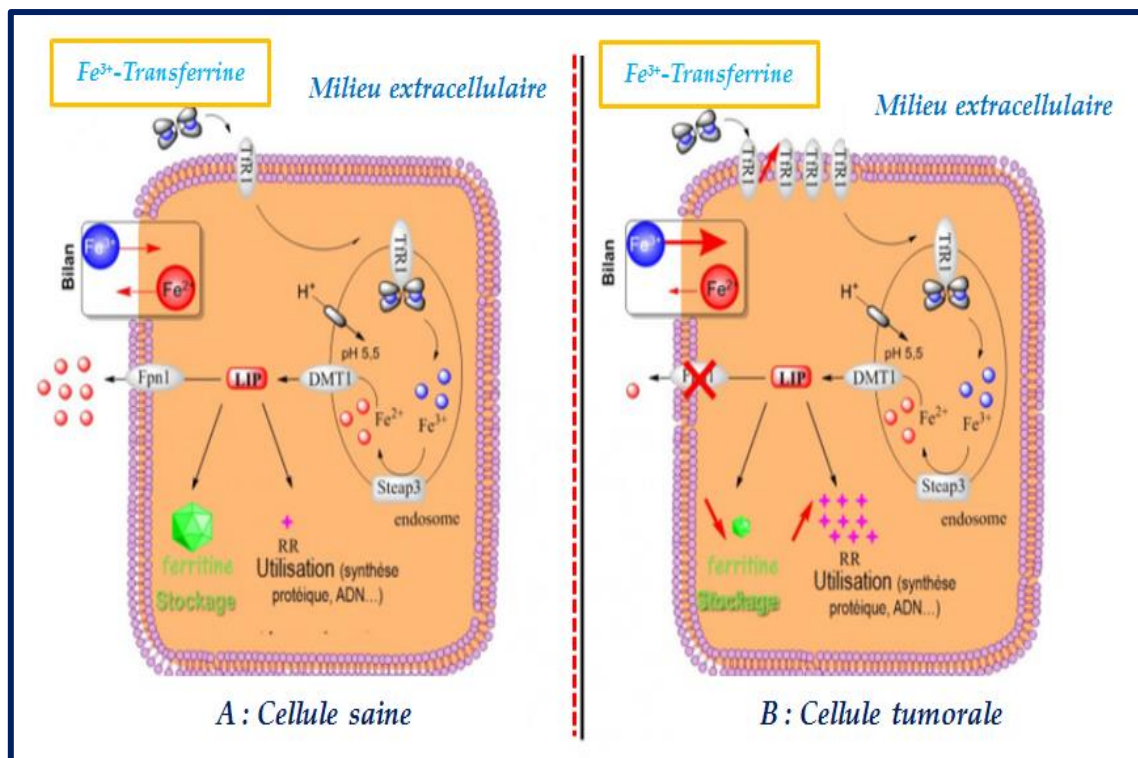


Figure 5 : Mécanisme de surcharge et de toxicité du fer (Merlot, et al., 2013)

5. Troubles liés à la surcharge de Fer

Parmi les troubles provoqués par la surcharge en fer, l'hémochromatose héréditaire (tous types), la drépanocytose, la bêta-thalassémie majeure, le déficit enzymatique (pyruvate kinase) et les troubles rares des protéines de transport (Atransferinémie, Aceruloplasminémie).

L'hémochromatose héréditaire est la cause génétique la plus courante de surcharge en fer. L'intestin grêle du patient absorbe un niveau élevé de fer qui s'accumule dans le foie, le pancréas et certaines parties du cerveau, ce qui entraîne une altération des fonctions vitales. La production de radicaux libres due à la surcharge en fer entraîne des effets secondaires graves et complexes tels que le retard mental, des maladies neurologiques précoces (Alzheimer, sclérose en plaques, Huntington), des retards dans la maturité sexuelle, l'impuissance et la stérilité, dysfonctionnement cardiaque (arythmie, cardiomyopathie, hémossidérose), cirrhose du foie, cancer du foie et dysfonctionnement du métabolisme (diabète, hypogonadisme, troubles de la thyroïde, parathyroïde et diminution du niveau des glandes surrénales). Les autres perturbations incluent l'arthrite, la fatigue chronique, la dépression, la perte de cheveux, le changement de couleur de la peau, les douleurs abdominales, la splénomégalie, l'infection par le VIH, la thrombose veineuse et l'ostéoporose (Xiong, et al., 2014).

6. Thérapie de chélation de fer

Le traitement par chélation du fer est utilisé pour réduire le développement de la surcharge en fer due à son dépôt dans divers organes tels que le foie et le cœur après une transfusion régulière. Les chélateurs sont capables de lier les ions métalliques pour une réduction drastique de leur réactivité. Le complexe ultime est soluble dans l'eau et peut pénétrer dans le sang et être excrété sans aucun dommage. L'histoire du traitement par chélation remonte au début des années 1930, lorsque Ferdinand Mans a travaillé sur la synthèse de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Par la suite, les chercheurs ont découvert que l'EDTA est efficace dans le traitement de l'empoisonnement au plomb. À partir des années 1970, le traitement par chélation a été remplacé par la phlébotomie pour éliminer l'excès de fer chez les patients atteints d'hémochromatose (Blake, et al., 1985). Différents chélateurs du fer sont impliqués par la suite dans le traitement de la surcharge en fer. La déféroxamine, la déféripone et le déférasirox sont les plus importants chélateurs spécifiques du fer approuvés

par la FDA (Food and Drug Administration) américaine. Pris ensemble, dans de nombreux troubles cliniques, le choix d'un chélateur standard n'a pas d'indice précis, ce qui nécessite des éclaircissements supplémentaires (Olivieri, et al., 1997). Des recherches récentes ont prouvé que le traitement comprend l'utilisation de chélateurs du fer, qui, à des concentrations plus élevées, peuvent avoir des effets néfastes importants et nécessitent une surveillance médicale constante. De plus, ces complexes sont fragiles puisque les liaisons entre le métal et le ligand sont non-covalentes (May, et al., 1983). Par conséquent, la recherche d'autres chélateurs du fer uniques ou adjuvants ayant une toxicité réduite pourrait être très utile. C'est pourquoi à ce jour, les études sont orientées vers l'identification de ces espèces chimiques dans les plantes médicinales.

II. Le stress oxydatif

1. Généralités

Les radicaux libres (RL), sont un groupe de molécules chimiques hautement réactives comportant un ou plusieurs électrons non appariés. Ces substances sont capables de donner lieu à des réactions en chaîne impliquant un certain nombre d'étapes, chacune d'entre elles formant un radical libre qui déclenche l'étape suivante (**Figure 6**). Toutefois, en période de stress environnemental (par exemple, les rayons UV, exposition à la chaleur et aux rayonnements ionisants), leurs concentrations pourraient augmenter considérablement. À des niveaux élevés les RL réagissent facilement avec les lipides, les protéines, les glucides et les acides nucléiques. Ces réactions peuvent entraîner des dommages importants aux structures cellulaires, et s'accumuler dans une situation connue sous le nom de stress oxydatif (Conner, et al., 1996).

Le stress oxydatif est une condition dans laquelle l'équilibre entre la production d'oxydants et leur élimination par les antioxydants est perturbée, ce qui entraîne une augmentation de la production et l'accumulation d'oxydants dans l'organisme (Thannickal, et al., 2000).

2. Les Espèces réactives de l'oxygène

Dans le système vivant, les radicaux d'oxygène représentent la classe la plus importante des espèces de radicaux. En biochimie, les radicaux libres sont souvent appelés ERO (espèces réactives de l'oxygène), parce que biologiquement, les radicaux libres les plus importants sont centrés sur l'oxygène (Halliwell, et al., 2007). En raison de la réduction de l'oxygène, trois

produits intermédiaires importants sont générés : l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, et peroxydinitrite, le monoxyde d'azote et l'acide hypochloreux (**Figure 6**).

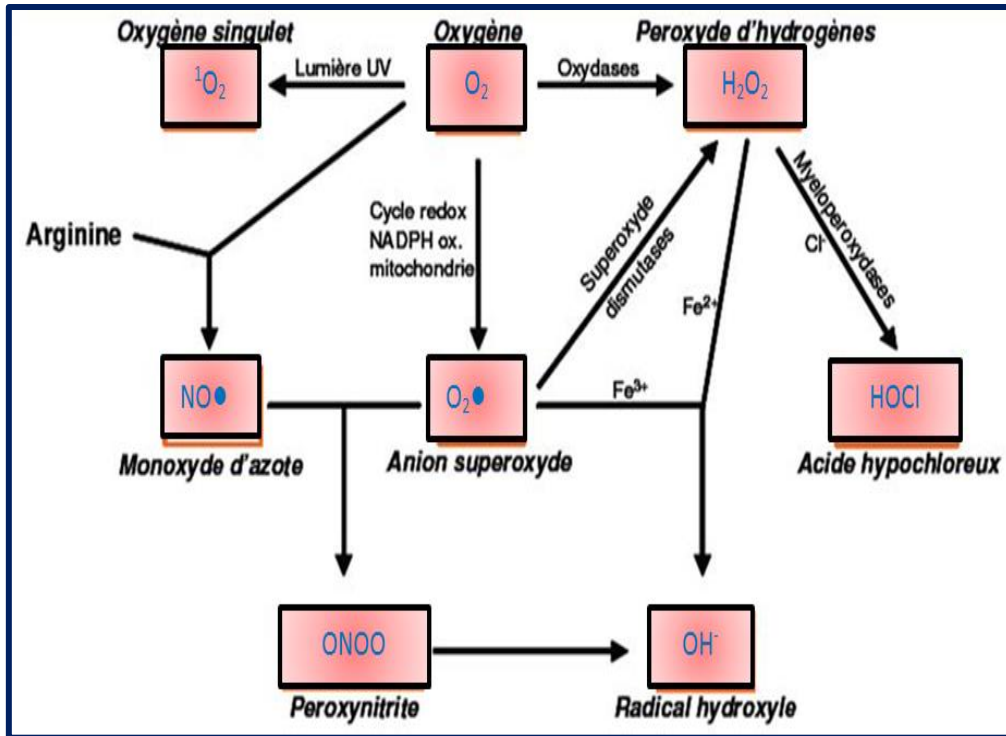


Figure 6 : Origine des différents radicaux libres impliqués en stress oxydatif (Amara, 2007)

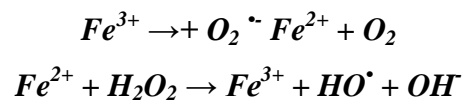
2.1. Superoxyde anion

L'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), et l'espèce réactive de l'oxygène le plus courant, est généré dans les mitochondries, dans le système cardio-vasculaire et dans d'autres parties du corps (Drew, et al., 2002). Dans un organisme aérobie, une grande partie de l'oxygène est réduite en eau dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, une petite proportion des molécules d'oxygène (1 à 2 %) est convertie en l'anion radicalaire superoxyde. Ces réactions se produisent dans la chaîne respiratoire par le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) et le complexe III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase). (Buonocore, et al., 2010).

2.2. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une molécule neutre et est la moins réactive parmi les espèces réactives de l'oxygène. Il est hautement diffusible et traverse facilement la membrane

plasmique. H₂O₂ pourrait être produit par une réaction de dis-mutation à partir d'anion superoxyde par le superoxyde dismutase (SOD). Acide aminé l'oxydase et la xanthine oxydase peuvent également produire du H₂O₂ (Barbusiński, 2009). Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du fer ferreux (Fe²⁺), le H₂O₂ peut se décomposer en ion HO⁻ et en radical hydroxyle (HO[•]) selon la réaction de Fenton :



2.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (HO[•]), est le plus réactif et le plus dangereux, et peut être formé à partir d'anions superoxyde et de H₂O₂ en présence d'ions métalliques, et il a une très courte demi-vie in vivo d'environ 10 à 9 secondes. Par conséquent, lorsqu'il est produit in vivo, OH réagit à proximité de son site de formation (Liochev, et al., 2002).

2.4. L'oxygène singulet

L'oxygène singulet (¹O₂) est une espèce oxygénée très réactive. Cette molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. ¹O₂ n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Liochev, et al., 2002).

2.5. Peroxynitrite

Peroxynitrite (ONOO[•]), c'est un prooxydant liposoluble, toxique, nitrosant et oxydant à la fois et capable de diffuser facilement à travers les membranes cellulaires. Il s'implique dans l'activation des voies pro apoptotiques. Proviens de l'interaction entre l'anion superoxyde et l'oxyde d'azote générés ou cour de l'inflammation.

3. Les effets néfastes du stress oxydatif

Comme indiqué précédemment, s'ils sont en excès, les radicaux libres donnent lieu à un phénomène connu sous le nom du stress oxydatif ; il s'agit d'un processus nocif qui peut

affecter négativement plusieurs structures cellulaires, telles que les membranes, les lipides, les protéines, les lipoprotéines et l'acide désoxyribonucléique (Balaban, et al., 2005) (**Figure 7**).

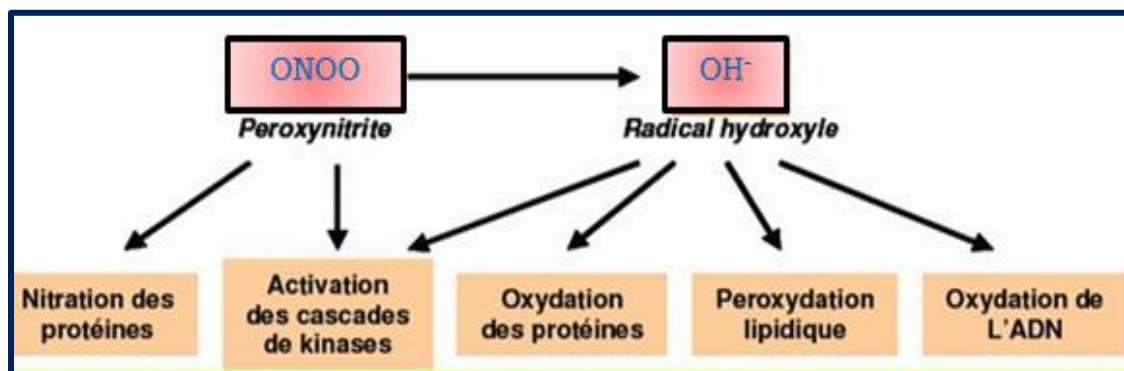


Figure 7 : Effets néfastes du stress oxydatif (Amara, 2007)

Un excès de radical hydroxyle et de peroxynitrite peut provoquer une peroxydation lipidique, endommageant ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines. Cela conduira à son tour à la formation de Malondialdéhyde (MDA) et de composés de diènes conjugués, qui sont connus pour être cytotoxiques et mutagènes. Étant une réaction en chaîne radicalaire, la peroxydation lipidique se propage très rapidement affectant une grande quantité de molécules lipidiques (Thannickal, et al., 2000). Les protéines peuvent également être endommagées par le stress oxydatif, subir des modifications conformationnelles qui pourraient déterminer une perte ou une altération de leur activité enzymatique (Thannickal, et al., 2000). Même l'ADN est sujet aux lésions liées au stress oxydatif, dont la plus représentative est la formation de 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-OHdG); il s'agit d'une lésion d'ADN particulièrement pernicieuse, qui peut être responsable de la mutagenèse (Thannickal, et al., 2000). **Figure 8** ci-dessous illustre ces différents dommages. Le stress oxydatif peut également entraîner une perte de l'information épigénétique (Thannickal, et al., 2000). S'il n'est pas strictement contrôlé, le stress oxydatif peut être responsable de l'induction de plusieurs maladies, à la fois chroniques et dégénératives, ainsi que d'accélérer le processus de vieillissement corporel et de provoquer des pathologies aiguës (c'est-à-dire des traumatismes et des accidents vasculaires cérébraux).

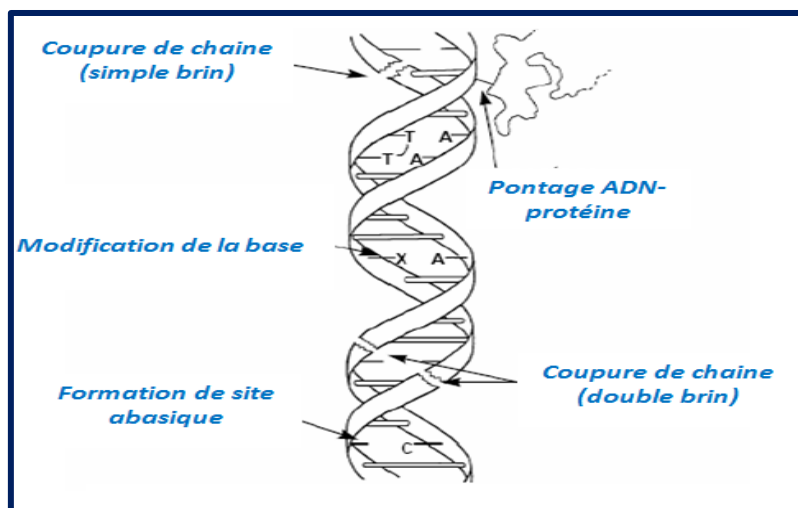


Figure 8 : Principales classes de dommages de l'ADN (Yves, 2008)

4. Les systèmes de défenses antioxydantes

Notre organisme est équipé d'un système complexe de défense antioxydant pour se protéger contre la production excessive en espèces radicalaires. Ces antioxydants agissent différemment, certains agissent par interruption de la spirale oxydative, et d'autres interviennent pour la prévention des dégâts. Généralement, On distingue deux catégories de systèmes antioxydants ; enzymatiques et non enzymatiques (Haleng, et al., 2007).

4.1. Systèmes enzymatiques antioxydants

La Superoxyde dismutase (SOD) est l'une des enzymes qui représentent les premières lignes de défense contre le stress oxydatif. Cette Enzyme antioxydante primaire réagit contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire. Au niveau de la mitochondrie, cette enzyme est capable de transformer les radicaux superoxydes en peroxydes d'hydrogène par une réaction de dismutation (**Figure 9**). Le peroxyde d'hydrogène formé assure lui-même le rétrocontrôle négatif sur la synthèse de la SOD. La Catalase (CAT), une enzyme tétramérique, formée de quatre sous unités (60 kDa), assure la transformation du H_2O_2 pour donner de l'eau et de l'oxygène pour que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier. Le Glutathion peroxydase (GPx)/réductase (GR) est un système antioxydant complexe agit en coordination afin de permettre la réduction du H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques en H_2O et en alcool ROH. La Glutathion réductase (GR), est une flavoprotéine qui catalyse la réduction du glutathion oxydé en glutathion réduit. Elle a pour rôle de régénérer le GSH (Glutathion réduit) à partir du GSSG (Glutathion oxydé) grâce au Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate-

oxydase (NADPH) qui est utilisé comme donneur d'électron et assure le maintien de la ration GSH/GSSG intracellulaire (Haleng, et al., 2007).

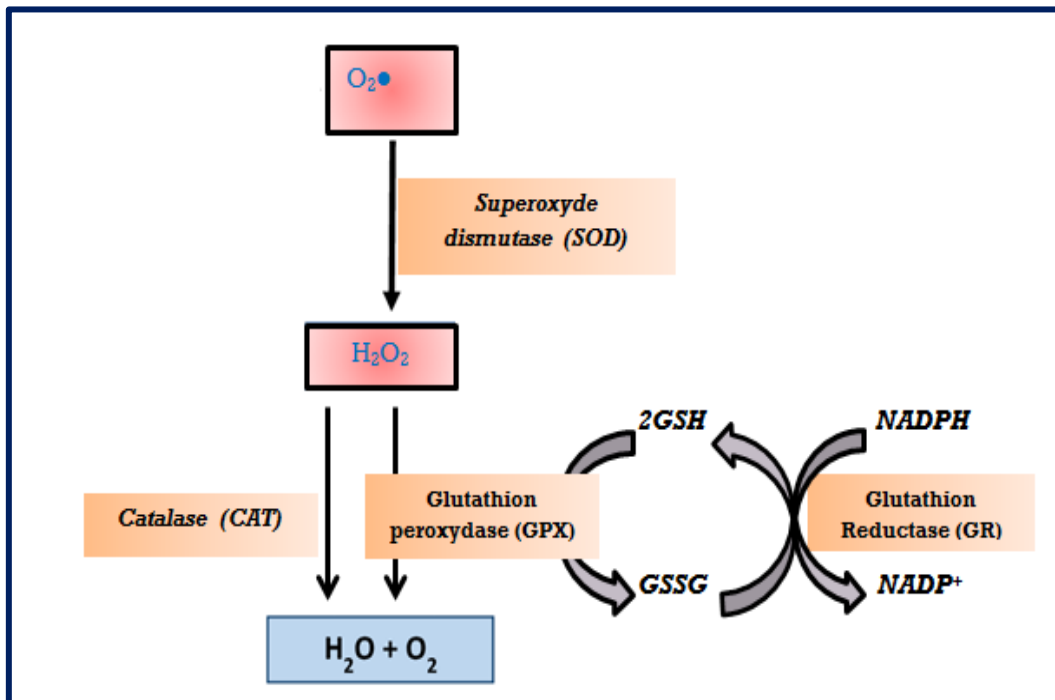


Figure 9 : Principal système de défense antioxydant enzymatique in vivo (Yves, 2008)

4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Les vitamines sont des substances naturelles d'origine alimentaire qui jouent un rôle important dans le renforcement des systèmes antioxydants endogènes. Parmi les vitamines qui interviennent dans le système antioxydant on cite la vitamine E (alpha-tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique) et la bêta carotène. Les Oligoéléments sont essentiels pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes. Le Zinc inhibe la NADPH oxydase et active SOD et GPx. L'acide urique a la capacité de piéger les espèces radicalaires. Il joue un rôle chélateur des ions métalliques comme le fer et l'aluminium, qui sont impliqués dans la génération des prooxydants. La Bilirubine permet de protéger les cellules et les lipoprotéines contre la peroxydation lipidique et contribue à l'amélioration de pouvoir antioxydant. Et les flavonoïdes, ce sont des composés poly-phénoliques présents dans la majorité des plantes, doués d'un pouvoir antioxydant (Haleng, et al., 2007).

III. Généralités sur le jujubier

1. Classification systématique du jujubier

Les jujubiers sont des arbres ou arbustes du genre *Ziziphus Mill.*, appartenant à la famille des Rhamnacée (Sobhani, et al., 2019). Le nom *Ziziphus* est lié à un mot arabe utilisé le long de la côte nord-africaine, Zizoufo, utilisé pour *Z. lotus (L.) Desf.*, mais aussi aux anciens mots persans *Zizfum* ou *Zizafun*. En outre, les Grecs anciens utilisaient le mot *Ziziphon* pour le jujube (Azam-Ali, et al., 2006). Il y a un consensus général sur le fait que ce genre contient environ 86 espèces (Evreinoff, 1964); cependant, certains auteurs suggèrent qu'il pourrait y avoir jusqu'à 135 espèces (Bhansali, 1975). Liu et ses collaborateurs, ont suggéré qu'il pourrait y avoir jusqu'à 170 espèces (Liu, et al., 1995). Selon Plant List, 276 noms ont été donnés à *Ziziphus spp* avec 58 noms acceptés, 59 synonymes et 159 noms non résolus (The Plant list, 2013).

2. Aire de répartition géographique

Les jujubiers sont largement répandus dans les régions tropicales et subtropicales du monde, principalement en Afrique, en Asie et en Amérique (Evreinoff, 1964). Toutefois, quelques espèces sont présentes dans les îles du Pacifique, en Europe et en Australie. Ce genre est devenu de plus en plus répandu en raison de la capacité à s'adapter à la diversité des conditions écologiques (Liu, et al., 2004). Il existe deux espèces principales de *Ziziphus* domestiques, *Ziziphus mauritiana* (le jujube indien) et *Ziziphus jujuba* (le jujube chinois ou jujube commun). Ces deux espèces ont été Introduites au cours des siècles dans des régions du monde entier. Par contre d'autres espèces, comme *Ziziphus nummularia*, *Ziziphus spina-Christi* et *Ziziphus mucronata*, sont limitées à des régions distinctes (Arndt, et al., 2001). La répartition géographique des espèces de *Jujubier* est indiquée dans le **tableau 2** (Arndt, et al., 2001).

Tableau 2 : Répartition géographique des espèces de jujubier (Arndt, et al., 2001).

Continent	Espèces	Régions
Afrique	<i>Z. abyssinica</i> Hochst.	Afrique tropicale
	<i>Z. lotus</i> Lamk.	Afrique du Nord
	<i>Z. mauritiana</i> Lamk.	Afrique tropicale, zone du Sahel
	<i>Z. mucronata</i> Willd.	Afrique australe
	<i>Z. spina-christi</i> Willd.	Moyen-Orient
Asie	<i>Z. jujuba</i> Mill.	Chine, Inde, Corée, Malaisie
	<i>Z. mauritiana</i> Lamk.	Chine, Inde, Pakistan, Malaisie
	<i>Z. nummularia</i> W.i.A.	Inde
	<i>Z. oenoplia</i> Mill.	Asie tropicale
	<i>Z. rotundifolia</i> Lam.	Inde, Pakistan
	<i>Z. rugosa</i> Lam.	Inde
	<i>Z. sativa</i> Gaertn.	Pakistan
	<i>Z. spina-christi</i> Willd.	Moyen-Orient
	<i>Z. xylopyra</i> Willd.	Chine, Inde
	<i>Z. funiculosa</i> Buch.-Ham	Inde
	<i>Z. glabrata</i> Heyne ex Roth	Chine, Inde
	<i>Z. xylopyrus</i> Willd.	Inde, Népal et Sri Lanka
Australie	<i>Z. mauritiana</i> Lamk.	
	<i>Z. oenoplia</i> Mill.	
Europe	<i>Z. jujuba</i> Mill.	Méditerranée
	<i>Z. lotus</i> Lamk.	Méditerranée
	<i>Z. mauritiana</i> Lamk.	Méditerranée
	<i>Z. sativa</i> Gaertn.	Méditerranée
Amérique du Nord	<i>Z. amole</i> M.C.Johnst.	Mexique
	<i>Z. celata</i> J.i.H.	USA
	<i>Z. jujuba</i> Mill.	USA
	<i>Z. mexicana</i> Rose	Mexique
	<i>Z. obtusifolia</i> Gray	Mexique, USA
Amérique du Sud	<i>Z. cinnamomeum</i> Tr. & Pl.	Venezuela
	<i>Z. mistol</i> Griseb.	Argentine, Paraguay
	<i>Z. joazeiro</i> Mart.	Brazile, Paraguay
	<i>Z. oblongifolia</i> S.Moore	Brazile

3. Description botanique

Les plantes du jujubier sont des arbres ou arbustes, plantes érigées ou traînantes, souvent grimpantes, à feuilles persistantes ou caduques (**Figure 9**). Les espèces peuvent être épineuses ou non, mais le plus souvent elles le sont, et les espèces peuvent être glabres ou relativement poilues (Abu-Raghif, et al., 2017). Les épines sont solitaires ou par paires, généralement l'une droite, l'autre courbée. Les feuilles des plantes sont alternes ou rarement sub-opposées, poussent avec des stipules, elles sont simples et membraneuses ou coriaces (Azam-Ali, et al., 2006). Les fleurs sont penta-lignées, hermaphrodites, actinomorphes, jaune-vertes, en

faisceaux axillaires ou en cymes sessiles ou pédonculés (Amara, et al., 2017). Les fruits sont globuleux, drupes ou ovoïdes. Ils ont de 1 à 4 graines mais les drupes contiennent principalement 1 graine et ont un gros embryon avec un endosperme rare ou absent (Azam-Ali, et al., 2006).



Figure 10: Différentes parties de Ziziphus jujube (Hossain, 2019)

4. Intérêt socioéconomique

Le fruit représente l'intérêt principal du jujubier. Grâce à ses composants chimiques, sa valeur énergétique très élevée et son goût, il constitue un fruit très agréable, fournissant en période de disette un apport alimentaire non négligeable (Verma, et al., 2018). Ces fruits peuvent être consommés frais ou séchés. Frais, il sert à la fabrication de confiture délicieuse riche en vitamine C et de jus très apprécié. Dans la partie occidentale du Soudan (Kordofan et Darfour), on produit une farine fine à partir de la pulpe séchée aigre-douce (Vandita, et al., 2012). La farine de pulpe séchée peut être mélangée avec de l'eau et du sésame pour être façonnée en petites boules destinées à une consommation immédiate ou tardive. Les enveloppes des graines sont parfois fendues pour séparer les graines qui peuvent être consommés crus (Zakaria, et al., 2008).

Le jujubier est également cultivé pour ses feuilles. Ces dernières sont riches en valeur bromatologique. Elles présentent ainsi un grand intérêt pour le fourrager, et sont très appréciées par les bovins surtout les chèvres et les chameaux. En effet, les jeunes feuilles sont consommées comme légume, en soupe ou dans le couscous (Depommier, 1988).

Le bois de jujube est utilisé pour fabriquer des manches d'outils, des jougs de bœuf, des ustensiles de cuisine, des lits et des jouets. Il est également utilisé pour la construction de bateaux et souvent pour construire des maisons et des greniers. Les branches épineuses sont utilisées comme bois de chauffage (Depommier, 1988).

Dans le domaine de santé, les racines, les feuilles, le bois et l'écorce du jujubier sont utilisés dans différentes préparations médicinales. En effet, l'écorce est indiquée dans une décoction pour traiter les douleurs abdominales ; associées à l'écorce de *Lannea acida*, elles atténuent les douleurs intestinales (Abu-Raghif, et al., 2017). La racine est utilisée contre la syphilis et la gonorrhée. Les toucouleurs utilisent la poudre d'écorce en hémorragie du post-partum (Zakaria, et al., 2008). Pendant la saison sèche, la commercialisation des fruits de jujubier mobilise femmes et enfants ; le prix de vente varie selon les régions et le revenu issu de cette vente contribue à la survie de nombreuses familles (DAO, 1993).

IV. Biomolécules à intérêt biologiques et pharmacologiques issues du jujubier

L'enquête approfondie menée sur la composition phytochimique et sur l'activité pharmacologique du jujubier a permis de constater que ces plantes possèdent des composés multi-biologiquement actifs. Ces composés actifs comprennent des alcaloïdes, des stéroïdes, des flavonoïdes, des tri-terpénoïdes, des saponines et d'autres composés. Il a été signalé que ces biomolécules peuvent servir d'antioxydants, d'antimicrobiens, d'anticancéreux, d'antidiabétiques, d'agents anti-inflammatoires, et peuvent retarder l'agrégation plaquettaire, et la libération d'histamine par les mastocytes (Sobhani, et al., 2019).

1. Composition phytochimique

1.1. Alcaloïdes cyclo-peptidiques

Les alcaloïdes cyclo-peptidiques sont des composés polyamides constitués d'un cycle à 13, 14 ou 15 chaînons et d'une chaîne latérale qui a un caractère basique ou neutre selon la présence ou non d'un atome d'azote terminal. Bien qu'ils soient présents dans diverses familles de plantes, ils sont surtout répandus dans la famille des Rhamnacées (Laličić, et al., 2016). De nombreuses espèces de *Ziziphus* sont célèbres pour leurs alcaloïdes cyclo-peptidiques. Jusqu'à présent, 165 alcaloïdes cyclo-peptidiques ont été signalés chez les espèces de *Ziziphus*. Ces

alcaloïdes cyclo-peptidiques ont fait l'objet de diverses études en raison de leurs propriétés chimiques et biologiques intrigantes. Ils font également l'objet d'une attention particulière en raison de leurs activités traditionnelles, notamment sédative, antimicrobienne, hypoglycémique, antispasmodique, anti-infectieuse, antidiabétique, analgésique et anti-convulsivante, et de leur activité anti-inflammatoire (Nisar, et al., 2007).

1.2. Flavonoïdes

D'autres composés chimiques importants ont été identifiés dans les espèces de *Ziziphus* ; ce sont les flavonoïdes. Jusqu'à présent, 151 flavonoïdes et leurs dérivés, y compris les flavones, isoflavones, anthocyanines, catéchines et chalcones, ont été isolés dans les espèces de *Ziziphus*. Les flavonoïdes sont considérés comme des ingrédients responsables de l'action thérapeutique des espèces de *Ziziphus* (Abu-Raghif, et al., 2017).

1.3. Saponines

Les saponines sont des glycosides triterpéniques ou stéroïdiens répartis dans tout le règne végétal, souvent associés à des fonctions de défense dans les plantes. Ces polyphénols sont responsables de la plupart des effets biologiques signalés du *Ziziphus*, tels que les activités hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides et molluscicides (Liu, et al., 2002). Environ 31 saponines ont été identifiées dans des parties de fruits, de graines et de feuilles de *Z. spina christi*, *Z. mauritiana* et *Z. jujuba* (Sakna, et al., 2019).

1.4. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont également répartis de manière diffuse dans les plantes de ce genre. Jusqu'à présent, environ 43 terpénoïdes ont été signalés et isolés à partir des fruits, graines, feuilles et fleurs de *Z. spina christi*, *Z. mauritiana* et *Z. jujuba*. Plusieurs études ont rapporté que les terpénoïdes des plantes de *Ziziphus* présentaient de nombreuses activités biologiques telles que des activités cytotoxiques, anti-complémentaires, antimicrobiennes, antiplasmodiques, antimycobactériennes, anti-inflammatoires et inhibitrices de la cyclooxygénase-2 (Sakna, et al., 2019).

1.5. Autres composés

L'analyse des études précédentes a révélé une série d'autres composés mineurs qui ont été isolés dans les plantes de *Ziziphus*. Il s'agit notamment de l'acide cholinergique, dont la phlorétine 3'/ 5'-di-c-galactoside, la phlorétine 3'-c-glucoside 5'-c-galactoside ou la phlorétine 3'-c-galactoside 5'-c-glucoside, l'acide cis-5-o-p-coumaroylquinique, diosmétine 3'-o-galactoside 7-o-rutinoside, diosmétine 3'-o-glucoside 7-o-rutinoside, acide trans-5-o-caféoylquinique et acide trans-5-o-p-coumaroylquinique, qui ont tous été signalés dans les fruits de *Z. spina christi* (Saadoudi, et al., 2017). Des benzénoïdes, dont les benzoates de méthyle et de benzyle, l'alcool benzylique, l'acide p-anisique (acide 4-méthoxybenzoïque), le p-anisaldéhyde, l'alcool p-anisylque, l'anisate de méthyle et l'acide vanillique (acide 3-méthoxy-4-hydroxy-benzoïque) ont été signalés dans les fleurs de *Z. mauritiana*. En outre, autres types de composés, dont des stéroïdes, des cérébrosides, des nucléosides/nucléobases et des polysaccharides ont été isolés et identifiés dans le fruit de *Z. jujuba* (El Maaiden, et al., 2020).

2. Propriétés pharmacologiques

2.1. Activité antidiabétique

Choudhary et ses collaborateurs, ont étudié l'effet des alcaloïdes cyclo-peptidiques (Nummularin-R, Nummularin-Cet Hemsine-A) isolés de la tige et de la racine de *Z. oxyphulla* sur l'activité inhibitrice de l'enzyme α -glucosidase. Les résultats observés ont établi un bon rôle pour ces composés en tant qu'agents antidiabétiques via l'inhibition de l'activité enzymatique de la α -glucosidase (Choudhary, et al., 2011). Dans un autre travail, les constituants de l'extrait butanolique des fruits de *Z. spina christi*, à savoir les saponines glycosides, et christinine-A, ont permis d'améliorer l'utilisation du glucose chez les rats diabétiques. Une augmentation significative des niveaux d'insuline sérique a été constatée après 4 semaines de traitement avec cet extrait (Adzu, et al., 2008). Les résultats ont révélé une réduction significative des taux de glucose sérique à jeun ainsi qu'une amélioration notable des niveaux d'insuline sérique des rats diabétiques testés, ce qui indique l'activité antidiabétique des biomolécules des extraits de *Z. spina christi* (Adzu, et al., 2008). Benammar et ses collègues ont réalisé des essais cliniques en utilisant des extraits de racine de 100 mg/kg de *Z. Lotus* pour traiter des rats diabétiques par voie orale. Les extraits ont également permis de réduire certaines complications associées au diabète, telles que l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie et les peroxydés, et de maintenir les fonctions hépatiques et rénales (Benammar, et al., 2010). Un test réalisé par Nesseem à l'aide d'un extrait éthanolique

de feuilles de *Z. spina christi* a révélé une activité antihyperglycémique élevée par rapport à la metformine (Nesseem, et al., 2008). L'activité antidiabétique des composés phénoliques de *Z. spina christi* a également été prouvée par Othman et ses collègues qui ont signalé une amélioration significative des niveaux de glucose, une augmentation du poids corporel, ainsi qu'une augmentation des niveaux d'insuline et d'hémoglobine (Othman, et al., 2009). Par conséquent, une application de biomolécules des extraits de jujubier pourrait être préférable à des médicaments chimiques pour la prévention ou la minimisation de certaines maladies chroniques et des complications liées au diabète.

2.2. Activité anti-inflammatoire

La kushecarpin-A est un nouveau composé isolé de *Z. oxyphyla* qui a été évalué pour son activité anti-inflammatoire à des doses de 5,10 et 20 mg/kg. Toutes les doses testées ont donné des résultats hautement significatifs, montrant une puissante activité anti-inflammatoire (Nisar, et al., 2011). Les effets anti-inflammatoires des extraits alcooliques de fruits, graines et feuilles de *Z. spina-christi* ont été étudiés en utilisant des rats Sprague-Dawley comme modèle anti-inflammatoire avec du diclofénac sodique comme témoin positif. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait alcoolique de *Z. spina-christi* est doté d'une activité anti-inflammatoire considérable (Musbah, et al., 1988). Les effets anti-inflammatoires d'un extrait méthanolique des tiges de *Z. oxyphyla* ont été évalués sur des rats ayant des pattes œdémateuses induites par la carraghénine. L'extrait a diminué l'inflammation de manière significative avec un effet similaire à celui du témoin (Ali, et al., 2015).

2.3. Activité antimicrobienne

Environ 26 hydrocarbures aromatiques différents ont été détectés dans des fruits de *Z. spina christi* (EL-Hefnya, et al., 2018). Il est très probable que ces hydrocarbures aromatiques et leurs substitués aient une bonne activité antibactérienne (Islam, et al., 2008). Kaleem et ses collaborateurs ont évalué l'activité antibactérienne d'alcaloïdes cyclopeptidiques (Oxyphylline-B, l'Oxyphylline-C, la Nummularin-C ainsi que la Nummularin-R) isolés à partir de la fraction chloroforme de l'extrait méthanolique de *Z. oxyphula* (Kaleem, et al., 2012). Tous les alcaloïdes cyclopeptidiques isolés ont présenté une bonne activité contre les agents pathogènes testés. D'autres chercheurs ont rapporté l'activité antifongique de la Mauritine-K et de la Sativanine-K, isolées à partir des feuilles de *Z. mauritiana* (Lam.) contre *Botrytis cinerea* à des doses allant de 0,2 à 1 mg/mL (Kaleem, et al., 2012). Les résultats

observés ont montré une activité antifongique modérée de Maurisine-K contre *Candida albicans*, alors qu'aucune activité antifongique n'a été rapportée pour la Sativanine-K (Singh, et al., 2006). L'extrait d'huile de graines de *Z. spina christi* s'est révélé être un bon agent antimicrobien contre quatre types de bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*) et deux champignons (*Aspergillus Niger* et *Candidat albicans*) (Ahmad, et al., 2016).

2.4. Activité anti-nociceptive

Nisar et ses collaborateurs ont testé l'activité anti-nociceptiveles de l'extrait brut méthanolique de *Z. oxyphula* dans des modèles animaux injectés par le formol. Un effet analgésique significatif a été observé (Nisar, et al., 2007). De même, 5 alcaloïdes cyclo-peptidiques tels que l'Oxyphylline-A, l'Oxyphylline-B, l'Oxyphylline-C, la Nummularin-C et la Nummularin-R ont été isolés à partir de la racine de *Z. oxyphula* et testés pour leur activité anti-nociceptive. En conséquence, tous les composés testés ont révélé une réduction proportionnelle à la dose du comportement de fléchissement induit par le formol (Kaleem, et al., 2012).

2.5. Activité antioxydante

Les plantes du genre *Ziziphus*, sont riches en nombreux composés antioxydants tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les saponines. Ces composants se sont révélés être des agents préventifs du stress en réduisant les espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Taati, et al., 2011). Il est intéressant de noter que de nombreuses études in vitro ont démontré l'activité antioxydante des composées phénoliques des extraits des espèces de *Ziziphus*. L'activité antioxydante in vitro de l'extrait méthanolique de fruit de *Z. jujuba* a été testée à l'aide de DPPH, ABTS, FRAP, et du test de chélation du méthyle (Vandita, et al., 2012). Les extraits méthanoliques ont montré un bon pouvoir antioxydant pour tous les tests en fonction de la concentration (Vandita, et al., 2012). Les extraits aqueux du fruit de *Z. jujuba* ont été évalués contre le stress oxydatif induit par l'éthanol en utilisant des rats Wistar mâles. Le prétraitement des rats avec l'extrait aqueux du fruit de *Z.jujuba* (200 mg/kg) contre le stress oxydatif induit par l'éthanol en utilisant des rats Wistar mâles, a empêché la réduction de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) et l'a augmenté à un niveau normal, de sorte qu'il y a eu une augmentation statistiquement significative entre le groupe traité à l'éthanol et le groupe traité à l'extrait de *Ziziphus* plus éthanol, de même, l'activité de superoxyde dismutase

(SOD) n'a pas été modifiée de façon remarquable à la suite du prétraitement des rats avec *Ziziphus* (Taati, et al., 2011).

2.6. Activité antiplasmodiale

Des chercheurs ont isolé et étudié l'activité antiplasmodiale des alcaloïdes des racines de *Z. mauritiana* (mauristine L, mauristine M, nummularine H, nummularine B et l'hémimine A) contre le parasite *Plasmodium falciparum*. Les résultats ont montré que tous les alcaloïdes testés présentaient une puissante activité antiplasmodiale avec une concentration inhibitrice allant de 3,7 à 10,3 mM (Panseeta, et al., 2011). L'extrait brut des feuilles et des racines de *Z. oxyphylla*, et ses fractions (n-hexane, acétate d'éthyle, chloroforme et n-butanol) ont également été évalués pour leur activité antiplasmodiale contre la souche résistante K-1 de *Plasmodium falciparum* en utilisant une méthode de dilution en série (Ahmad, et al., 2016).

Article 1. Genre *Ziziphus* : une revue complète des propriétés phytochimiques, ethnopharmacologiques et pharmacologiques

Afin de mieux comprendre l'état actuel en matière de recherche sur *Zizyphus* et de positionner notre propre recherche en justifiant l'exploration approfondie et l'application complète de cette plante, nous avons élaboré un article de synthèse en passant en revue les activités botaniques, ethnopharmacologiques, phytochimiques et pharmacologiques des espèces de *Ziziphus* ainsi que sa répartition et ses éventuels mécanismes d'action et ses effets toxicologiques.



Review

Genus *Ziziphus*: A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological propertiesEzzouhra El Maaiden^{a,b}, Youssef El Kharrassi^c, Nagib A.S. Qarah^d, Abdel Khalid Essamadi^a, Khadija Moustaid^b, Boubker Nasser^{a,*}^a Department of Biology, University of Hassan I, BP 577, 26000, Settat, Morocco^b Department of Chemistry, University of Hassan I, BP 577, 26000, Settat, Morocco^c Mohammed VI Polytechnic University (UM6P), Laayoune, Morocco^d Department of Chemistry, Faculty of Education- Zabid, Hodeidah University, Hodeidah, Yemen

ARTICLE INFO

Keywords:
Ziziphus, toxicity
 Phytochemistry
 Pharmacology
 Ethnopharmacology
 Ethnobotanical
 Cyclopeptide alkaloids

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The genus *Ziziphus* (Rhamnaceae) contains 58 accepted species that are extensively used by local people and medicinal practitioners in arid and semi-arid regions for the treatment of diarrhoea, dysentery, cholera, diabetic, hypertension, inflammation, intestinal spasm, liver, malaria and other diseases.

Aims of this review: This review article documents and critically assesses, for the first time; up to date categorized information about botanical traits, distribution, traditional uses, phytochemistry, pharmacological and toxicological effects of *Ziziphus* species.

Methods: Information was collected systematically from electronic scientific databases including Google Scholar, Science Direct, PubMed, Web of Science, ACS Publications, Elsevier, SciFinder, Wiley Online Library and CNKI, as well as other literature sources (e.g., books).

Key findings: The phytochemical investigations of plants of this genus have led to the identification of about 431 chemical constituents. Cyclopeptide alkaloids and flavonoids are the predominant groups. The crude extracts and isolated compounds exhibit a wide range of *in vitro* and *in vivo* pharmacologic effects, including antimicrobial, antitumour, antidiabetic, antidiarrhoeal, anti-inflammatory, antipyretic, antioxidant and hepatoprotective activities. Toxicity studies indicate that *Ziziphus* species seems to be non-toxic at typical therapeutic doses.

Conclusion: Phytochemical and pharmacological studies have demonstrated that *Ziziphus* species are important medicinal herbs with prominent bioactivities. The focus so far has only been on ten species; however, plants of this genus can potentially yield a wide range of other products with different properties. Meticulous studies on pharmaceutical standardisation, mode of action of the active constituents and toxicity of *Ziziphus* species are needed to meet the growing demands of the pharmaceutical industry and to exploit their preventive and therapeutic potential fully.

1. Introduction

Several plant genera are recognised for their contribution to both traditional and modern medicine, one of which is the genus *Ziziphus* of the Rhamnaceae family. According to The Plant List (2013), *Ziziphus* is a cosmopolitan genus encompassing 58 accepted species. Plants of this genus are thorny shrubs or small trees, usually armed with a pair of stipular spines, which are widespread in warm-temperate and subtropical regions throughout the world (Evreinoff, 1964; Bhansali, 1975; Liu and Qi, 2004). Different plants among *Ziziphus* spp. Have been used

for thousands of years in medicinal systems to treat various diseases, especially fever, diabetes and skin infections, and they reportedly have antipyretic, antinociceptive, antioxidant, antibacterial and larvicidal activities (Hemmati et al., 2015; Hamed et al., 2016; Verma, 2016; Verma et al., 2018; Sobhani et al., 2019). Many investigations have focussed on the secondary metabolites and pharmacology of species belonging to this genus. To date, a total of 431 compounds have been isolated and identified from *Ziziphus* plants, mainly alkaloids and flavonoids. Modern pharmacognosy and pharmacology investigations have revealed that extracts or ingredients isolated from plants of this

* Corresponding author.

E-mail address: boubker.nasser@uhp.ac.ma (B. Nasser).<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112950>

Received 26 September 2019; Received in revised form 29 April 2020; Accepted 2 May 2020

Available online 22 May 2020

0378-8741/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations			
ABTS ⁺	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); Ach, acetylcholine;	L	leaves
AChE	acetylthiocholine esterase	LD50	median lethal dose
ALP	alkaline phosphatase	LDL	low density lipoproteins
ALT	alanine aminotransferase	MAPK	mitogen-activated protein kinase
A.p	aerial parts	MIC	minimum inhibitory concentration
AST	aspartate aminotransferase	MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	R	roots
ER α	estrogen receptor alpha	ROS	reactive oxygen species
Fl	flowers	Se	seeds
Fr	fruits	SOD	superoxide dismutase
FRAP	ferric reducing antioxidant power	SRSA	Superoxide radical scavenging activity
G (-)	Gram-negative	St	stems
G (+)	Gram-positive;	TB	total bilirubin
GPx	glutathione peroxidase	TCM	traditional Chinese medicine
HDL	high-density lipoprotein	TLC	thin layer chromatography
IC50	50% inhibitory concentration	TRPA	total radical-trapping antioxidant parameter assay
		VLDL	very low density lipoproteins
		ZI	zones of inhibition

genus exhibit an extensive range of biological activities including as anti-inflammatory, anti-diarrheal, antidepressant, anticancer, anti-bacterial, acetylcholine esterase inhibitors, antidiabetic, cytotoxic, anti-pyretic, antinociceptive, antioxidant activities, among others. However, the mechanisms of action and clinical applications of plants of the genus *Ziziphus* have been poorly investigated, and there is a lack of critical information on their toxicity (Elsadig Karar et al., 2016; Sameh et al., 2018).

To the best of our knowledge, no reviews in the literature provide a comprehensive analysis of medicinal *Ziziphus* plants. With the aim to further understand its current research status and provide justification for the in-depth exploration and comprehensive application of this genus, we review the botanical, ethnopharmacological, phytochemistry and pharmacological activities of *Ziziphus* spp., in addition to its distribution and its possible mechanisms of action and toxicology.

2. Methodology

The literature for this review was conducted by searching various scientific electronic databases including Google Scholar, PubMed, Web of Science, SciFinder, Science Direct, ACS Publications, Elsevier and Wiley Online Library. Additional information was derived from other literature sources (books and journals written in English, Latin and Persian). The review reports every aspect of the plant, including its traditional uses, surveys, ethnobotanical, ethnomedicinal and ethnopharmacological uses dates from 1963 to 2019. All articles with a relevant title/abstract were included and no language restrictions applied. All references were checked for additional and unpublished citations. The literature searched is categorized under headings with detail explanation under individual section and respective tables to summarise the data.

3. Taxonomy and botany

3.1. Taxonomy

Ziziphus Mill., belongs to the family Rhamnaceae. The name *Ziziphus* is related to an Arabic word used along the North African coast, *zizoufo* used for *Z. lotus* (L.) Desf., but also related to the ancient Persian words *zizfum* or *zizafun*. In addition, the ancient Greeks used the word *zizifon* for the jujube (Azam-Ali et al., 2006). There is a consensus that this genus contains around 86 species (Evreinoff, 1964; Johnston, 1972); however, some authors suggest there could be up to 135 (Bhansali, 1975), and Liu and Cheng (1995) suggested there could be

up to 170 species. According to The Plant List, 276 names have been given to *Ziziphus* spp., with 58 accepted names, 59 synonyms and 159 unresolved names (The Plant List, 2013). One problem in understanding a somewhat complex taxonomy has been that various authors have utilised similar names for different species. Sometimes in published papers it is not always clear which species is implied, especially when authority for the name is not given or when there is no voucher specimen to ensure the true identity. For example, the Indian jujube (*Z. mauritiana* Lam.) has had the specific name of jujube applied as *Z. jujuba* (L.) Lam. and *Z. jujuba* (L.) Gaertn. in addition to intraspecific taxa of the latter referring to another species *Z. abyssinica* A. Rich, which is also called *Z. jujuba* Hemsl. (Table 1). There are numerous examples like this one among the synonymy, especially with names such as *rotundifolia* or *nummularia*. Less severe, but also a constraint, is that despite being based on broad geographical areas, accounts and names of species do not include inter-regional comparisons (Azam-Ali et al., 2006). For instance, Johnston (1972) considered possible affinities between *Z. lotus* of Mauritania and the Sahara, and *Z. hamer* of East Africa and *Z. leucodermis* (Baki) O. Schwartz of Arabia but only concluded that a thorough field study is desirable. Finally, in understanding the complexity of the taxonomy of *Ziziphus* spp., hybridisation can be a problem and confusing species boundaries and names have been given to some stabilised segregates (Azam-Ali et al., 2006).

3.2. Distribution

Ziziphus spp. are pervasively distributed throughout both temperate and tropical parts of the world (Johnston, 1963), mostly concentrated in Africa, Asia, and America. However, a few species can be found in the Pacific Islands, Europe and Australia (Bhandari and Bhansali, 2000). This genus became more widespread due to their ability to adapt to a variety of ecological conditions (Liu and Henkel, 2002). There are two major domesticated jujubes, *Z. mauritiana*, the Indian jujube or ber, and *Z. jujuba*, the Chinese or common jujube. These two species have been cultivated over vast areas of the old world, whereas other species, like *Z. nummularia*, *Z. spina-Christi* and *Z. mucronata*, are restricted to distinct regions (ArndtClifford and Popp, 2001). The geographical distribution of common *Ziziphus* spp. is listed in Table 2.

3.3. Botanical traits

The plants of the genus are erect or straggling, shrubs or trees, often climbing, evergreen or deciduous. Species may be spiny or not, but more commonly are so, and they can be glabrous or relatively hairy.

Table 1
Scientific names and synonyms of reported *Ziziphus* spp. (According to The Plant List (2013)).

Latin names	Synonyms
<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	<i>Ziziphus sativa</i> Gaertn. <i>Ziziphus vulgaris</i> Lam. <i>Ziziphus flexuosa</i> Wall. <i>Ziziphus nitida</i> Roxb. <i>Ziziphus sinensis</i> Lam. <i>Ziziphus</i> (L.) Karst. <i>Ziziphus mairei</i> Dode <i>Ziziphus officinarum</i> Med. <i>Ziziphus chinensis</i> D.C. <i>Ziziphus chinensis</i> Watt
<i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam.	<i>Ziziphus nummularia</i> Aubrev. <i>Ziziphus saharae</i> Blatt. & Trab. <i>Ziziphus lotus</i> (L.) Desf. Subsp. <i>Saharae</i> <i>Maire</i> . <i>Ziziphus sylvestris</i> Mill. <i>Ziziphus parviflora</i> Del. <i>Rhamnus jujuba</i> L. <i>Ziziphus aucheri</i> Boiss. <i>Ziziphus insularis</i> Smith <i>Ziziphus jujuba</i> (L.) Gaertn., nom. illeg. <i>Ziziphus jujube</i> (L.) Lam. <i>Ziziphus mauritiana</i> nom. illeg. <i>Ziziphus orthocantha</i> D.C. <i>Ziziphus rotundata</i> D.C. <i>Ziziphus sonoria</i> Roem. And Schult <i>Ziziphus tomentosa</i> Poir. <i>Ziziphus mauritiana</i> nom. illeg.
<i>Ziziphus nummularia</i> (Burm.f.) Wight	<i>Rhamnus microphylla</i> Roxb. <i>Rhamnus nummularia</i> Burm.f. <i>Ziziphus microphylla</i> Roxb. <i>Ziziphus nummularia</i> var. <i>glabrescens</i> Bhandari and Bhansali Fasc. <i>Ziziphus rotundifolia</i> Lam. <i>Rhamnus divaricata</i> Forsk. <i>Rhamnus heterogenea</i> Burm.f. <i>Rhamnus recta</i> Forsk. <i>Rhamnus spina-christi</i> L. <i>Ziziphus africana</i> Mill. <i>Ziziphus amphibia</i> A. Chev. <i>Ziziphus heterogenea</i> Poir.
<i>Ziziphus spina-christi</i> (L.) Desf.	<i>Rhamnus sphaerocarpa</i> Tul <i>Rhamnus rotundifolia</i> Pers. <i>Rhamnus xylopyrus</i> Retz. <i>Ziziphus caracatta</i> Buch.-Ham. <i>Ziziphus cuneata</i> Wall. <i>Ziziphus elliptica</i> . <i>Ziziphus glaberrima</i> (Sedgw.) <i>Ziziphus heterogenea</i> Russell. <i>Ziziphus orbicularis</i> Schult. <i>Ziziphus rotundifolia</i> (Pers.). <i>Ziziphus ruminata</i> Buch. - Ham. <i>Ziziphus zonulatus</i> Blanco.
<i>Ziziphus xylopyrus</i> (Retz.) Willd.	

Spines are solitary or in pairs, usually one straight and the other curved. The leaves of the plants are alternate or, more rarely subopposite grow with stipules. The leaves are simple and membranous or coriaceous, entire or crenate, acuminate, toothed or not, and are 3–5 nerved at the base. The flowers are 5-merous, hermaphrodite, actinomorphic, yellow-green, in axillary fascicles or in sessile or peduncled cymes, shallow calyx tube, ovate-triangular or triangular sepals keeled within, petals cucullate, deflexed or incurved, rarely absent, five stamens, included or excluded, inserted below the disc, ovary globose, 2-4-loculed, sunk in the disk and adnate to base; 2–4 styles, usually free or partially united; stigma papillose. The fruits are globose, oblong drupe or ovoid, base with persistent calyx tube, apex mucronulate; putamen woody, 1-4-celled. They are 1–4 seeded, but drupes mostly contain one seed that has a large embryo with sparse or absent endosperm (Qaisar and Nazimmudin, 1981; Azam-Ali et al., 2006).

Table 2
Geographical distribution of some common *Ziziphus* spp.

Continent	Species	Regions
Africa	<i>Z. abyssinica</i> Hochst.	Tropical Africa
	<i>Z. lotus</i> Lam.	Northern Africa
	<i>Z. mauritiana</i> Lam.	Tropical Africa, Sahel Zone, Zimbabwe
	<i>Z. mucronata</i> Willd.	Southern Africa
	<i>Z. spina-christi</i> Willd.	Middle east
Asia	<i>Z. jujuba</i> Mill.	China, India, Korea, Malaysia
	<i>Z. mauritiana</i> Lamk.	China, India, Pakistan, Malaysia
	<i>Z. nummularia</i> W.i.A.	India
	<i>Z. oenophla</i> Mill.	Tropical Asia
	<i>Z. rotundifolia</i> Lam.	India, Pakistan
	<i>Z. rugosa</i> Lam.	India
	<i>Z. sativa</i> Gaertn.	Pakistan
	<i>Z. spina-christi</i> Willd.	Middle east
	<i>Z. xylopyrus</i> Willd.	China, India
	<i>Z. fumulosa</i> Buch. - Ham	India
	<i>Z. glabrata</i> Heyne ex Roth	China, India
	<i>Z. xylopyrus</i> Willd.	India, Nepal and Sri Lanka
Australia	<i>Z. mauritiana</i> Lamk. <i>Z. oenophla</i> Mill.	
Europe	<i>Z. jujuba</i> Mill.	Mediterranean
	<i>Z. lotus</i> Lamk.	Mediterranean
	<i>Z. mauritiana</i> Lam.	Mediterranean
North America	<i>Z. sativa</i> Gaertn.	Mediterranean
	<i>Z. amole</i> M.C. Johnston.	Mexico
	<i>Z. celata</i> J.I.H.	USA
	<i>Z. jujuba</i> Mill.	USA
South America	<i>Z. mexicana</i> Rose	Mexico
	<i>Z. obtusifolia</i> Gray	Mexico, USA
	<i>Z. cinnamomeum</i> Tr. & Pl.	Venezuela
	<i>Z. mistol</i> Griseb.	Argentina, Paraguay
	<i>Z. joazeiro</i> Mart.	Brazil, Paraguay
	<i>Z. oblongifolia</i> S. Moore	Brazil

4. Ethnopharmacology: traditional practices

Ziziphus species have been used for many therapeutic purposes by people across the world. Specifically, plants of the *Ziziphus* genus are used to treat various maladies and afflictions in areas such as India, China, the Middle East, Southern Africa and South America. Five species belonging to the *Ziziphus* genus, *Z. jujuba*, *Z. mauritiana*, *Z. nummularia*, *Z. spina-christi*, and *Z. xylopyrus*, have been recorded and described in the scientific literature. This review focuses on these species and discusses their local and traditional uses.

Z. jujuba, is believed to have different biological activities. It was referenced in the well known old Chinese therapeutic book "Sheng Nong Ben Cao Jing", and has customarily been used in oriental medicine. In traditional Chinese medication (TCM), the dried fruits are recommended as anti-tumour, styptic and tonic (Hamed et al., 2016). In Japan, the extracts of *Z. jujuba* is used to treat chronic hepatitis or pain in the chest and ribs. The local tribal people use the bark of *Z. jujuba* to prevent the pregnancy. In Haiti, the leaves, fruits and roots of *Z. jujuba* are boiled to make a decoction, which is consumed as a tea for an anti-harm (Azam-Ali et al., 2006). The fruits are widely used in Iranian folk medicine as an antitussive, laxative agent and blood pressure reducer (Hemmati et al., 2015). The fruit is digestible, tonic, aphrodisiac, laxative, burning sensations, thirst, vomiting and it is also reportedly used to treat tuberculosis and blood sicknesses. The seeds fix eye ailments, and they are also helpful in leucorrhoea (Mahajan and Chopda, 2009).

Z. mauritiana, has been used as a traditional medication for many illnesses. Pareek (2013) referenced that the fruit of *Z. mauritiana* has been used in traditional Chinese and Korean medicine for over 4000 years Bellakhdar (1997). The fruit acts as a drug that it treats stomach, astringency, heartburn, blood sanitization, biliousness, diuretic, scabies, nausea and regurgitating. Fruit extract concentrates are also utilised for healthy skin items (Morton, 1987). moisturise and treat

sunburn (Mishra et al., 2011). The fruits are also blended with salt to treat indigestion and biliousness. Investigations carried out in India by Mishra et al. (2011), revealed anticancer effects of the seed concentrates, with diminished tumor volume, tumour cell number and decreased hemoglobin content. The seeds are taken, sometimes with buttermilk, to stop nausea, vomiting, and abdominal pains during pregnancy. In traditional Chinese medication, *Z. mauritiana* seeds are squashed and used to treat anxiety and sleeping disorders. The seeds are also blended with oil and applied to rheumatic territories. The leaves of *Z. mauritiana* are used in the treatment of diarrhoea, fever, and respiratory diseases, and can be applied as poultices for liver issues, asthma and fever (Mahesh and Satish, 2008; Mishra et al., 2011). As described by Dahiru et al. (2006), bark glue is utilised to speed the healing of bruises and ulcers and as a wound dressing. The pounded roots are added to drinking water and given to poultry to treat diarrhoea and to people for heartburn. Juice extracted from the root bark is said to reduce gout, stiffness and epilepsy (Dahiru et al., 2006). The dried root is used to treat diarrhoea in northern areas of Nigeria. Diarrhoea is one of the chief reasons for death in developing nations, particularly in newborn children (Mishra et al., 2011; Marton, 1987).

In Pakistan and the Sariska area of India, the fruit of *Z. nummularia* is used against cooling, edible, tonic, expels biliousness, burning sensations, thirst and vomiting (Upadhyay et al., 2011). The seeds are used to treat eye disorders and are also helpful in leucorrhoea (Oudhia, 2001-2003). The traditional healers of the Bastar region use dried leaves of the *Z. nummularia* plant to dress the injuries (Rauf et al., 2016). Historically, the crisp leaf juice of *Z. nummularia* was combined with cow's milk to aid in smallpox recovery (Rauf et al., 2016). The traditional healers of Mudpar applied the fresh leaves with cumin to treat urinary diseases and an aqueous paste of the leaves to calm a consuming sensation (Azam-Ali et al., 2006). The bark fixes bubbles and is useful to treat dysentery. The roots are applied to treat dysentery, given with cow's milk until the patient recovers (Singh et al., 2012). The root is bitter and cooling, fixes biliousness and headache. To treat hoarseness of the throat, traditional healers encourage patients to keep the fresh roots of *Z. nummularia* inside their mouth (Oudhia, 2001-2003).

Jagtap et al. (2006) reported the utilisation of pulverized fresh fruits of *Z. xylopyrus* for the urinary problem, administered multiple times per day. In Paliyan tribes of the Sirumalai hills of southern India, the fruit triturate of *Z. xylopyrus* in mixture with milk was thought to assist with diabetes when continuously taken for five days (Karuppusamy, 2007). Tetali et al. (2009) reported that 15 ml of seed powder in one cup of water or bubbled milk or tea is helpful to treat diarrhoea when taken orally multiple times per day for two days. As per Jain et al. (2004) the pigment recovered from the fruits has been used for leather production through the treatment and processing of animal hides by Bheel tribes of Guna district of Madhya Pradesh.

Stomach indigestion can be treated with a powder mixture of fruit and pinch of ginger when taken orally three times per day (Reddy et al., 2009). Naidu and Khasim (2010), reported the utilisation of the leaf glue of this plant and latex of *Ipomea carnea* to treat pimples or bubbles as well as its utilisation by individuals of the Eastern Ghats of Andhra Pradesh. Reddy et al. (2009), have detailed that diseases such as trypanosomiasis, anthrax, and ephemeral fever which are prominent in the Eastern Ghats of Andhra Pradesh (India), can be treated with a mixture of the powdered root of *Z. xylopyrus* and bark obtained from the stem of *Erythroxylum monogynum*, *Pterocarpus marsupium*, *Calotropis gigantea* with water, administered internally once per day for 2-3 days. Rao and Sunitha (2011), described the use of tablets manufactured from the powder of stem bark for treating cholera. To cure skin rashes, Eturnagaram Mandal of Warangal district of Andhra Pradesh, India, use a water concentrate of bark (Rajendar et al., 2010). According to Kumari et al. (2011), a mixture of bark powder of the root of the whole plant of *Viscum articulatum*, *Anogeissus latifolia*, *Acacia catechu*, and *Z. xylopyrus* is useful in patients suffering from piles and hemorrhage of the nose and

mouth.

Z. spina-christi has long been used by Arabs in folklore medicine to maintain health (El Ghazali et al., 1994). In Saudi Arabia, the fruit when in an adequate amount, acts as a laxative (Saied et al., 2008). The fruit is also said to fix hacks, resolve some other lung complaints, mitigate the interior organs and decrease water maintenance (Jongbloed, 2003). In Sudan, fruits are used for sore throats, the bark is used for chest pain, and a root infusion is administered for dysentery (El Ghazali et al., 1997). The leaves kill diarrhoea-causing parasites and worms in the intestinal tract (Saied et al., 2008). In Egypt, the leaves are applied in conventional medication to treat abscesses, bubbles and swollen eyes, and its fiery wood debris is applied to treat snakebite. (Abdel Galil and El Jissry, 1991). The stem bark is used to calm toothache and fevers (Han et al., 1990; Han and Park, 1987). The root, stem bark and leaves are used in different medicinal preparations in tropical Africa, especially in the Kapisiki country (Dafni et al., 2005). In Zimbabwe, the roots are commonly used to treat urinary and gynaecological complaints, but traditional practices vary from region to region. Bark decoctions have been recorded in South Africa for chest diseases (Tree Society of Zimbabwe, 2001). In Mali and Niger, the roots and the leaves are used for gastric infections, chest pain, venereal diseases, diarrhoea, wounds, constipation and nervousness (Neuwinger, 1996; El Ghazali et al., 1997).

5. Phytochemistry

Table in supplementary data 1 summarise up-to-date information on the phytochemical composition of *Ziziphus* species. These include 165 alkaloids, 151 flavonoids, 43 terpenoids, 31 saponins and 40 other compounds. Each phytochemical is numbered (1-431) and cited in the text. Regarding isolated phytochemicals of the *Ziziphus* genus, the leaves were the most common targets of the investigation for isolation of bioactive compounds.

5.1. Alkaloids

Cyclopeptide alkaloids are polyamidic compounds/consisting of a 13-/14- or 15-membered ring and a side chain which has either a basic or neutral character depending on the presence of a terminal nitrogen atom. Although they occur in various plant families, they are most widely distributed in the Rhamnaceae family. Many species of *Ziziphus* are famous for cyclopeptide alkaloids (while the spelling 'Ziziphus' is also used, 'Ziziphus' is used throughout this review). Until now, 165 cyclopeptide alkaloids have been reported in different *Ziziphus* species (Supplementary data). The 13-membered cyclopeptide alkaloids include nummularine-C type and ziziphine-A type. The alkaloids with a 14-membered ring include frangulanine-B type, aduotine-Z type, amphibine-B type, amphibine-F type, pandamine type, and integerrine type. Whereas the 15-membered ring is mucronine-A type. These cyclopeptide alkaloids have been discussed in various reviews due to their intriguing chemical and biological properties. They also receive special consideration based on their traditional activities, including sedative, antimicrobial, hypoglycemic, antiparasitic, anti-infectious, anti-diabetic, analgesic and anticonvulsant, and anti-inflammatory activities (Han and Park, 1987; Nisar et al., 2011; Choudhary et al., 2011; and Kaleem et al., 2012; Tschesche et al., 1972; Tschesche and Ammermann, 1974; Pandey et al., 1984; Shah and AuthorAnonymous, 1985; Pandey et al., 1986; Shah et al., 1986; Dwivedi et al., 1987; Shah et al., 1988; Han et al., 1989; Shah et al., 1989; Tripathi et al., 1989; Han et al., 1990; Abdel Galil and El Jissry, 1991; Barboni et al., 1994; Cassels et al., 1974; Devi et al., 1995; Ghedira et al., 1995; Singh and Ahlawat, 1995; Gournelis et al., 1998; Morel et al., 1998; Jossang and ZahirDiakite, 1996; Marchand et al., 1986; Pais et al., 1963; Lin et al., 2000; Tripathi et al., 2001; Croucour, 2002; SuksamrarnSuwannapoch et al., 2005; Singh et al., 2006; Singh et al., 2007; Rahman et al., 2007; Pandey et al., 2008; Pandey et al., 2008; Han et al., 2011; Manoj et al.,

Table 3
Summary of the pharmacological activities for *Ziziphus* spp.

Pharmacological Activity	Species	Part/s Used	Study design	Model	Extract/isolated compound/s	Dosage/duration	Positive controls	Effect/Observation	references
Antimicrobial activity	<i>Z. spina christi</i>	Stem Bark	Anti-bacterial activity determined by measuring zones of inhibition of each sample wells. Bacteria such as G (+) (<i>Staphylococcus pneumoniae</i> : RCMB 010010, <i>Bacillus subtilis</i> : RCMB 010067), and G (-) bacteria (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : RCMB 010043, <i>Escherichia coli</i> : RCMB 010052).	In vitro	Ethanol, aqueous and ethyl acetate extracts	100 µL	Amphotericin B, Ampicillin, and Gentamicin	All extracts showed antimicrobial activity against these pathogenic microorganisms, ethyl acetate extract showed significantly ($p < 0.05$) higher antimicrobial activity than Ethanol extract. Strongest antimicrobial activity of the bark of <i>Z. spina-christi</i> was observed against <i>Bacillus subtilis</i> followed by <i>Geotrichum candidum</i> .	Musabah et al. (1988)
			Anti-bacterial activity of n-hexane extracts against <i>Radomia adonia cearensis</i> (LN827661), <i>Dickeya solani</i> (LY92238), <i>Pectobacterium carotovorum subsp.</i> (LN851554), <i>carotovorum</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> (LN851551), and <i>Bacillus pumilus</i> (LN880277), was determined using the disc diffusion method.	In vitro	n-hexane	6, 32, 64, 125, 250, 500, 1000, and 2000 µg/mL	Gentamicin	MIC values of n-hexane extract from <i>Z. spina-christi</i> were 32, 64, 32, 64, <i>R. solanaceum</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>P. carotovorum</i> , and <i>D. solani</i> , respectively.	El-Halwasy et al., 2018
			The anti-bacterial activity was performed using the agar diffusion method against G (+) (<i>Bacillus subtilis</i> : S168, <i>Bacillus aquimaris</i> : MB-2011, and <i>Clostridium michiganense</i> : G579-390 as well as three G (-) strains (<i>Escherichia coli</i> : DH5α, <i>Erwinia amylovora</i> : 1189, and <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> : DC300).	In vitro	Aqueous and methanol extracts	100 µg/ml		The plant extracts tested showed antibacterial activity only against the G (+) bacterium <i>B. aquimaris</i> MB2011 and the G (-) representative <i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> DC300 while the other bacterial strains were not affected at all	Elandig Kazar et al., 2016
	<i>Z. oxyphylla</i>	Stem and Leaf	The Anti-bacterial activity was determined by measuring zones of inhibition of each sample wells. Both G (-) and G (+) bacteria such as <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Salmonella typhi</i> .	In vitro	Methanolic, ethyl acetate, n-Butanol and aqueous fraction	300 µg/mL	Imipenem	Neither crude extract nor any of subsequent fractions showed any antibacterial activity. For leaves, Ethyl acetate fraction showed good activity (16 mm zone of inhibition) against <i>B. subtilis</i> and (18 mm zone of inhibition) <i>S. aureus</i> whereas remaining fraction along with crude extract did not show any inhibition.	Nisar et al. (2010); Nisar et al. (2011)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Leaf and root	Antibacterial activity was carried out for <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> using Mueller-Hinton broth. The inoculum consisted of 105 CFU/mL for bacteria. Results were interpreted spectrophotometrically by plate reader after addition of MTT and resazurin as redox indicator	In vitro	Methanolic, ethyl acetate, chloroform, n-butanol, n-Hexane, and aqueous fraction	2000 µg/mL	Chloramphenicol and Erythromycin	All the fractions from leaves and root crude extract were inactive against <i>E. coli</i> , whereas the only fractions active against <i>S. aureus</i> were chloroform as well as ethyl acetate fraction with an IC50 value; 15.5 and 22.4 µg/ml respectively.	Ahmad et al. (2016)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Stem	The isolated compound was screened for antibacterial activity against <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. typhi</i> using disc diffusion technique. A known volume (10 ml) of the solution was applied to sterilized filter paper discs and dried at room temperature. Results recorded as zone of inhibition (mm).	In vitro	Oxyphylline-A Oxyphylline-B Oxyphylline-C Nummularin-C Nummularin-R	10 µg/mL 12–15h	Imipenem	Oxyphylline-B showed comparatively better antibacterial activities against <i>E. coli</i> (MIC, 5 mg/ml) as well as weak antimicrobial activities against <i>S. aureus</i> (MIC, 25 mg/ml) <i>P. aeruginosa</i> (MIC, 50 mg/ml) and <i>S. typhi</i> (MIC, 50 mg/ml). Oxyphylline-A, nummularin-C, nummularin-R and oxyphylline-C exhibited low activities.	Kaleem et al. (2012)

(continued on next page)

Table 3 (continued).

Pharmacological Activity	Species	Part/s Used	Study design	Model	Extract/isolated compound/s	Dosage/duration	Positive controls	Effect/Observation	references
Antifungal activity	<i>Z. mauritiana</i>	Leaf	The antifungal activity was carried out by Agar tube dilution method for <i>Borys cinerea</i>	In vitro	Mauritine-K Sativamine-K	200–1000 µg/mL		Mauritine-K (73), isolated from <i>Z. mauritiana</i> Lam., exhibited antifungal activity (inhibition of spore germination) against <i>Borys cinerea</i> at doses ranging from 200 to 1000 µg/mL. Sativamine-K (131) on the other hand was not active against any of the fungal strain tested. The plant shows no antifungal activity	Singh et al. (2007)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Leaf and root	The antifungal activity was carried out for <i>T. rubrum</i> , <i>A. fumigatus</i> and <i>C. albicans</i> using Sabouraud broth. The inoculum consisted of 104 CFU/mL for fungi. Results were interpreted by plate reader after addition of MTT and resazurin as redox indicator	In vitro	Methanolic extract, n-hexane, n-butanol, chloroform, ethyl acetate, and aqueous fraction	20 µg/mL	Miconazole	None of the fraction was active against any of the fungal strain tested. The plant shows no antifungal activity	Ahmad et al. (2016)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Stem	The antifungal activity was determined by Agar tube dilution method. Six fungi <i>Trichophyton longifusus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Conidia glabrata</i> , <i>Pisarium solani</i> , <i>Microsporum canis</i> and <i>Aspergillus flavus</i> were used to see the antifungal activity. The samples were incubated for 7 days at 29C and growth inhibition was observed.	In vitro	Methanolic extract, n-hexane, n-butanol, chloroform, ethyl acetate, and aqueous fraction	400 µg/mL	Miconazole and Amphoteracin-B	Maximum antifungal activity (35%) was shown against <i>M. canis</i> by n-hexane fraction followed by crude extract and ethyl acetate fraction with antifungal activity of 30%. The n-butanol fraction exhibited 20% antifungal activity whereas crude extract and aqueous fraction showed 10% inhibition against <i>A. flavus</i> and <i>F. solani</i> respectively. 0.4 or 0.8 ml/mouse/day of extracts produced a dose-dependent inhibitory effect on gastric tumor growth after 28-day drug treatment. This was associated with a decrease of cellular proliferation by 35% with concomitant increase in apoptosis by 97% in gastric tumor cells when compared with the control group.	Nisar et al. (2011)
Antitumour activity	<i>Z. jujuba</i>	Fruit	Gastric cancer tissues (1.5 mm3) were implanted subcutaneously (s.c.) into the right dorsal area of female athymic balb/c nude mice. Tumor areas were measured every 7 days using a caliper, and the tumor area was calculated.	In vivo	Aqueous extracts	0.2–0.8 ml/mouse/28 days			Shin et al. (2004)
	<i>Z. jujuba</i>	Fruit	MTT assay was used to determine the inhibitory effect of extraction C6-43 cell proliferation. Cell cycle progression was monitored by sub-G1 apoptosis assay using flow cytometry and anti-mutagenicity properties of the extract were evaluated using a standard reverse mutation assay (Ames test).	In vitro	Aqueous extract	0–2000 µg/mL	Sodiumazide	Extract inhibited the growth of C6-43 cells in a concentration range of 0.5–2 mg/mL and exhibited cytotoxic effects on C643 cells in a concentration dependent manner (IC50:1.671 mg/mL). In addition, the herbal extract prevented de novo mutations and the hindrance percent was 87.97%. n-hexane, chloroform and methanolic extracts exerted significant antiproliferative effects on estrogen receptor alpha (ERα) positive MCF-7 (IC50 values of 14.42, 7.64, 1.69 µg/mL respectively) and ERα negative SKBR3 (IC50 values of 14.06, 6.21, 3.70 µg/mL respectively) human breast cancer cells.	Dubaghian et al. (2018)
	<i>Z. jujuba</i>	Fruit	the effects of increasing concentrations of extract on ER ₊ positive MCF-7 and ER ₋ negative SKBR3 breast cancer cell proliferation using was analyzed MTT assays. Apoptosis was analyzed by evaluating the involvement of some pro-apoptotic proteins, including Bax, Bad, Bid and PARP cleavage by immunoblotting analysis, and the effects of extracts treatment on apoptosis were tested by both DNA fragmentation and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL) staining.	In vitro	n-hexane, chloroform and methanolic extracts	0.1–50 µg/mL			Plastina et al. (2012)

(continued on next page)

Table 3 (continued).

Pharmacological Activity	Species	Part/s Used	Study design	Model	Extract/isolated compound/s	Dosage/duration	Positive controls	Effect/Observation	references
	<i>Z. jujuba</i>	Fruit	Apoptotic cell-death-inducing activities in human cancer cell lines (A549, PC-3, and MDA-MB-231) of Purified aliphatic acid (366) was evaluated.		Aliphatic acid		Mito-TEMPO and a specific p38 inhibitor (SR2035540)	Aliphatic acid increased both the mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and the phosphorylation of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) and decreased the mitochondrial membrane potential.	Shin et al. (2018)
Anti-cholinesterase inhibitory	<i>Z. spina christi</i>	Bark, Leaf and Root	Inhibition of acetylcholinesterase was studied based on Ellman's method using thin layer chromatography (TLC) and microplate assays.	In vitro	Dichloromethane, ethyl acetate and ethanol extracts	300–1000 µg/mL	Galanthamine	Dichloromethane and ethyl acetate (leaf and bark) extracts showed highest IC50 value (1.0–0.3 mg/ml). The lowest IC50 value was observed with ethanolic bark and root extracts (0.09 mg/ml).	Eldien and Van Staden, 2007
	<i>Z. oxyphylla</i>	Whole plant	The reaction mixture (phosphate buffer, acetylcholine esterase, different concentrations of extract/tractions solution, DTNB) was incubated for 15 min and the hydrolysis of acetylthiocholine was monitored at 405–412 nm.	In vitro	n-Butanol extract	30–150 µg/mL	Galanthamine	The n- butanol fraction showed lowest IC50 value (9.58, 0.08 mg/ml), indicating that it contained the best inhibition of the enzyme relative to galanthamine	Mazhar et al. (2013)
Antidiabetic activity	<i>Z. jujuba</i>	Leaf	Alloxan induced diabetic rats treated by gavage for a period of 5 days by supplementation of extract at distilled water. Glucose- triglyceride- cholesterol and VLDL levels were measured in diabetic in comparison with no diabetic	In vivo	Ethanolic extract	100 mg/kg/5day		The analysis variance results indicated that the extract have significant reduction ($P = 0.001$) of Glucose, triglyceride and cholesterol. Also, the extract reduced diabetic rats LDL level, but it wasn't significant ($P = 0.12$).	Sherifi et al. (2009)
	<i>Z. mauritiana</i>	Seed	Diabetic rats treated extract was administered orally and their blood glucose level (in acute and sub-acute study), body weight, and mortality rate were monitored.		Aqueous extract	100–800 mg/kg	Glyburide	Administration of the extract reduced the weight loss and mortality rate during the sub-acute study. The extract also augmented the glucose tolerance in both normal and diabetic mice. These results suggest that the extract possesses synergistic hypoglycemic activity	Mishra et al. (2011)
	<i>Z. spina christi</i>	Fruit	After 4 weeks of treatment of diabetic rats. Serum insulin, lipid profiles, liver and kidney functions were measured.	In vivo	Alcoholic and hydroalcoholic extract	500 mg/kg/4 weeks	Glibenclamide Christinin-A	Hydroalcoholic extract resulted in a significant decrease in the level of blood glucose, with a concomitant significant increase in the serum insulin level, in diabetic dogs ($p < 0.05$).	Avizah et al. (2010)
	<i>Z. spina christi</i>	Root	100 mg/kg extract was used to treat diabetic rats orally. Fasting serum glucose was measured every week and the period of the treatment continued for 2 weeks. Serum insulin, lipid profiles, liver and kidney functions were measured at the end of experiment.	In vivo	Water extracts	100 mg/kg/2week	Christinin-A	The data revealed that extract significantly reduced fasting serum glucose levels ($p < 0.001$), serum insulin level ($p < 0.001$) and markedly increase the hyperglycemia, hyperlipidemia and peroxidases that associate diabetes.	Pandey et al. (2008)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Stem and root	α -Glucosidase inhibitory activity was assayed by using 0.1M phosphate buffer (pH 6.8) at 37 °C and change in absorbance at 400 nm was monitored up to 30 min.	In vitro	Nummularin-C Nummularin-R Hemisin-A		1-Deoxynojirimycin	All cyclopeptide alkaloids 1–3, were found to inhibit α -glucosidase enzyme. Compound 1 showed IC50 = 212 nM, compound 2 possess IC50 = 251 nM, while compound 3 showed IC50 = 394 nM.	Choudhary et al. (2011)

(continued on next page)

Table 3 (continued).

Pharmacological Activity	Species	Part/s Used	Study design	Model	Extract/isolated compound/s	Dosage/duration	Positive controls	Effect/Observation	references
Anti-diarrheal activity	<i>Z. nummularia</i>	Leaf	Balb/C mice were fasted before the experiment for 24 h, housed in individual cages and were divided in five groups (n = 5). After 1 h of treatment all groups received castor oil (10 mL/kg, p.o.), 4 h post treatment (Brewer's Yeast injection) observation was carried out in order to check the presence of diarrheal droppings, absence of diarrheal droppings was recorded as a positive result.	In vivo	Aqueous-methanol extract	50, 100 and 300 mg/kg	loperamide	Saline treated group shows no protection. Mice pretreated with extract (50, 100, and 300 mg/kg) exhibited 20, 40 and 80% protection respectively (p < 0.05 versus saline group). The positive control group, Loperamide (10 mg/kg) showed 100% protection from diarrhoea (p < 0.01 versus saline groups)	Hussain et al. (2017)
	<i>Z. nigra</i>	Leaf			Methanolic extract	200 and 400 mg/kg	Paracetamol	Methanolic extract at a dose of 200 mg/kg caused a highly significant reduction at third hour (p < 0.001) comparable with that of paracetamol. However, the effect increases significantly at the dose of 400 mg/kg having p < 0.01 at first, second and fourth hour.	Hari et al. (2012)
	<i>Z. mauritiana</i>	Root			Methanolic extract	25 and 50 mg/kg		A dose dependent decrease of gastrointestinal transit was observed with extracts (25 and 50 mg/kg) which also protected mice against castor oil induced diarrhoea and castor oil induced fluid accumulation, respectively.	Dabiru et al. (2006)
Anti-inflammatory Activity	<i>Z. spina christi</i>	Fruit/Seed	The anti-inflammatory activity of the extracts was measured at 660 nm by using double distilled water as blank.	In vitro	Alcoholic extract	100–500 µg/mL	Diclofenac sodium	A significant difference in the inhibition of thermally induced protein denaturation was observed in case of seed extract when compared with fruit extract at concentrations of 100 and 500 µg/mL.	Mushah et al. (1998)
	<i>Z. spina christi</i>	Leaf	Male Sprague-Dewley rats (200–250 g) were used to testing anti-inflammatory and diuretic activity. extract was given 1 h before carrageenan injection. Oxphenbuta-zone (100 mg/kg orally) was used as a standard anti-inflammatory drug.	In vivo	Ethanol aqueous	500 mg/kg	Oxphenbuta-zone	The ethanolic extract caused a highly significant reduction in the volume of the rat paw (p < 0.01) indicating considerable anti-inflammatory activity. The effect was in its maximum (38%) at 3 h. Oxphenbutazone showed a bigger reduction (65% - P < 0.001).	Ali et al. (2015)
Antihepatoanal Activity	<i>Z. oxyphylla</i>	Stem	Male mice (Swiss albino), weighing 19–26 g was used in the study and carrageenan-induced edema model was used where acute inflammation was produced by sub-planter injection of 0.1 ml of 1% suspension of carrageenan in normal saline, in the hind paw of the mice.	In vivo	Methanolic extract	50, 200 and 400 mg/kg	Indomethacin	The overall activity of drug was really stronger as compare to saline and standard drug indomethacin throughout and was found influential in a dose dependent manner. The curative time for first 2 h at 400 mg/kg drug concentration was found	Nisar et al. (2011)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Leaf	Administration of the test sample as well as the positive and negative controls the paw volume was measured plethysmometrically	In vitro	Kushcarpin-A	5, 10 and 20 mg/kg		Carrageenan-induced paw edema was significantly reduced in a dose-dependent fashion by the treatment of Kushcarpin-A.	Ali et al. (2015)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Leaf and Root	L. infundum inoculum was prepared, by harvesting the infected donor hamster's	In vivo	Methanolic extract (i.e.), n-Hexane, ethyl acetate, n-	20 mg/ml	Millerfosine	The only fraction active against L. infantum inhibition was root	Ahmad et al. (2016)

(continued on next page)

Table 3 (continued).

Pharmacological Activity	Species	Part/s Used	Study design	Model	Extract/isolated compound/s	Dosage/duration	Positive controls	Effect/Observation	references
			spleen aseptically and used to infect murine peritoneal macrophages. 104 cells/well of the peritoneal cells were added to microtiter plate, incubated, prediluted extracts added and after 5 days the parasite burden was noted through microscope using Giemsa stain.		butanol chloroform, and aqueous fraction			chloroform fraction with IC50 value, 32.4 µg/ml. all other fractions were inactive.	
Anti-nociceptive Activity	<i>Z. spina christi</i>	leaf	Antinociceptive effect was induced by 0.6% aqueous solution of acetic acid in Wistar rats and tested by thermal (hot plate) tests	In vitro	Aqueous extract	250–1000 mg/kg- 1	Pethidine Hydrochloride	At a dose of 250 mg/kg, the extract produced comparable effect to that of 10 mg/kg of pethidine hydrochloride in suppressing the number of writhing induced by acetic acid.	Elfrain et al. (2009).
	<i>Z. spina christi</i>	Root bark	The antinociceptive effect was shown in mice by acetic acid-induced writhing, formalin and thermal (hot plate) tests.	In vitro	Aqueous extract	50 and 100 mg/kg		Aqueous extract demonstrated a dose-dependent analgesic effect. Its i.p. LD50 in mice was 2236.07 mg/kg.	Adzu et al. (2008)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Root	Formalin induced flinching behavior test was performed by injecting 0.05 ml of formalin (2.5%) into the plantar surface of the right hind paw, 30 min after treating the animals with the compound. Nociceptive behavior was quantified as the animal walking or can stand on the injected paw.	In vitro	Oxyphylline-A Oxyphylline-B Oxyphylline-C Nummularin-C Nummularin-R	2.5 and 5mg/kg	Tramadol	Compound 1 provoked 45.32% and 75.32% while Compound 5, 36.77% and 71.10% protection in the 1st and 2nd phases of formalin induced flinching behaviour test respectively	Kaleem et al. (2012)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Aerial parts of the plant	For antinociceptive activity acetic acid-induced writhing was performed over Swiss albino mice (20–28 g) of both sexes. Abdominal constriction i.e. contractions of the abdominal muscle (stretching of hind limps) that occurred between 5 and 15 min after acetic acid injection were counted and expressed as percent inhibition of nociception	In vitro	Methanolic extract	50, 100 and 200 mg/kg	Analgin	The abdominal constrictions induced by acetic acid were inhibited dose-dependently	Nisar et al. (2007)
Antioxidant activity	<i>Z. jujube</i>	Fruit	The antioxidant effects of aqueous fruit extract of <i>Z. jujube</i> (200 mg/kg) was evaluated <i>in vitro</i> against ethanol-induced oxidative stress using male Wistar rats. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities	In vitro	Aqueous extract	200 mg/kg		GPx and SOD activities significantly increased in the animals ingested with extract prior to ethanol compared to the ethanol group. (P < 0.05).	Taati et al. (2011)
	<i>Z. spina Christ</i>	Fruit	The antioxidant activities of the leaves extract of this plant were determined by DPPH, FRAP, TRPA, ABTS and SSSA activity. All the analyzes was made with the use of UV-Visible spectrophotometer.	In vitro	Methanolic extracts	0-500 µg/ml	Ascorbic acid	Chemical antioxidant tests indicated the presence of compounds which might have oxygen reducing characteristics	Vandim et al., 2012
Anti-plasmodial Activity	<i>Z. mauritiana</i>	Root	Antiplasmodial Activity of the alkaloids from <i>Z. mauritiana</i> roots against the parasite <i>Plasmodium falciparum</i> as determined in procedure.	In vitro	Mauritine L. Mauritine M. Nummularine H Nummularine B Hemsine A			A exhibited potent antiplasmodial activity of The alkaloids from <i>Z. mauritiana</i> roots against the parasite <i>Plasmodium falciparum</i> with the inhibitory concentration (IC 50) ranging from 3.7 to 10.3 n M	Paneseta et al. (2011)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Leaf and Root	Resistant strain of <i>P. alciparum</i> (K1 strain), cultured in RPMI-1640 medium	In vitro	Methanolic, ethyl acetate, n-hexane, aqueous, n-	20 mg/ml	Chloroquine	The highest inhibitory activity was observed for chloroform fraction of	Ahmad et al. (2016)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Pharmacological Activity	Species	Part/s Used	Study design	Model	Extract/isolated compound/s	Dosage/duration	Positive controls	Effect/Observation	references
			supplemented with 4% human erythrocytes and 10% human serum, was selected and maintained in microaerophilic culture as determined in procedure.		butanol Chloroform,			leaves and roots i.e. 8.8 and 13.2 mg/ml.	
Anti-pyretic activity	<i>Z. spina christi</i>	Leaf	Hyperpyrexia was induced in mice by S.C. administration of 2 ml/100 g of 20% aqueous suspension of brewer's yeast. The appropriate treatment was given to the mice and changes in temperature was measured at 60,90 and 120 min thereafter.	In vivo	Ethanol Aqueous extracts	2 ml/100g		Ethanol and aqueous extracts exhibited a significant ($P < 0.05$), though moderate, antipyretic effect.	Mushah et al. (1988)
	<i>Z. oxyphylla</i>	Stem	Yeast-induced pyrexia model was used. Pyrexia was induced in Male rats, weighing 170–220 g, by a sub-cutaneous injection of 10 ml/kg of 15% water solution of yeast.	In vivo	Methanolic extract	50, 200 and 400 mg/kg	Aspirin	Doses of 200 and 400 mg/kg showed maximum deduction in elevated rectal temperature of rats as compare to 50 mg/kg dose indicates the potential effect of extract of <i>Z. oxyphylla</i> .	Kaleem et al. (2012)
Hepatoprotective activity	<i>Z. mauritiana</i>	Fruit and Leaf	Mice were randomly divided into five groups. On the 49th day, 2 h after the last administration, all mice except those in the control group were given simultaneously a CCl ₄ /peanut oil mixture (0.1:100, intraperitoneally, 0.1 ml/10 g, ig), while the control group received peanut oil alone. The serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) values were measured with commercially available diagnostic kits	In vivo	Aqueous extract	200, 400 mg/kg	silymarin	Aqueous extract resulted in a significant decreased levels of ALT, AST, ALP, and TB with levels of catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and superoxide dismutase showing a significant increase compared to group administered alcohol only. The EtOH-water extract significantly alleviated liver damage as indicated by the decreased levels of serum ALT and AST, the MDA content, increased the levels of SOD, GSH and GSH-Px, and reduced the pathological tissue injury induced by CCl ₄ .	Dubiru, et al. (2005), Dohiru and Obidoo (2007)
	<i>Z. fojuba</i>	Leaf			E TOH-water extract	8.0 g/kg	Silymarin	The extract showed marked sedative effect with decreased locomotion in dose-dependent manner. The chloroform fraction was the most dominant followed by ethyl acetate with ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) at 50 and 100 mg/kg.	Chen et al. (2010)
Sedative Properties	<i>Z. nummularia</i>	Root	The mice were adapted to red light (40 W) for 60 min prior to the start of experiment and fed ad libitum. Then administered with normal saline and extract or After 30 min of the treatment, each mouse was placed in the center of the box and the numbers of lines crossed were counted.	In vivo	Methanolic extract ethyl acetate and chloroform fraction	50 and 100 mg/kg	bromazepam	The extract showed marked sedative effect with decreased locomotion in dose-dependent manner. The chloroform fraction was the most dominant followed by ethyl acetate with ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) at 50 and 100 mg/kg.	Rauf et al. (2016)
Urease Inhibition activity	<i>Z. vulgaris</i>	Seed	Subsequent fractions and isolated cyclopeptide alkaloids were subjected to in-vitro urease inhibition.	In vitro	Saponin A Muciferine Chloroform, ethyl acetate, n-hexane, and butanol fractions Oxyphylline-A Nummularin-C Nummularin-R	3 mg/kg		Saponin A and muciferine showed strong sedative activity. n-hexane, ethyl acetate and butanol fractions showed good to excellent activity while chloroform fraction showed non-significant activity. Amongst isolated compounds Oxyphylline A was the most active of the three isolated cyclopeptide alkaloids followed by Nummularin R and Nummularin C.	Ihan et al. (1989) Kaleem et al. (2012)

2012; Singh et al., 2012; Kang et al., 2015; Tuenter et al., 2016; Tuenter et al., 2017; Warmhoff, 1970; Zhang et al., 2016 Alen et al., 2017; Sakna et al., 2019).

5.2. Flavonoids

Other essential chemicals have been identified in *Ziziphus* species are flavonoids. So far, 151 flavonoids and their derivatives including flavones, isoflavones, flavanones, flavonols, anthocyanins, catechins and chalcones, have been isolated from *Ziziphus* species (Supplementary data). The concentrations of these constituents vary across different plant parts, with the highest amount found in the seeds, leaves and stems. Flavonoids are regarded to be ingredients responsible for the therapeutic action of *Ziziphus* species such as their antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities, in addition to inhibition of platelet aggregation and mast cell histamine release (VanWauwe and Goossens, 1983; Jongbloed, 2003; Nawwar et al., 1984; Malik et al., 1997; Cheng et al., 2000; Pawlowska et al., 2009; San and Yildirim, 2010; Choi et al., 2011; Guo et al., 2011; Devkota et al., 2013; Plastina et al., 2012; Yi et al., 2014; Elsadig Karar et al., 2016; Wojdylo et al., 2016; Zhang et al., 2016; Bozicevic et al., 2017; Weizhen et al., 2017; EL-Hefny et al., 2018; Sakna et al., 2019).

5.3. Saponins

5.4. Saponins are triterpene or steroidal glycosides that are distributed throughout the plant kingdom, often associated with defence functions in the plants. These polyphenols are responsible for most of the reported biological effects of *Ziziphus*, such as hemolytic, antimicrobial, insecticide and molluscicide activities (Liu, J., Henkel, T., 2002). Approximately 31 saponins (Supplementary data) have been identified in fruit, seed and leaves parts of *Z. spina christi*, *Z. mauritiana* and *Z. jujuba* (Yoshikawa et al., 1991, 1992; Mahran et al., 1996; Zhang et al., 2016; Alen et al., 2017; Bozicevic et al., 2017; Sakna et al., 2019).

5.4. Terpenoids

Terpenoids are also diffusely distributed in plants of this genus. Until now, approximately 43 terpenoids (Supplementary data) have been reported and isolated from the fruits, seeds, leaves and flowers of *Z. spina christi*, *Z. mauritiana* and *Z. jujuba*. Several studies have reported that terpenoids from *Ziziphus* plants exhibited many biological activities such as cytotoxic, anticomplementary, antimicrobial, antiparasitic, antimycobacterial, anti-inflammatory and cyclooxygenase-2 inhibitory activities (Ruy et al., 2005; Ramos et al., 2010; Guo et al., 2011; Ji et al., 2012; Qiao et al., 2014; Yi et al., 2014; Guo et al., 2015; Sheng et al., 2015; Bai et al., 2016; Kang et al., 2016; Zhang et al., 2016; Sakna et al., 2019).

5.5. Other compounds

Analysis of previous reports revealed a range of other minor compounds that have been isolated from *Ziziphus* plants along with the compounds above-mentioned (Supplementary data). These include 7 cholinergic acid, including phloretin 3'/5'-di-c-galactoside, phloretin 3'-c-glucoside 5'-c-galactoside or phloretin 3'-c-galactoside 5'-c-glucoside, cis-5-o-p-coumaroylquinic acid, diosmetin 3'-o-galactoside 7-o-rutinoside, diosmetin 3'-o-glucoside 7-o-rutinoside, trans-5-o-caffeoylquinic acid and trans-5-o-p-coumaroylquinic acid, which have all been reported in the fruits of *Z. spina christi* (Elsadig Karar et al., 2016). Eight Benzenoids including, methyl/benzyl benzoates, benzyl alcohol, p-anisic acid (4-methoxy benzoic acid), p-anisaldehyde, p-anisyl alcohol, methyl anisate and vanillic acid (3-methoxy-4-hydroxy-benzoic acid) have been reported in *Z. mauritiana* flowers (Ruy et al., 2005). In addition, 14 other types of compounds, including two steroids, three cerebrosides, nine nucleosides/nucleobases and ten polysaccharides

have been isolated and identified from *Z. jujuba* fruit based on phytochemical investigations (Yi et al., 2014; Sheng et al., 2015; Elsadig Karar et al., 2016; Xie et al., 2016; Ji et al., 2017, 2019; Zheng et al., 2018; Mirzadeh et al., 2019).

6. Pharmacological activities

Previous research has revealed the extensive medicinal applications of the *Ziziphus* genus, their extracts and their chemical constituents, in a range of *in vitro* and *in vivo* test models. *Ziziphus* spp. Have been demonstrated to possess antibacterial, anticancer, antidiabetic, antidiarrheal, antifungal, anticholinesterase inhibitory, anti-inflammatory, antileishmanial, antinociceptive, antioxidant, antiparasitic, antipyretic, hepatoprotective, sedative and urease inhibition activities at different doses/concentrations. These are described in greater detail in the following subsections (Table 3, Fig. 1).

6.1. Antimicrobial activities

The antimicrobial activity of *Ziziphus* spp. Has been extensively described over many decades (Table 3). Usually, the antimicrobial activity of extracts are classified according to their minimum inhibitory concentration (MIC) values as good (MIC < 100 µg/mL), moderate (MIC from 100 to 500 µg/mL) or weak (MIC from 500 to 1000 µg/mL). Methanolic extracts obtained from the stems and leaves of *Z. oxyphula* have been found to be good inhibitors of bacterial growth of several pathogen strains, such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* (zone of inhibition 16–18 mm), whereas ethyl acetate, n-butanol and the aqueous fraction are considered inactive (Nisar et al., 2010, 2011). Nonetheless, aqueous and methanolic extract of the leaves of *Z. spina-christi* has shown good antibacterial activity (100 µg/mL) against *Bacillus aquimaris* and *Pseudomonas syringae*. At the same time, other bacterial strains were not affected at all (Elsadig Karar et al., 2016). Similarly, good activity was recorded for n-hexane extracts from *Z. spina-christi* fruits against *Ralstonia solanacearum*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus pumilus*. The MIC values ranged from 3.2 to 6.4 µg/mL in comparison to gentamicin standards (EL-Hefny et al., 2018). The stems of *Z. oxyphula* contain cyclopeptide alkaloids such as oxyphylline-A, oxyphylline-B, oxyphylline-C, nummularin-C and nummularin-R, have been shown no antimicrobial activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *S. flexeneri*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. typhi*. The MIC value of bakuchiol was found to be 5–50 µg/mL (Kaleem et al., 2012). Similarly, the alkaloids (mauritine-K and sativanine-K) obtained from the leaves of *Z. mauritiana* were inactive against *Botrytis cinerea*, with MIC values ranging from 200 to 1000 µg/mL (Singh et al., 2007). The available data present few conclusions due to conflicting results from different authors. However, the following key points have emerged: (1) all extracts of the plant show good antimicrobial activity against a broad spectrum of pathogens, including Gram-negative and -positive bacteria and fungi; (2) a poor efficiency was noted for extracts containing nonpolar solvents (e.g., alkanes); (3) there are conflicting results for aqueous extracts, which are the most frequently described mode of intake for traditional use; and (4) no antimicrobial activities of cyclopeptide alkaloids. It is worth mentioning that most of the studies regarding the antimicrobial activities of *Ziziphus* spp. are *in vitro* evaluations, which does not guarantee the same effects *in vivo*. In addition, the above studies only used conventional methods for sensitivity testing, such as the disk-diffusion agar method. However, other methods such as bioautography, flow cytometry and bioluminescence assays can be adapted to test the antimicrobial susceptibility of the extracts. Also, some studies did not consider an antibiotic as a positive control; thus, the reported inhibition zones or MICs cannot be compared to any standard drug. Even in those studies that included a positive control, the inhibitory activity of extracts against microbial growth does not reach the potency of gold-standard antimicrobials, so

the extract cannot be recommended as a replacement for conventional antimicrobial agents. In-depth experiments need to be conducted to determine the toxicity, mechanism of action of the extract against microbes, and whether the extract penetrates the microbial body and interacts with the transporters.

6.2. Anti-tumor activities

Intraperitoneal injections of gastric tumour cells (MKN-28) in athymic balb/c nude mice with aqueous extract of *Z. jujuba* combined with other herbs (0.2, 0.4 or 0.8 mL/mouse) for 28 consecutive days suppressed the cell proliferation of MKN-28 in a dose-dependent manner. This was also associated with a decrease in cellular proliferation by 30% with a concomitant increase in apoptosis by 97% in gastric tumour cells when compared to the control group (Shin et al., 2004). Further in-depth studies suggested that the underlying mechanism of this effect might be the induction of apoptosis. Plastina et al. (2012), reported that n-hexane, chloroform and methanolic extracts of *Z. jujuba* fruits efficiently suppressed the cell proliferation of human breast cancer cell lines (MCF-7 and SKBR3) stimulated by estradiol. The IC50 values of n-hexane, chloroform and methanolic extracts on MCF-7 cells were 14.42, 7.64 and 1.69 µg/mL, respectively. The IC50 values of the same extracts on SKBR3 cells were 14.06, 6.21 and 3.70 µg/mL, respectively. Dabaghian et al. (2018) tested the *in vitro* effect of aqueous extracts of *Z. jujuba* on human thyroid carcinoma cell lines (C643) in a concentration range of 500–2000 µg/ml; They showed that the extract exhibited a cytotoxic effect on C643 cells in a concentration-dependent manner (IC50 1671 µg/mL). The mechanism of action was the induction of apoptosis in the cells. The antitumour activity of ethanolic extract (100 µg/mL) of *Z. jujuba* fruits was evaluated on four human cancer cell lines: MCF-7, A549, HepG2, and HT-29. The extract exhibited a strong inhibitory effect on all four cancer cell lines, with the highest inhibitory rate reaching over 99%. In addition to the above extracts, recent studies also demonstrated that the treatment of human cancer cell lines with isolated compounds could result in the induction of cell impairment and apoptosis (Shin et al., 2018). It has been reported that compounds (Alphitolic Acid) isolated from the fruits of *Z. jujuba* exhibit significant cytotoxicity against A549, PC-3 and MDA-MB-231 cells *in vitro* (Shin et al., 2018). Further in-depth studies showed that the underlying mechanism of this effect might be associated with its ability to increase both mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and decrease the mitochondrial membrane potential (Shin et al., 2018). However, the precise mechanism by which this compound increases mitochondrial ROS production must be further elucidated to understand better the anticancer activities of isomers of p-coumaroyl alphitolic acid from *Z. jujuba*. Wang et al. (2018), isolated and purified two homogeneous acidic polysaccharides (HJP1 and HJP3) from *Z. mauritiana* and showed that HJP3 significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells but displayed significantly lower cytotoxicity to nontumorous cell lines. Polysaccharides isolated from the seeds of *Z. jujuba* showed significant *in vitro* cytotoxicity against HeLa cells, with IC50 values ranging from 87.1 to 164.6 µg/mL. The precise antitumour mechanisms of *Z. jujuba* polysaccharides might be related to the induction of apoptosis. Thus, these findings could provide a new perspective for chemical modification. However, only tumour cell lines were used to evaluate the cytotoxic effects of *Ziziphus* extracts in these studies. No clinical trials have been conducted in humans to examine the pharmacokinetics and therapeutic action of these compounds and plant extracts on cancer patients. Future research should focus on animal-based models and human-based clinical studies.

6.3. Anti-cholinesterase activities

Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) biosynthesis by dichloromethane ethyl acetate and ethanolic extracts (1.0–0.3 mg/ml) of

different parts of *Z. spina christi* was studied based on Ellman's method using thin layer chromatography (TLC) and microplate assays. Moderate activities (60%) against AChE enzyme activity were observed for dichloromethane (bark) and ethyl acetate (leaf and bark) extracts (Eldeen and Van Staden, 2007). Mazhar et al. (2015) investigated the AChE inhibitory activity of methanolic extract and its fractions (n-hexane, ethyl acetate, chloroform, n-butanol etc.) from the leaves, stems and roots of *Z. oxyphulla* via the spectrophotometric method, and found that the n-butanol fraction was a more effective enzyme inhibitor (low IC50 value of 9580 µg/ml) than the standard drug galanthamine (1326 µg/ml). However, more researches are needed to evaluate the AChE activity of the extracts and active compounds isolated from *Ziziphus* spp.

6.4. Antidiabetic activities

After five days of administration to alloxan-induced diabetic rats, the ethanolic leaf extract of *Z. jujuba* (100 mg/kg) significantly reduced body weight, lowered plasma glucose levels (from 35.62 to 26.21 mmol/L), improved glucose metabolism and regulated the functioning of insulin-sensitive enzymes (Sherdil et al., 2009). The administration of water extracts from *Z. vulgaris* (0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2 g/kg) to streptozocin-induced diabetic adult male rats for 14 days significantly decreased blood glucose, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides compared to the control group. Mishra et al., 2011, suggested that oral administration of *Z. mauritiana* aqueous ethanolic seed extract alone or in combination with glyburide (800 mg/kg seed extract and 10 mg/kg glyburide) to alloxan-induced diabetic mice for 28 days reduced the blood glucose level and mortality rate during a subacute study. In a report by Avizeh et al. (2010), 10 days of oral administration of 500 mg/kg hydroalcoholic extract of *Z. spina christi* fruit to diabetic rats resulted in a significant reduction in the blood glucose level, with a considerable concomitant increase in the serum insulin level ($p < 0.05$). The extract had a mild, but significant, blood-glucose-lowering effect; therefore, the long-term use of this agent may be advantageous over conventional drugs in alleviating some of the chronic diseases and complications caused by diabetes. The leaves extracts of *Z. nummularia* and *Z. mauritiana* are active towards alpha amylase enzyme (Dubey et al., 2017, 2019). Choudhary et al. (2011), reported the *in vitro* antidiabetic activity of nummularin-R, nummularin-C and hemsine-A (1 mM), isolated from the stem and root of *Z. oxyphulla* against α -glucosidase enzyme (IC50 values of 212, 251 and 394 mM, respectively). In addition, it has been demonstrated that the administration of Polysaccharides from *Z. spina christi* (ZSP) in a fructose-induced animal model of diabetes (streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats) significantly lowered the levels of LDL cholesterol, triglycerides, total cholesterol and very-low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol, and markedly improved the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels. ZSP also sharply increased the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and β -cell function (HOMA- β) and reduced the atherogenic index (AI) in mice exposed to high-fructose water (Zheng et al., 2018). These observations validate the use of *Ziziphus* in a traditional practice.

6.5. Anti-diarrheal activities

Hussain et al. (2017), provided clear evidence of the anti-diarrheal potential of the orally administered aqueous-methanolic extract of *Z. nummularia* leaves (50–300 mg/kg). For a methanolic extract of *Z. jujuba* leaves, a dose- and time-dependent decrease in gastrointestinal transit was observed (Hari et al., 2012). A dose of 200 mg/kg caused a highly significant reduction at the third hour ($p < 0.001$), comparable to that of paracetamol (positive control). However, the effect increases at a dose of 400 mg/kg, with significant results at the first, second and fourth hour. The methanolic extract of *Z. mauritiana* roots exhibited an anti-diarrheal effect, with a concentration-dependent inhibition of the

spontaneous pendular movement of the isolated rabbit jejunum, in addition to inhibition of acetylcholine-induced contraction of rat ileum. A dose-dependent decrease in gastrointestinal transit was observed with extracts (25 and 50 mg/kg), which also protected mice against castor oil-induced diarrhoea and castor oil-induced fluid accumulation, respectively (Dahiru et al., 2006).

6.6. Anti-inflammatory activities

The anti-inflammatory effects of alcoholic extracts of fruits, seeds and leaves of *Z. spina-christi* were investigated using male Sprague-Dawley rats as an anti-inflammatory model with diclofenac sodium as a positive control. The alcoholic extract of *Z. spina-christi* caused a highly significant anti-inflammatory activities ($p < 0.05$), indicating considerable anti-inflammatory activity (Musbah et al., 1988). The anti-inflammatory effects of a methanolic extract of *Z. oxyphylla* stems was evaluated on carrageenan-induced paw edema in rats. The extract significantly reduced inflammation, with an effect similar to the control (100 mg/kg indometacine) at 400 mg/kg (Ali et al., 2015). Kush-e-carpin-A is a new compound isolated from *Z. oxyphylla* which was evaluated for its anti-inflammatory activity at doses of 5, 10 and 20 mg/kg. All of the tested doses exhibited significant ($p < 0.05$) and highly significant ($p < 0.01$) results, showing potent anti-inflammatory activity (Nisar et al., 2011).

6.7. Antinociceptive activities

Aqueous extract of the leaves of *Z. spina-christi* demonstrated a dose-

dependent analgesic effect at various concentrations (250–1000 mg/kg), and reduced the number of writhes induced by a 0.6% aqueous solution of acetic acid in Wistar rats. At a dose of 250 mg/kg, the aqueous extract produced a similar effect to that of the positive control, pethidine hydrochloride (10 mg/kg), suppressing the number of writhes induced by acetic acid (Effraim et al., 2000). The aqueous extract of root bark of *Z. spina-christi* also showed good activity, with an LD50 of 2236.07 mg/kg in mice (Adzu et al., 2008). Nisar et al. (2007) tested the inhibitory effects of methanolic crude extract of *Z. oxyphylla* (50–200 mg/kg) on formalin-induced finching in an animal model. A significant analgesic effect was observed at a dose of 200 mg/kg. Similarly, oxyphylline-A, oxyphylline-B, oxyphylline-C, nummularin-C and nummularin-R have been isolated from the roots of *Z. oxyphylla* and tested for their antinociceptive activity. All the tested compounds revealed a dose-dependent reduction in formalin-induced finching behaviour; however, oxyphylline-B (45.32% and 55.10%) and nummularin-R (37.77% and 50.10%) were more effective in the attenuation of noxious stimuli at a dose of 2.5 mg/kg (Kaleem et al., 2012).

6.8. Antioxidant activities

The action of *Z. jujuba* extract (200 mg/kg) against ethanol-induced oxidative stress was evaluated in male Wistar rats. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities were significantly increased in the treated animals compared to untreated animals. Changes in antioxidant enzymes activities (GPx and SOD) were observed in male Wistar rats pretreated with *Z. jujuba* aqueous fruit extract (200 mg/kg) before ethanol-induced oxidative stress. Wich

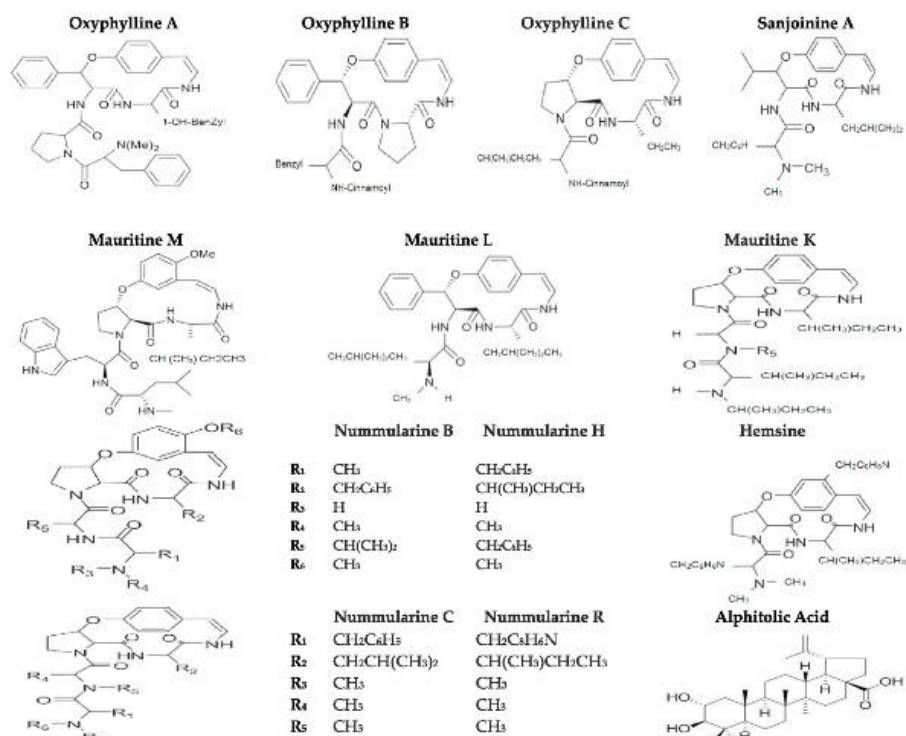


Fig. 1. The chemical structure of some activities compounds from the genus *Ziziphus*.

prevented the reduction of GPx activity and returned it to a normal level. Thus, there was a statistically significant difference between the ethanol-treated group and the group treated with *Ziziphus* extract plus ethanol. However, the SOD activity did not remarkably change following the pretreatment of rats with the *Ziziphus* extract (Taati et al., 2011). ZSP polysaccharides isolated from *Z. jujube* display a dose-dependent DPPH radical-scavenging effect of 79.2% and a hydroxyl radical-scavenging effect of 50.6% at the tested concentration of 200 µg/mL (Wang et al., 2018). Hammi et al. (2015) found that the polysaccharides from edible *Ziziphus lotus* fruit harvested in Tozeur, southern Tunisia, had a significant reducing capacity and moderate anti-lipid-peroxidation ability. The antioxidant action of *Ziziphus* species has been evaluated through various chemical assays like DPPH, ABTS⁺ SRSA, FRAP and TRPA, but these assays have no pharmacological relevance and limit the validation of its established biological action (Harnly, 2017). To uncover the dose and time-dependent effect of *Ziziphus* spp. extracts, scientists can adopt chromatographic techniques, apply *in vitro* biological assays exploiting cell lines and simulated digestion, and finally, test their actions *in vivo*.

6.9. Other pharmacological activities

Ahmad et al. (2016) were the first to report the anti-infective activity of *Z. oxyphylla* methanolic crude extract of leaves and roots and its fractions (n-hexane, ethyl acetate, chloroform and n-butanol) against *Leishmania infantum* in serial dilution using microtiter plate, showing that the roots chloroform fraction had maximum inhibitory activity (IC₅₀ 3240 µg/ml) compared to the standard drug miltefosine (IC₅₀ 10.41 mg/ml). Panseeta et al. (2011) isolated and studied the antiplasmodial activity of mauritine L, mauritine M, nummularine H, nummularine B and hemsine A from *Z. mauritiana* roots against the parasite *Plasmodium falciparum*. They showed that all alkaloids tested exhibited potent antiplasmodial activity, with the IC₅₀ values ranging from 370 to 1030 µg/mL. The crude extract of *Z. oxyphylla* leaves, roots, and its fractions (n-hexane, ethyl acetate, chloroform and n-butanol), were evaluated for their antiplasmodial activity against the resistant K-1 strain of *Plasmodium falciparum* using serial dilution method (Ahmad et al., 2016). The ethanolic extract of the leaves of *Z. spina christi* exhibited a significant, though the moderate, antipyretic effect on hyperpyrexia (Musbah et al., 1988). Similarly, a methanol extract of *Z. oxyphylla* stem significantly reduced hyperpyrexia at doses of 200 and 400 mg/kg compared to 50 mg/kg (Kaleem et al., 2012). Pretreatment of rats with aqueous extracts (200 and 400 mg/kg) of the leaves and fruits of *Z. mauritiana* or silymarin (100 mg/kg), as a positive control, may prevent chronic alcohol-induced liver injury, and also resulted in a significant decrease in serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TB) and hepatic lipid peroxidation (ALP), while reduced glutathione, total antioxidant status and body weight significantly increased compared to untreated rats (Chen et al., 2010). The same result was found when rats have treated with ethanol-water extract of *Z. jujuba* seed (Dahiru et al., 2005; Dahiru and Obidoa, 2007). Cyclopeptide alkaloids and methanolic extract fractions from *Z. oxyphylla* roots (n-hexane, ethyl acetate and butanol fractions) showed good to excellent *in vitro* urease inhibition activities. In contrast, the chloroform fraction did not show significant activity (Kaleem et al., 2012). Alkaloids isolated from *Z. vulgaris* seeds (Sanjoinine A and nuciferine) show vigorous activity, as measured by hexobarbital-induced sleeping time. Sanjoinine A and nuciferine both show strong sedative activity (Han et al., 1989). The sedative activity of sanjoinine-A at a dose of 3 mg/kg was potent enough to indicate that such cyclopeptide alkaloids are effective components of the seeds, and this was the first finding of sedative activity of cyclopeptide alkaloids (Han et al., 1989). In addition, oral administration of methanol, chloroform and ethyl acetate extracts of the root of *Z. nummularia* (50, 100 mg/kg) prolonged hexobarbital-induced sleeping time by over 67% for chloroform extract (Rauf et al., 2016).

7. Toxicological studies

Several research groups have evaluated the acute toxicity/safety of the extracts from different *Ziziphus* spp. Administration of aqueous-methanol leaf extract of *Z. nummularia* at oral doses of 3 and 5g/kg to mice for 24 h produced no behavioural changes or mortality. Hence, oral dose of 3 and 5 g/kg of the leaf extract from *Z. nummularia* is considered safe to use in mice (Hussain et al., 2017). Swiss mice were treated with aqueous root bark extract of *Z. spina christi* (25–100 ml/kg), and the LD₅₀ of the fraction was 871.78 mg/kg for intraperitoneal administration. This indicates that the experimental doses used (25, 50 and 100 mg/kg) were within the safe limit (Adzu et al., 2008). PC12 cells (derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal 267 medulla) were seeded into a 96-well plate and allowed to grow overnight. After exposure to different doses of flavonoids from *Z. jujuba* seeds (30, 60 and 120 µg/mL for 6 h), cell death was measured by MTT. Overall, FEs, showed no detectable toxicity on the viability of PC12 cells in the concentration range of 30–120 µg/mL (Yang et al., 2019). Further investigating of the potential long-term chronic toxicity and acute toxicity in several animal models is needed.

8. Conclusion

Ziziphus species have been traditionally and ethnobotanically used to treat many diseases such as diarrhoea, dysentery, cholera, diabetes, hypertension, inflammation, intestinal spasms, liver disease and malaria, among others. This review summarizes the ethnobotanical/traditional uses of *Ziziphus* species in while phytochemistry, toxicity studies and pharmacological actions of *Ziziphus* species. Various chemical constituents have been isolated and identified that belongs to different groups of compounds e.g. alkaloids, flavonoids, terpenoids, saponins and other compounds. Flavonoids and alkaloids are the main bioactive constituents. still plenty of research has focused on the ability of cyclopeptides alkaloids to treat various diseases such as cancer, diabetes and bacterial infection, indicating their potential use as medicinal drugs. Previous research has revealed the extensive medicinal applications of polar and nonpolar extracts from different botanical parts of *Ziziphus* spp. in a range of *in vitro* and *in vivo* test models. *Ziziphus* spp. extracts have been demonstrated to possess antimicrobial, anticancer, antidiabetic, anti-diarrhoeal, anticholinesterase, anti-inflammatory, antioxidant, antiplasmodial, antipyretic, hepatoprotective, sedative and urease inhibition activities at different doses/concentrations. The phytochemical and pharmacological results validate and support the ethnopharmacological use of *Ziziphus* spp. in traditional medicine. In addition, a few clinical studies support the safety of root bark, seed and leaf extracts of *Ziziphus* spp. when used at common therapeutic doses. According to the literature, the current knowledge of *Ziziphus* species contains several gaps which require further investigation. Firstly, cyclopeptides alkaloids are traditionally considered to be the major bioactive compounds in *Ziziphus* plants, as various types of alkaloids have been isolated and a wide spectrum of pharmacological studies have focused on these compounds. However, the investigation of other ingredients like new saponins and phenols isolated from *Ziziphus* plants has been mostly ignored, which severely limits the diversity of research and application of *Ziziphus* plants. Secondly, in some cases, the pharmacological activity of plant extracts is present only at doses that may be too high for clinical use. According to the Chinese Pharmacopoeia, administration of the approximately 6–12 g/day extract is not uncommon in humans, but clinical application at such doses should be accompanied by conservative safety protocols. In addition, some methods employed in animal studies, particularly some studies on the antidiabetic effects of *Ziziphus* spp., are poorly reported and have an inadequate study design due to the absence of a positive control group, which makes the results less reliable. Also, some studies of pharmacological activities, like those that assess the anti-inflammatory and antinociceptive properties, only used a simple animal model without

further investigation of the underlying mechanisms of action, such as the involved receptors or inter- and intracellular pathways. Finally, although *Ziziphus* is traditionally regarded as a safe herbal medicine, only a few clinical studies support the safety of *Ziziphus* in patients with underlying diseases, especially in the elderly, children and pregnant women. The potential liver and kidney toxicity of *Ziziphus* plants should not be ignored, as alkaloids are the principal constituent of this genus, and these alkaloids could potentially induce acute toxicity or cardiotoxicity. In conclusion, *Ziziphus* plants are a valuable medicinal resource with specific pharmacological activities in experimental studies; however, more comprehensive studies on their metabolism, pharmacokinetics, side effects and toxicity, particularly clinical trials, are required to demonstrate the efficacy and safety of plant extracts or plant-derived bioactive compounds from this genus.

Author contributions

E.E and Y.E analyzed the data and wrote the manuscript. K.M and B.N designed the main structure of the document. A.K.E and N.A.S.Q reviewed the chemical composition and biological activities reported by the literature surveyed.

Declaration of competing interest

The authors declare there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112950>.

References

- Abdel Galil, F.M., El Jissy, M.A., 1991. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus spina-christi*. *Phytochemistry* 30, 1348–1349.
- Adzu, B., Hartuna, A.B., Ilyas, M., Gamantel, K.S., 2008. CNS activity of ZS-1A: a phytochemical from *Ziziphus spina-christi* root bark. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2, 456–461.
- Ahmad, R.N., Naqvi, A.A., Cos, P., Maes, L., Apers, S., Hermans, N., Pieters, L., 2016. Anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activity of *Ziziphus oxyphylla* and *Cedrela serrata*. *Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 671–676.
- Alen, B., Maria, D.M., Angela, D.B., Frank, G., Matthias, H., 2017. Dammarane-type saponins from leaves of *Ziziphus spina-christi*. *Phytochemistry* 1–11.
- Ali, R., Shah, H.U., Ullah, I., Anwar, J., Numan, M., Khan, K., Awan, A., Sohail, S.R., 2015. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of stem extract of *Ziziphus oxyphylla* edgew. *World J. Zool.* 10, 107–111.
- Arndt, S.K., Clifford, S.C., Popp, M., 2001. *Ziziphus* - a multipurpose fruit tree for arid regions. In: Breckle (Ed.), *Sustainable Land Use in Deserts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Avizeh, R., Najafzadeh, H., Pourmahdi, M., Mirzaee, M., 2010. Effect of glibenclamide and fruit extract of *Ziziphus spina cristi* on alloxan induced diabetic dogs. *Intern J A Ppl Res Med* 8, 109–113.
- Azam-Ali, S.A., Bonkoungou, E., Bowe, C., deRock, C., Godara, A., Williams, J.T., 2006. Ber. International Centre for Underutilised Crops, Southampton, UK.
- Bai, L., Zhang, H., Liu, Q., Zhao, Y., Cui, X., Guo, S., Bai, N., 2016. Chemical characterization of the main bioactive constituents from fruits of *Ziziphus jujube*. *Food and Function* 7, 2870–2877.
- Barboni, L., Gariboldi, P., Terregiani, E., Verotta, L., 1994. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus mucronata*. *Phytochemistry* 35, 1579–1582.
- Bellakhdar, J., 1997. *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Ibis Press, Paris, France.
- Bhandari, M.M., Bhansali, A.K., 2000. *Rhamnaceae*. In: Singh (Ed.), *Flora of India Botanical Survey of India, Calcutta*, pp. 1–577.
- Bhansali, A.K., 1975. *Monographic Study of the Family Rhamnaceae of India*. Ph.D. thesis, University of Jodhpur, India.
- Bozicevic, A., Mieri, M.D., Benedetto, A.D., Gafner, F., Hamburger, M., 2017. Dammarane-type saponins from leaves of *Ziziphus spina-christi*. *Phytochemistry* 138, 134–144.
- Castels, B.K., Eichhardt, G., Kausman, E.U., Tschesche, R., 1974. Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus oenophya*. *Tetrahedron* 30, 2461–2466.
- Chen, C.F., Lee, J.F., Wang, D., Shen, C.Y., Shen, K.L., Lin, M.H., 2010. Water extract of *Ziziphus jujube* attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats (PPI06). *Transplant. Proc.* 42, 741–743.
- Cheng, G., Bai, Y., Zhao, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, G., et al., 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosa*. *Tetrahedron* 56, 8915–8920.
- Choi, S.H., Ahn, J.B., Kozukue, N., Levin, C.E., Friedman, M., 2011. Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of *Jujube* (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6594–6604.
- Choudhary, M.I., Adhikari, A., Rasheed, S., Marasini, B.P., Hussain, N., Kaleem, W.A., 2011. Atta-ur-Rahman. Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus oxyphylla* Edgew as novel inhibitors of a glucosidase enzyme and protein glycation. *Phytochem. Lett.* 4, 404–406.
- Croueour, G.L.P., 2002. The penier, B. Richard, C. Petermann, K. Ghe dira, and M. Ze chestlanrot. *Fitoterapia* 73, 63.
- Dabaghian, F., Hassani, A., Nayeri, N., Shojaii, A., Entezari, M., 2018. Anti-proliferative and apoptotic effects of aqueous extract of *Ziziphus jujube* in human thyroid carcinoma cell lines(C643). *IntJ Cancer Manag* 11, 65820.
- Dafni, A., Levy, S., Lev, E., 2005. The ethnobotany of Christ's Thorn jujube (*Ziziphus spina-christi*) in Israel. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1, 8.
- Dahiru, D., Obidoa, O., 2007. Pretreatment of albino rats with aqueous leaf extract of *Ziziphus mauritiana* protects against alcohol induced liver damage. *Trop. J. Pharmaceut. Res.* 6, 705–710.
- Dahiru, D., Sini, J.M., John-Africa, L., 2006. Antidiarrhoeal activity of *Z. mauritiana* root extract in rodents. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 941–945.
- Dahiru, D., William, E.T., Nadro, M.S., 2005. Protective effect of *Ziziphus mauritiana* leaf extract on carbon tetrachloride-induced liver injury. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 1177–1179.
- Devi, S., Pandey, Y.B., Singh, J.P., Shah, A.H., 1995. Peptide alkaloids from *Ziziphus* species. *Phytochemistry* 26, 3374.
- Devkota, H.P., Watanabe, T., Yahara, S., 2013. Flavonoids and saponins from *Ziziphus mucronata*. *Nat. Prod. Res.* 27, 697–701.
- Dubey, K., Dubey, R., Gupta, R.A., Gupta, A.K., 2019. Anti-diabetic and antioxidant potential of saponin extract of leaves of *Ziziphus mauritiana*. *J. Drug Deliv. Therapeut.* 9 (2-A), 75–77.
- Dubey, K., Dubey, R., Gupta, R., Gupta, A., 2017. Anti-diabetic potential of aqueous, methanolic and saponin extract of leaves of *Ziziphus nummularia* Linn. *J. Drug Deliv. Therapeut.* 7 (7), 173–174.
- Dwivedi, S.P.D., Pandey, Y.B., Shah, A.H., Eckhardt, G., 1987. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus nummularia*. *J. Nat. Prod.* 50, 235.
- Effraim, I.D., Salami, H.A., Osewa, T.S., 2000. The effect of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* on haematological and biochemical parameters in rabbits. *Afr. J. Biomed. Res.* 3, 175–179.
- El Ghazali, G.E.B., El Tohami, M.S., El Egami, A.A.B., 1994. *Medicinal Plants of the Sudan: Medicinal Plants of the White Nile Provinces*. Khartoum University Press, Khartoum.
- El Ghazali, G.E.B., El Tohami, M.S., El Egami, A.A.B., Abdalla, W.S., Mohammed, M.G., 1997. *Medicinal Plants of the Sudan: Medicinal Plants of Northern Kordofan*. Omdurman Islamic University Printing and Publishing House, Omdurman.
- Eledeen, I.M.S., Van Staden, J., 2007. In vitro pharmacological investigation of extracts from some trees used in Sudanese traditional medicine. *South Afr J. Bot.* 73, 435–440.
- El-Hefiyya, M., Abeer, A., Mohamed, Z.M., Marmoun, S.M., Abd El-Kareem, M., 2018. Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial activity against some potato bacterial pathogens of fruit extracts from *Phytolacca dioica* and *Ziziphus spina-christi* grown in Egypt. *Sci. Hort.* 233, 225–232.
- Elsaid Karar, M.G., Quiet, L., Rezk, A., Jaiswal, R., Rehders, M., et al., 2016. Phenolic profile and in vitro assessment of cytotoxicity and antibacterial activity of *Ziziphus spina-christi* leaf extracts. *Med. Chem.* 6, 143–156.
- Everinoff, V.A., 1964. Notes sur le jujubier (*Ziziphus jujuba* Gaertner). *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliqué* 11, 177–187.
- Ghedira, K., Chemli, R., Caron, C., Nuzillard, J.-M., Zeches, M., 1995. Four cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus lotus*. *Phytochem* 38, 767–772.
- Goumelis, D.C., Laskaris, G.G., Verpoorte, R., 1998. Cyclopeptide Alkaloids. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 75. Springer-Verlag Wein, New York, pp. 1–179.
- Guo, S., Duan, J.A., Tang, Y., Qian, Y., Zhao, J., Qian, D., 2011. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins, and flavonoids in the leaves of *Ziziphus* species by HPLC-PDA MS/ELSD. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 56, 264–270.
- Guo, S., Duan, J.A., Zhang, Y., Qian, D., Tang, Y., Zhu, Z., Wang, H., 2015. Contents changes of triterpenic acids, nucleosides, nucleobases, and saccharides in jujube (*Ziziphus jujuba*) fruit during the drying and steaming process. *Molecules* 20, 22329–22340.
- Hamed, S.H., Shams-Ardakani, M.R., Sadeghpour, O., Amin, Gh, Hajighasemali, D., Orafi, H., 2016. Designing mucoadhesive discs containing stem bark extract of *Ziziphus jujuba* based on Iranian traditional documents. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19, 330–336.
- Hammi, K., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., Ksouri, R., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Ziziphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.047>.
- Han, B.H., Park, M.H., Han, Y.N., 1990. Cyclic peptide and peptide alkaloids from seeds of *Ziziphus vulgaris*. *Phytochem* 29, 3315–3319.
- Han, B.H., Park, M.H., Park, J.H., 1989. Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants. *Pure Appl. Chem.* 61, 443.
- Han, B.H., Park, M.H., 1987. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Ziziphus vulgaris* var. *spinosa*. *Arch Pharm Res* 10, 203–207.
- Han, J., Ji, C.J., He, W.J., et al., 2011. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus apetala*. *J. Nat. Prod.* 74, 2571–2575.
- Hari, G., Jagannadha, R., Lakshmi, P., 2012. Anti diarrhoeal activity of *Ziziphus jujuba* leaf extract in rats. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 1, 0975–6299.

- Harnly, J., 2017. Antioxidant methods. *J. Food Compos. Anal.* 64, 145–146.
- Hemmati, M., Asghari, S., Zoboori, E., Karamian, M., 2015. Hypoglycemic effects of three Iranian edible plants: jujube, barberry and saffron: correlation with serum adiponectin level. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28, 2095–2099.
- Hussain, S.M., Khan, A., Khan, A., Qazi, N.G., Ali, F., 2017. Pharmacological basis for medicinal use of *Ziziphus nummularia* (Rhamnaceae) leaves in gastrointestinal disorders. *Trop. J. Pharmacol. Res.* 16, 2379.
- Jagtap, S.D., Deokule, S.S., Bhosle, S.V., 2006. Some unique ethnomedicinal uses of plants used by the Korku tribe of Amravati district of Maharashtra, India. *J. Ethnopharmacol.* 107, 463–469.
- Jain, A., Katewa, S.S., Choudhary, B.L., Galav, P., 2004. Folk herbal medicines used in birth control and sexual diseases by tribals of southern Rajasthan. *J. Ethnopharmacol.* 90, 171–174.
- Ji, C.J., Zeng, G.Z., Han, J., He, W.J., Zhang, Y.M., Tan, N.H., 2012. Zizimauritic acids—C, three novel nortriterpenes from *Ziziphus mauritiana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6377–6380.
- Ji, X., Peng, Q., Yuan, Y., Shen, J., Xie, X., Wang, M., 2017. Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube fruit (*Ziziphus Jujuba* Mill.); a review. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.074>.
- Ji, X., Yan, Y., Hou, C., Shi, M., Liu, Y., 2019. Structural characterization of a galacturonic acid rich polysaccharide from *Ziziphus Jujuba* cv. Muzao. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.244>.
- Johston, M.C., 1963. The species of *Ziziphus* indigenous to the United States and Mexico. *Am. J. Bot.* 50, 1020–1027.
- Johnston, M.C., 1972. Rhamnaceae. In: Milne-Redhead, E., Polhill, R.M., Agents, Crown (Eds.), *Flora of Tropical East Africa*. (London).
- Jongbloed, M., 2003. The Comprehensive Guide to the Wild Flowers of the United Arab Emirates. Environmental research and wildlife development agency (ERWDA), Abu Dhabi.
- Jossang, A., Zahir, A., Diakite, D., 1996. Mauritine J, a cyclopeptide alkaloid from *Ziziphus mauritiana*. *Phytochemistry* 42, 565–567.
- Kaleem, W.A., Nisar, M., Qayum, M., Zia-Ul-Haq, A., Adhikari, V.D., 2012. New 14-membered cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus oxyphylla* edgew. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11520–11529.
- Kang, K.B., Kim, J.W., Oh, W.K., Kim, J., et al., 2015. Juhannes F-J, cyclopeptide alkaloids from the roots of *Ziziphus jujuba*. *Phytochemistry* 119, 90–95.
- Kang, K.B., Kim, J.W., Oh, W.K., Kim, J., Sung, S.H., 2016. Cytotoxic ceanothane- and lupane-type triterpenoids from the roots of *Ziziphus jujuba*. *J. Nat. Prod.* 79, 2364–2375.
- Karuppusamy, S., 2007. Medicinal plants used by Paliyan tribes of Sirumalai hills of southern India. *Nat. Product. Radiance* 6, 436–442.
- Kumari, P., Joshi, G.C., Tewari, L.M., 2011. Diversity and status of ethnomedicinal plants of Almorav district in Uttarakhand, India. *Int. J. Biodivers. Conserv.* 3, 298–326.
- Lin, H.Y., Chen, C.H., You, B.J., Liu, K.C.S., Lee, S.S., 2000. Cyclopeptide alkaloids from *Paliurus ramosissimus*. *J. Nat. Prod.* 63, 1338–1343.
- Liu, J., Henkel, T., 2002. Traditional Chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr. Med. Chem.* 9, 1483–1485.
- Liu, M.J., Cheng, C.Y., 1995. A taxonomic study of the genus *Ziziphus*. *Acta Hort.* 390, 161–165.
- Liu, M.J., Qi, Y.F., 2004. Embryo rescue of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Acta Hort.* 663, 479–482.
- Mahajan, R.T., Chopda, M.Z., 2009. Phyto-pharmacology of *Ziziphus jujuba* Mill. A plant review. *Phcog. Rev.* 3, 320–329.
- Mahesh, B., Satish, S., 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World J. Agric. Sci.* 4, 839–843.
- Mahran, G.E.-D.H., Glombitza, K.-W., Mirhom, Y.W., Hartmann, R., Michel, C.G., 1996. Novel saponins from *Ziziphus spina-christi* growing in Egypt. *Planta Med.* 62, 163–165.
- Malik, A., Kuliev, Z.A., Akhmedov, Yu A., Vdovin, A.D., Abdullaev, N.D., 1997. Proanthocyanidins of *Ziziphus jujuba*. *Chem. Nat. Compd.* 33, 2.
- Manoj, B., Pandey, S.S., Meenaksh, M., Vidya, B., Tryambak, D., 2012. Two new 14-membered cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus xylopyra*. *Nat. Prod. Res.* Formerly *Natural Product Letters* 26, 836–841.
- Marchand, J., Monseur, X., Pais, M., 1986. Alcaloides peptidiques – les myrianthines A, B et C, alcaloides du *Myrianthus arboreus* P. Beauv. (urticaceae). *Ann. Pharm. Fr.* 26, 771–778.
- Mazhar, F., Khanum, R., Ajaib, M., Jahangir, M., 2015. Potent AChE enzyme inhibition activity of *Ziziphus oxyphylla*: a new source of antioxidant compounds. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28, 2053–2059.
- Mirzadeh, M., Arianejad, M.R., Khedmat, L., 2019. Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: a review. *Carbohydr. Polym.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115421>.
- Mishra, T., Khullar, M., Bhatia, A., 2011. Anticancer Potential of Aqueous Ethanol Seed Extract of *Ziziphus Mauritiana* against Cancer Cell Lines and Ehrlich Ascites Carcinoma. *Evid. base Compl. Alternative Med.*
- Morel, A.F., Machado, E.C.S., Moreira, J.J., Menezes, A.S., Mos-tardeiro, M.A., Zanatta, N., Wessjohann, L.A., 1998. Cyclopeptide alkaloids of *Scutia buxifolia* phytochemistry. *Phytochemistry* 47, 125–129.
- Morton, J.F., 1987. Indian jujube. *Fruits of Warm Climates*. Florida Fair Books, Miami.
- Musbah, O.M., Tanira, A.M., Aqeel, M., Tariq, A., Mohsin, Shah, A.H., 1988. Evaluation of some pharmacological, microbiological and physical properties of *Ziziphus spina-christi*. *Int. J. Crude Drug Res.* 26, 56–60.
- Naidu, K.A., Khasim, S.M., 2010. Contribution to the floristic diversity and ethnobotany of Eastern Ghats in Andhra Pradesh India. *Ethnobot. Leaflets* 14, 920–941.
- Nawwar, M.A.M., Ishak, M.S., Michael, H.N., Buddrus, J., 1984. Leaf flavonoids of *Ziziphus spina-christi*. *Phytochemistry* 23, 2110–2111.
- Neuwinger, H., 1996. African Ethnobotany Poisons and Drugs Chemistry (Germany) Chapman and Hall Gm bH D-69469 Weinheim (Bundes Republik Deutschland).
- Nisar, M.B., Adzu, K., Inamullah, A., Bashir, A., Ihsan, A.H., 2007. Antinociceptive and antipyretic activities of the *Ziziphus oxyphylla* edgew leaves. *Phytother. Res.* 21, 693–695.
- Nisar, M., Kaleem, W.A., Qayum, M., Hussain, A., Zia-ul-Haq, M., Ali, M.L., 2010. Choudhary, biological screening of *Ziziphus oxyphylla* edgew leaves. *Pakistan J. Bot.* 42, 4063–4069.
- Nisar, M., Kaleem, W.A., Qayum, M., Marwat, I.K., Zia-ul-Haq, M., Ali, I., Choudhary, M.I., 2011. Biological screening of *Ziziphus oxyphylla* Edgew stem. *Pakistan J. Bot.* 43, 311–317.
- Oudhia, P., 2001–2003. Research Note on Medicinal Herb of Chhattisgarh, India Having Less Known Traditional Uses, IX. Boir (*Ziziphus Nummularia*, Family: Rhamnaceae). Pais, M., Mainil, Y., Goutarel, R., 1963. Les Adouettes X Y et Z, Alcaloïdes du *Waltheria americana* L. (Sterculiaceae). *Ann. Pharm. Fr.* 21, 139.
- Plastina, P., Bonfigliole, D., Vizza, D., Fazio, A., Rovito, D., Giordano, C., Barone, I., Catalano, S., Gabriele, B., 2012. Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujuba* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* 140, 325–332.
- Pandey, M.B., Singh, A.K., Singh, V.P., et al., 2008. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus sativa* bark. *Nat. Prod. Res.* 22, 219–221.
- Pandey, Y.B., Devi, S., Singh, J.P., Shah, A.H., 1986. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus xylopyra*. *J. Nat. Prod.* 49, 939.
- Pandey, Y.B., Devi, S., Singh, J.P., Shah, A.H., Eckhardt, G., 1984. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus nummularia*. *Phytochemistry* 23, 2118.
- Panstecca, P., Lomchoey, K., Prabpai, S., Kongsaree, P., Sukamrarn, A., Ruchirawat, S., Sukamrarn, S., 2011. Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of *Ziziphus mauritiana*. *Phytochemistry* 72, 909–915.
- Parveek, S., 2013. Nutritional composition of jujube fruit. *J. Food. Agric.* 25, 463–470.
- Pawłowska, A.M., Camangi, F., Bader, A., Braca, A., 2009. Flavonoids of *Ziziphus jujuba* L. and *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. (Rhamnaceae) fruits. *Food Chem.* 112, 854–862.
- Qasir, M., Nazimuddin, S., 1981. Flora of Pakistan. university of Karachi, Karachi, pp. 140.
- Qiao, A., Wang, Y., Xiang, L., Zhang, Z., He, X., 2014. Triterpenoids of sour jujube show pronounced inhibitory effect on human tumor cells and antioxidant activity. *Fitoterapia* 98, 137–142.
- Rahman, M.A., Khan, M., Arfan, G., Akhtar, L., Khan, Ahmad, V.U., 2007. A new 14-membered cyclopeptide alkaloid from *Ziziphus oxyphylla*. *Nat. Prod. Res.* 21, 243.
- Rajendar, K., Raju, D., Tirupathi, M., Reddy, J.K., 2010. Phytotherapeutic methods used by traditional healers of Eturnagaram Mandal, Warangal, Andhra Pradesh, India. *Ethnobot. Leaflets* 14, 361–365.
- Ramos, L.C., dos Santos, R.R.N., Júnior, I.L., Antunes, O.A.C., Forzel, A., Wessjohann, L., Kuster, R.M., 2010. Ceanothane and lupane type triterpenes from *Ziziphus joazeiro* – an anti-staphylococcal evaluation. *Planta Med.* 76, 47–52.
- Rao, B.R., Sunitha, S., 2011. Medicinal plant resources of Rudrakod sacred grove in Nallamalais, Andhra Pradesh, India. *J. Biodivers.* 2, 75–89.
- Rauf, A., Jawad, A., Haroon, H., Mohammad, S., Seema, P., 2016. Emerging CAM *Ziziphus nummularia* with in vivo sedative hypnotic, antipyretic and analgesic attributes 3 *Biotech.* 6, 11.
- Reddy, C.S., Reddy, K.N., Murthy, E.N., Raju, V.S., 2009. Traditional medicinal plants in *Seshachalam hills, Andhra Pradesh, India*. *J. Med. Plants Res.* 3, 408–412.
- Ruy, J.V., Angelo, C., Alexandre, V.M., Claudia, M., 2005. *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) and the chemical composition of its floral fecal odor. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 654–656.
- Saied, M.S., Gebauer, J., Hamme, K., 2008. *Andreas Buerkert, Ziziphus spina-christi* (L.) Willd.: a multipurpose fruit tree. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55, 929–937.
- Sakna, S.T., Mocan, A., Sultani, H.N., El-fiky, N.M., Wessjohann, L.A., Farag, M.A., 2019. Metabolites profiling of *Ziziphus* leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their biological activities. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.097>.
- Sameh, S., Alshaimaa, M.H., Abdel-Nasser, E., Ali, A., 2018. Novel betulin derivative is responsible for the anticancer folk use of *Ziziphus spina-christi* from the hot environmental habitat of UAE. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.040>.
- San, B., Yildirim, A.N., 2010. Phenolics, alpha-tocopherol, beta-carotene, and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections. *J. Food Compos. Anal.* 23, 706–710.
- Shah, A.H., Aqeel, A.M., Tariq, M., Mossa, J.S., Al-Yahya, M.A., 1986. Chemical constituents of the stem bark of *Ziziphus spina-christi*. *Fitoterapia*. LVII 452–454.
- Shah, A.H., Pandey, V.B., 1985. Pandey: progress in the chemistry of cyclopeptide alkaloids containing a styrylamine unit. *J. Chem. Soc. Pakistan* 7, 363.
- Shah, A.H., Qureshi, S., Tariq, M., Aqeel, A.M., 1989. Toxicity studies on six plants used in traditional arab system of medicine. *Phytother. Res.* 3, 25–29.
- Shah, H., Pandey, V.B., Eckhardt, G., Mianna, G.A., 1988. A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Ziziphus sativa*. *Gaertn. Heterocycles* 27 2777–42.
- Sheng, G., Jin-Ao, D., Ying, Z., Dawei, Q., Yuping, Y., Zhenhua, Z., Hanqing, W., 2015. Contents Changes of Triterpenic Acids, Nucleosides, Nucleobases, and Saccharides in Jujube (*Ziziphus Jujuba*) Fruit during the Drying and Steaming Process. *Molecules*.
- Sherdil, Z., Madni, H., Mirbadalzadeh, R., 2009. Investigation into the hypoglycemic effect of hydroalcoholic extract of *Ziziphus Jujuba* Leaves on blood glucose and lipids in Alloxan induced diabetes in rats. *Iran. J. Diabetes & Lipid Disord.* 13–19.
- Shin, M., Leeb, B.M., Kima, O., Tranh, H., Leea, S., Hwangboe, C., Minb, B., Leea, J.H., 2018. Triterpenoids from *Ziziphus jujuba* induce apoptotic cell death in human cancer cells through mitochondrial reactive oxygen species production. *Food & Function*. <https://doi.org/10.1039/C8FO00526E>.

- Shin, V.Y., Sol, W.H., Liu, E.S., Wu, Y.J., Pang, S.F., Choi, C.H., 2004. Anti-tumorigenic and Pro-apoptotic effects of CRBM on gastric cancer growth in nude mice. *Int. J. Med. Sci.* 1, 137–145.
- Singh, A.K., Pandey, M.B., Singh, V.P., et al., 2007. Mauritine-K, a new antifungal cyclopeptide alkaloid from *Zizyphus mauritiana*. *Nat. Prod. Res.* 21, 781–784.
- Singh, S., Ahlawat, V.P., 1995. Physico-chemical attributes and mineral composition of ber leaves as affected by foliar application of urea and zinc sulphate. *Haryana J. Hort. Sci.* 24, 94–97.
- Singh, S., Pandey, M.B., Singh, J.P., et al., 2006. Peptide alkaloids from *Zizyphus sativa* bark. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 8, 733–737.
- Singh, S., Yadav, A., Singh, P., 2012. Chemical constituents of *Zizyphus joazeiro*. *Int. J. Green Herb. Chem.* 1, 18–20.
- Sobhani, Z., Nikoofal-Sahlabadi, S., Amiri, M.S., Ramezani, M., Enami, S.A., Sahebkar, A., 2019. Therapeutic Effects of *Zizyphus Jujuba* Mill. Fruit in Traditional and Modern Medicine: a Review. *Medicinal Chemistry (Sharjah) (United Arab Emirates)*.
- Suksamran, N., Suwannapoch, N., Aunchai, N., Kuno, M., Ratananukul, P., Haritakun, R., Jamsakul, C., Ruchirawat, S., 2005. Iziphine N, O, P and Q, new antiplasmodial cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus oenoplia*. *Tetrahedron* 61, 1175.
- Taati, M., Alirezai, M., Meshkatalasadat, M., Rasouljan, H., Kheradmand, B., Neamati, A., 2011. Antioxidant effects of aqueous fruit extract of *Zizyphus jujuba* on ethanol-induced oxidative stress in the rat testes. *Iran. J. Vet. Res.* 12, 134 Shiraz University.
- Tetali, P., Wagchchaurea, C., Dasswami, P.G., Antiah, N.H., Bird, T.J., 2009. Ethnobotanical survey of anti-diarrhoeal plants of Pariche valley, Pune district, Maharashtra, India. *J. Ethnopharmacol.* 123, 229–236.
- The Plant List, 2013. Version 1.1. Published on the internet. <http://www.theplantlist.org/>, Accessed date: 10 October 2019.
- Tree Society of Zimbabwe, 2001. Newsletter NO.25.
- Tripathi, M., Pandey, M.B., Jha, R.N., Pandey, V.B., Tripathi, P.N., Singh, J.P., 2001. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus jujuba*. *Fitoterapia* 72, 507–510.
- Tripathi, Y., Maurya, S.K., Singh, V.P., Pandey, Y.B., 1989. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus rugosa* bark. *Phytochemistry* 28, 1563.
- Tschesche, R., Ammermann, E., 1974. Scutianin-C, -D und -E, drei weitere Cyclopeptidalkaloide aus *Scutia buxifolia* Reiss. *Chem. Ber.* 107, 2274.
- Tschesche, R., Kaussmann, E.U., Fehhaber, H.W., 1972. Fehhaber: alkaloide aus Rhamnaceen, XIII. Amphibin-B, -C, -D und -E, vier Peptidalkaloide aus *Zizyphus amphibia* A. Cheval. *Chem. Ber.* 105, 3094.
- Tuenter, E., Ahmad, R., Foubert, K., Amin, A., Orlanoudaki, M., Cos, P., Maes, L., Apers, S., Pieters, L., Exarchou, V., 2016. Isolation and structure elucidation by LC-DADMS and LC-DAD-SPE-NMR of cyclopeptide alkaloids from roots of *Zizyphus oxyphylla*, and evaluation of antiplasmodial activity. *J. Nat. Prod.* 79, 2865–2872.
- Tuenter, E., Foubert, K., Staerk, D., Apers, S., Pieters, L., 2017. Isolation and Structure Elucidation of Cyclopeptide Alkaloids from *Zizyphus Nummularia* and *Zizyphus Spina-christi* by HPLC-DAD-MS and HPLC-PDA-(HRMS)-SPE-NMR. *Phytochemistry*, vol. 1. Upadhyay, B., Singh, K.P., Kumar, A., 2011. Ethno-veterinary uses and informant's consensus factor of medicinal plants of Sariska region, Rajasthan, India. *J. Ethnopharmacol.* 133, 14–25.
- Van Wauwe, J., Goossens, J., 1983. Effects of antioxidants on cyclooxygenase and lipoxygenase activities in intact human platelets: comparison with indomethacin and ETYA. *Prostaglandins* 26, 725–730.
- Vandita, S., Guizani, N., Musthafa, M.E., Rahman, M.S., Subash, S., 2012. In vitro antioxidant activities of *Zizyphus spina-christi* fruits (red date) grown in Oman. *Biotec* 11, 209–216.
- Verma, S., 2016. A review on *Zizyphus nummularia*: valuable medicinal plant of desert. *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5 (3), 539–542.
- Verma, R.K., Pandey, M., Indoria, M.D., Singh, R., Suthar, S., 2018. Phytochemical investigation and pharmacological evaluation of leaves of *Zizyphus mauritiana* for wound healing activity in albino rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical and Life Sciences* 5 08-18.
- Wang, Z.X., Qi, F.H., Cui, Y.G., Zhao, L., Sun, X.G., Tang, W., Cai, F.P., 2018. An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics. *Biosci Trends* 12, 220–239.
- Warnhoff, E.W., 1970. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 28. Springer Verlag, New York, pp. 162.
- Weizhen, H., Yongjie, W., Xiaoyan, J., Yueyue, S., Zhongxi, Z., Siying, L., 2017. Protective effect of flavonoids from *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao against acetaminophen-induced liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation in mice. *Molecules* 22, 1781.
- Wojdylo, A., Figiel, A., Legua, P., Lech, K., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F., 2016. Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of dried jujube fruits as affected by cultivar and drying method. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.099>.
- Xie, J.H., Tang, W., Jin, M.L., Li, J.E., Xie, M.Y., 2016. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill., *Plantago* spp., and *Morus* spp.: structures and functionalities. *Food Hydrocolloids.* <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.030>.
- Yang, T., Fang, L., Lin, T., Li, J., Zhang, Y., Zhou, A., Xie, J., 2019. Ultrasonicated sour jujube seed flavonoids extract exerts ameliorative antioxidant capacity and reduces Aβ-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.11.1886>.
- Yi, W., Ming, C., Mao-Bo, D., Chun-Hua, Y., You-Ying, L., Mei, Z., Chang, L., De-Yun, W., Jia-Guo, L., Yuan-Liang, H., 2014. Chemical constituents from the fruit of *Zizyphus jujuba* Mill var. *spinosa*. *Biochem. Systemat. Ecol.* 57, 6–10.
- Yoshikawa, K., Shimono, N., Arihara, S., 1991. Antisweet substances, jujubasaponins I-III from *Zizyphus jujuba* revised structure of ziziphin. *Tetrahedron Lett.* 32, 7059–7062.
- Yoshikawa, K., Shimono, N., Arihara, S., 1992. Antisweet natural products. VI. Jujubasaponins IV, V and VI from *Zizyphus jujuba*. *Mill. Chem. Pharm. Bull.* 40, 2275–2278.
- Zhang, F., Min, L., Li-rui, Q., Zhi-bong, Y., Chang, L., Xiu-yu, S., Yu, Y., Kate, Y., Xin-sheng, Y., Yi, D., 2016. Rapid characterization of *Zizyphus spinosa* Semen by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Zizyphus* species F.-x. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 122, 59–80.
- Zheng, Y., Bai, L., Zhou, Y., Tong, R., Zeng, M., Shi, J., Lab, X., 2018. Polysaccharides from Chinese herbal medicine for antidiabetes recent advances. *Biomac.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.072>.

Matériels et méthodes

I. Composition phytochimique et activités antioxydantes de *Z. Spina Christi* et *Z. Lotus*

1. Matériel végétal

1.1. Récolte et séchage

Les fruits mûrs de *Z. Spina Christi* et *Z. Lotus* ont été récoltés sur le terrain dans les villes de Settat et Khouribga au Maroc (**Figure 11**), entre novembre et décembre 2017. L'identification botanique a été faite par un taxonomiste. Après la récolte, les fruits ont été nettoyés à l'eau et soigneusement séparés en pulpes, graines et amandes à l'aide d'un couteau en acier inoxydable, puis séchées dans l'étuve à 45 °C pendant 48h. Les matières sèches obtenues ont été réduites en poudre à l'aide d'un broyeur à usage intensif, emballés séparément dans des conteneurs hermétiques et stockés à température ambiante (24 ± 4 °C), jusqu'à leur utilisation.

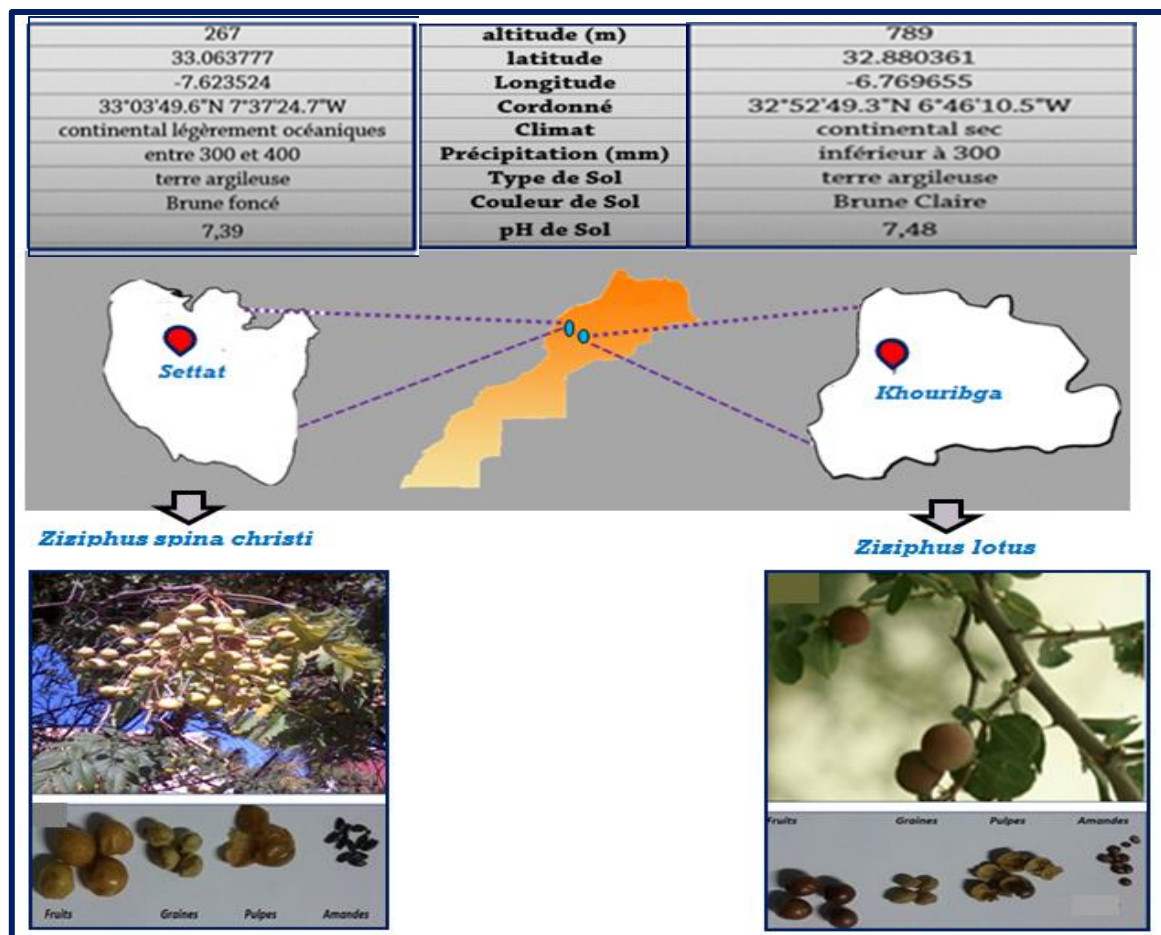


Figure 11 : Conditions géographiques et écologiques des sites de récolte de *Ziziphus spina christi* et *Ziziphus lotus* (https://www.hcp.ma/downloads/Maroc-en-chiffres_t13053.html)

1.2. Préparation des extraits

Les poudres de fruits, pulpes, graines et amandes (100 g chacun), de *Ziziphus spina-christi* et *Ziziphus lotus*, ont été extraits par macération à froid (4° C) avec 250 mL d'éther de pétrole pendant 24 h. L'extrait a été filtré à travers un papier filtre Whatman N°1, et le résidu a ensuite été ré-extrait par le même processus avec d'autres solvants successivement chloroforme, acétone, acétate d'éthyle, méthanol et eau bidistillée. Le filtrat a été recueilli et l'excès de solvant a été évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 50 ° C. Chaque extrait sec obtenu a été recueilli dans le Diméthylsulfoxyde (pureté 99,9%) à une concentration finale de 100 mg/mL et stockées à 4 °C (El Maaiden, et al., 2019). La méthode d'extraction par des solvants de polarité croissante a permis d'obtenir six extraits pour chaque partie de plante (extrait d'éther de pétrole, chloroforme, acétone, acétate d'éthyle, méthanol et eau bidistillée). Sachant que nous travaillons avec quatre parties de la plante (fruits, pulpes, graines et amandes) pour chaque espèce (*Ziziphus spina-christi* et *Ziziphus lotus*) : le nombre total d'extraits obtenus est de 48 extraits. Le rendement de chaque extrait a été déterminé comme suit :

$$\text{Rendement (\%)} = [\text{poids d'extrait brut/poids de la plante sèche en poudre}] \times 100$$

2. Composition chimique

2.1. Teneur en substances volatiles

Il s'agit de déterminer par gravimétrie la proportion des substances volatiles (SV) contenues dans l'échantillon étudié en mesurant la perte de masse à la dessiccation. 5 g de chaque poudre pesée à l'état frais, sont placés dans une étuve réglée à 105 °C jusqu'à stabilisation de la masse (AOAC international, 1990). La teneur en substances volatiles est calculée selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} \text{Teneur en substances volatiles (\%)} \\ = ((\text{Masse de la matière fraîche} - \text{Masse de la matière sèche}) \\ / \text{Masse de la matière fraîche}) \times 100 \end{aligned}$$

2.2. Teneur en lipides

La teneur en lipides (TL) est déterminée par extraction à l'aide d'appareils Soxhlet (AOAC international, 1990). 25 g de chaque poudre ont été mis dans une cartouche en papier

filtre, puis placés dans l'appareil Soxhlet. 250 mL d'hexane ont été versés dans le ballon, l'ensemble est chauffé pendant 8 heures. Après élimination du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif, le ballon est séché à une température de 70-80 °C, puis pesé. La teneur en lipide a été calculée comme suit :

Teneur en lipide (%)

$$= ((\text{Masse du ballon avec l'huile extraite} - \text{Masse du ballon vide}) / \text{Masse de la prise d'essai}) \times 100$$

2.3. Teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale correspond à la masse du résidu obtenu après incinération des échantillons (AOAC international, 1990). 1 g de chaque poudre est pesé dans un creuset à incinération et placé dans un four à moufle (525 ±25°C) durant 5 heures, jusqu'à l'obtention d'une cendre blanchâtre. Les creusets sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur. La teneur en matière organique est calculée selon la formule suivante :

Teneur en matière organique (%)

$$= ((\text{Prise d'essai} - \text{Masse des cendres}) / \text{Prise d'essai}) \times 100$$

$$\text{***Teneur en matière minérale (%) = 100 - Teneur en matière organique (%)***}$$

2.4. Teneur en protéines

La teneur en protéine a été déterminée selon la méthode standard de Kjeldahl (AOAC international, 1990). Cette méthode est basée sur la quantification de la teneur en azote (N%). La teneur en protéines est calculée en multipliant la teneur en azote par le coefficient 6,25. La phase de digestion consiste en une attaque chimique par l'acide sulfurique afin d'éliminer la matière organique. Pour ce faire, dans un matras de minéralisation on mélange 1 g de chaque poudre avec 15 mL d'acide sulfurique pur, et 1g de sulfate de cuivre et de potassium (catalyseur Kjeldahl), le mélange subit un chauffage progressif jusqu'à ce que la solution devienne limpide. La deuxième phase est la distillation qui consiste à distiller l'azote sous forme d'ammoniac. Cette étape est réalisée en ajoutant 20 mL de soude (35 %) dans le matras et d'acide borique (25 %) dans une fiole de 250 mL. La dernière étape de titration est réalisée par l'ajout de quelques gouttes de l'indicateur de TACHIRO (mélange de bleu de méthylène et rouge de méthyle 50/50) dans la fiole contenant l'ammoniac et l'acide borique. L'excès

d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique (Normalité de l'acide : 0,05) par simple titration. La teneur en azote (N) total est déterminée par la formule suivante :

$$N (\%) = \frac{(0,05 \times 2 \times \text{Volume de l'acide sulfurique versé (mL)} \times 14)}{\text{Masse de la prise d'essai (g)}}$$

$$\text{Teneur en protéine (\%)} = N (\%) \times 6,25$$

2.5. Teneur en sucre

La teneur approximative en sucre est déterminée par un calcul différentiel et exprimée en g/100g de matière fraîche (AOAC international, 1990). Elle est calculée par la formule suivante :

Teneur en sucre

$$= [100 - (\text{substance volatile} + \text{protéine} + \text{lipides} + \text{Matière minérale})]$$

2.6. Dosage des minéraux

L'analyse des minéraux a été effectuée selon les méthodes décrites par l'Association des chimistes analytiques officiels (AOAC international, 1990). En bref, 1 g de chaque poudre a été incinéré dans un four à moufle (550 ± 10 °C, 6 h) puis digéré avec 5 mL d'acide chlorhydrique (6M) dans un bain d'eau. Ensuite, 7 mL d'acide nitrique (HNO₃, 0,1 M) ont été ajoutés et le contenu a été dilué à 100 mL d'eau doublement déionisée. Le potassium (K) a été déterminé sur un photomètre à flamme (Systronics-130) tandis que le magnésium (Mg), le calcium (Ca), le sodium (Na), le fer (Fe) et le zinc (Zn) ont été déterminés sur un spectrophotomètre d'absorption atomique (ECIL, Atomic Absorption Spectrophotomètre-4141). Des courbes d'étalonnage standard ont été construites pour chaque élément individuellement en utilisant une corrélation linéaire par la méthode des moindres carrés après avoir fait tourner des solutions standard.

2.7. Screening phytochimique

Les poudres de chaque partie de fruit de *Ziziphus Spina christi* et *Ziziphus lotus*, ont fait l'objet d'une analyse phytochimique qualitative pour déterminer la présence de diverses classes de constituants chimiques actifs tels que les saponines, les alcaloïdes, les stérols, les

quinones, les terpènes, les stéroïdes, en utilisant des procédures standard (Osorio-Esquivel, et al., 2011).

- Test des alcaloïdes

5g de chaque poudre et 50 mL d'une solution diluée d'acide sulfurique (1%) sont introduit dans un ballon. L'ensemble est bien agité pendant deux minutes, puis quelques gouttes de réactif de Mayer sont ajoutées. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes.

- Test des saponines

25 mg de chaque poudre sont mélangé à 15 mL d'eau distillée dans un ballon et l'ensemble est porté au bain-marie (5 min, 30°C). Le ballon est secoué vigoureusement pendant environ 30 secondes puis laisse reposer une demi-heure. L'apparition d'une mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence des saponines.

- Test des stérols et terpènes

Dans un ballon on mélange 20 mg de chaque poudre, 3 mL de chloroforme, 10 gouttes d'anhydride acétique et 2 gouttes d'acide sulfurique (concentré à 98%). Le ballon à essai est bien agité jusqu'à l'apparition d'une coloration verte qui indique la présence des stérols et des terpènes.

- Test des stéroïdes

5mg de chaque poudre est mélangé avec 1 mL de chloroforme puis 1 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couche supérieure rouge qui indique la présence des stéroïdes.

2.8. Dosage des polyphénols

2.8.1. Phénol

Le contenu phénolique total des différents extraits a été déterminé par la méthode Folin-Ciocalteu (Laličić, et al., 2016). Cette méthode, est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de

couleur bleue. La coloration bleue produite, présente un maximum d'absorption aux environ de 765 nm dont l'intensité est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans l'échantillon.

En bref, un volume de 0,25 mL de réactif Folin (dilué dix fois) a été ajouté à 0,25 mL de chaque extrait (100 mg/ml) et 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (7,5 %). Le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes avec une agitation intermittente. L'absorbance de la couleur bleue résultante a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un Spectrophotomètre UV-Vis. L'acide gallique a été utilisé comme étalon. Le contenu phénolique total a été calculé comme la moyenne \pm SD et exprimé en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g MS) ($n = 3$; tous les échantillons ont été analysés trois essais différents).

2.8.2. *Flavonoïdes*

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium décrite par (Dinis, et al., 1994). En présence de trichlorure d'aluminium, les flavonoïdes sont capables de former un complexe acide stable de couleur jaunâtre.

Un volume de 0,5 mL de chaque extrait à (100mg/ml) analyser a été ajouté à 1,5 mL de méthanol (95%), 0,1 mL de chlorure d'aluminium (10%), 0,1 mL d'acétate de sodium et 2,8 mL d'eau distillée. Après agitation, le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 415 nm. La quercétine a été utilisée comme étalon. La teneur totale en flavonoïdes a été calculée comme la moyenne \pm SD et exprimée en milligrammes d'équivalent Quercitain par gramme de matière sèche (mg QE/g MS) ($n = 3$; tous les échantillons ont été analysés en trois essais différents).

2.8.3. *Tanins*

La teneur en tanins condensés a été déterminée selon la méthode décrit par (Dinis, et al., 1994). 1 mL de chaque extrait a été complété à 7,5 mL avec de l'eau distillée. Ensuite, 0,5 mL de réactif Folin-Denis et 1 mL de solution de carbonate de sodium (7,5%) ont été ajoutés. Le volume a été complété à 10 mL avec de l'eau distillée, et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'acide tannique a été utilisé comme étalon. La teneur totale en tanin a été calculée comme la moyenne \pm SD (tous les échantillons ont été analysés en trois essais différents ; $n =$

3) et exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg TAE/g MS).

2.8.4. Anthocyanine

Le contenu en anthocyanes a été déterminé par méthode pH différentiel qui utilise deux systèmes tampon : tampon du chlorure de potassium (pH 1,0 ; 0,025 mol/L) et tampon d'acétate du sodium (pH 4,5 ; 0,4 mol/L). (Giusti, et al., 2001).

Un volume de 0,25 mL de chaque extrait a été mélangé à 2 mL de chaque tampon, et l'absorbance a été mesurer à partir du blanc 15 secondes plus tard à 510 nm et 700 nm. La teneur totale en anthocyanine (mg/g) a été exprimée en cyanidine-3-glucoside selon l'équation suivante:

$$\text{Anthocyanine} = [\text{Abs} \times \text{FD} \times (\text{V}/\text{PM}) \times 100]/(\text{E} \times \text{L})$$

Abs : L'absorbance de l'extrait ($\text{Abs} = (\text{A } 510 - \text{A } 700)_{\text{pH}1,0} - (\text{A } 510 - \text{A } 700)_{\text{pH}4,5}$)

FD : Facteur de dilution

V : Volume final de l'extrait (mL)

PM : Poids moléculaire du cyanidin3-glucoside (449,2 g/mole)

E : Coefficient d'absorbance molaire du cyanidin3-glucoside ($26900 \text{ (M.cm)}^{-1}$)

L : Longueur du trajet cellulaire (1 cm)

La teneur en composés anthocyaniques a été calculée comme la moyenne \pm SD et exprimée en milligrammes par gramme de matière sèche (mg/g MS) (n = 3 ; tous les échantillons ont été analysés en triple exemplaire).

2.8.5. Proanthocyanidine

La teneur totale en proanthocyanidine a été déterminée par la méthode décrite par (Laličić, et al., 2016).

Un volume de 0,2 mL de chaque extrait a été mélangé à 20 mL de butanol/acide chlorhydrique (20%) (50 : 50) et 2 mL de sulfate ferreux (0,54 mM). Le mélange a été incubé à 90 °C pendant 1 h, après refroidissement le volume a été complété à 25 mL avec le mélange butanol-acide chlorhydrique (20%) (50 :50). L'absorbance a été mesurée à 550 nm contre un blanc préparé de manière similaire mais sans chauffage. Le chlorure de cyanidine a été utilisé

comme étalon. Toutes les mesures ont été effectuées en trois exemplaires. Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent chlorure de cyanidine par gramme de matière sèche (mg CCE/g MS).

2.8.6. *Flavan-3-ol*

La teneur totale en Flavan-3-ol a été déterminée selon la méthode de (Laličić, et al., 2016).

Dans un tube à essai, on mélange 50 μ L de chaque extrait, 3 ml d'une solution vanilline à 4% (dans le méthanol) et 1,5 ml de l'acide chlorhydrique (20%). La solution vanilline a été remplacée par 3 ml de méthanol pur. Les mélanges ont été conservés pendant 15 min dans l'obscurité à la température ambiante, et les absorbances ont été mesurées à 550 nm. La teneur en flavan-3-ol a été calculée selon l'équation :

$$\text{flavon} - 3 - \text{ol} = 290 \times \Delta A$$

Où ΔA est la différence en soustrayant l'absorbance du blanc (550 nm) de l'absorbance de l'échantillon et correspondant à la contenance en vanilline. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent (+) -catéchine par gramme de matière sèche (mg CE/g MS) et présentés en moyenne \pm écart type de trois essais différents.

2.9. *Identification et dosage des métabolites secondaires par chromatographie liquide à haute performance*

Les métabolites secondaires ont été analysés par un système de chromatographie liquide à ultra-haute performance (Agilent Technology 1200 series) équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, et d'un échantillonneur automatique thermostatique. Un détecteur à barrettes de diodes (DAD) a été utilisé pour l'identification et la quantification de divers composés phénoliques dans les échantillons. La séparation par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a été effectuée à l'aide d'une colonne Zorbax SB-C18 (150 mm x 4,6 mm de diamètre intérieur ; taille des particules 3,5 μ m). La phase binaire a été réalisée selon une procédure modifiée de (Tsao, et al., 2003). La phase mobile binaire consistait en un acide acétique à 6% dans de l'acétate de sodium 2mM (pH= 2,55, 50 :50) (A) et de l'acétonitrile pur (B). Tous les solvants ont été filtrés et dégazés à travers un filtre en nylon de 0,45- μ m avant d'être analysés. Le débit a été fixé à 0,6 mL/min pour une durée totale de 48 minutes. Le

programme de gradient était le suivant : 0-15% B à 27 min, 15-30% B à 9 min, 30-50% B à 3 min et 50-100% B à 3 min. Une post-exécution de 6 min dans les conditions initiales d'équilibre a également été effectuée.

Les solutions standards ont été préparées en dissolvant les composés de référence (acide gallique, procyanidine b1, catechin, procyanidine b2, acide chlorogénique, cyanidin-3-galactosidase, acide caféique, anthocyanine, epicatechin, cyanidin-3-rutinoside, acide p-coumarique, 3-hydroxyphlorétine 2'-xyloglucoside, rutin, acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide syringique, acide férulique, acide sinapique, naringin, acide salicylique, acide rosmarinique, hyperin, avicularoside, resveratrol, et quercétine) dans du méthanol pour obtenir des solution mères de 200 µg /mL.

0.5 g des résidus de chaque extrait aqueux a été mélangés dans 10 mL de méthanol, puis 1 ml a été transféré dans une fiole jaugée et dilué dans 9 ml de phase mobile A (acide acétique à 6% et acétate de sodium 2mM (50 :50)). Une solution finale de concentration de 5 mg/mL a ainsi été obtenue.

Le volume d'injection était de 10 µL et la température de la colonne de 35 °C. Le détecteur a été réglé à 280, 320, 360 et 520 nm pour la surveillance simultanée des différents groupes de composés phénoliques. L'identification des composés phénoliques a été réalisée en comparant les temps de rétention et les spectres UV-Vis avec les références standards disponibles. Les résultats ont été exprimés en µg/g de matière sèche (µg/g MS).

3. Potentiel antioxydant des extraits

3.1. Activité de piégeage des radicaux 2,2-diphényl picryl-hydrazine

Le test de piégeage des radicaux 2,2-diphényl picryl-hydrazine (DPPH•) a été effectué selon la procédure décrit par (Zakaria, et al., 2008). Le radical DPPH•, de coloration violette et qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm, accepte l'hydrogène qui est cédé par l'antioxydant pour former le DPPH. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH• est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration.

La solution de DPPH est solubilisée dans du méthanol absolu (0,2 mM). 0,4 mL de chaque extrait (100 mg/ml) ont été ajoutés à 2 mL de la solution de DPPH, le mélange obtenu

a été placé à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance (abs) a ensuite été mesurée à 517 nm. La vitamine C a été utilisée comme témoin positif. Toutes les mesures ont été effectuées en essais différents. Le DPPH a été exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH et a été calculée comme suit l'équation :

$$DPPH\% = \frac{[(\text{Absorption du contrôle}) - (\text{Absorption de l'échantillon.})]}{(\text{Absorption du contrôle})} \times 100$$

3.2. Chélation des ions ferreux

La chélation des ions ferreux par les extraits a été estimée comme décrit par (Dinis, et al., 1994).

1mL de chaque extrait a été ajouté à 0,3 mL de solution de chlorure de fer (FeCl_2 , 1mM). Le mélange a ensuite été incubé pendant 5 min et la réaction a été initiée en ajoutant 0,3 mL de ferrozine (25 mM). Le mélange obtenu a été vigoureusement agité et laissé reposer pendant 10 min à température ambiante. La couleur verte développée a été enregistrée par spectrophotométrie à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe de la ferrozine-fer a été calculé selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} \text{Chélation des ions ferreux}(\%) \\ = \frac{[(\text{Absorption du contrôle}) - (\text{Absorption de l'échantillon.})]}{(\text{Absorption du contrôle})} \times 100 \end{aligned}$$

3.3. Activité de piégeage des radicaux 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Le test de piégeage des radicaux 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^+) a été réalisé comme décrit par (Ammar, et al., 2012).

La solution mère du radical ABTS^+ a été produite en faisant réagir 10 mL d'ABTS (2 mM) avec 0,1 mL de persulfate de potassium (70 mM) et en laissant le mélange reposer dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 h. La solution de travail d'ABTS a été diluée avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7,4) jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,70 ($\pm 0,02$) à 734 nm. Les échantillons ont été préparés en diluant 0,1 mL de chaque extrait dans 2 mL de la solution ABTS^+ diluée ; on laisse le mélange pendant 1 minute pour que la réaction puisse être effectuée. L'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à

734 nm. Tous les échantillons ont été analysés en trois essais différents (n=3). L'activité de piégeage des radicaux ABTS a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage du Trolox et exprimée en milligramme d'équivalent Trolox par gramme de matière sèche (mg TE/g MS).

3.4. Capacité d'absorption des radicaux libres

Le test de capacité d'absorption des radicaux libres (ORAC) a été réalisé suivant la méthode de (Prior, et al., 2003). Les analyses ont été effectuées dans un tampon de phosphate (12 mM, PH=7,4, 37 °C). Le radical peroxy a été généré en utilisant le dichlorhydrate de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) fraîchement préparé.

10 µL de chaque extrait est déposé en plaque de 96 puits. Ensuite, une solution aqueuse de 150 µL de fluorescéine (0.008 µM/L) a été ajoutée dans chaque puits, la plaque est incubée à 37 °C pendant 10 minutes. La réaction est déclenchée par l'ajout de 30 µL d'2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (153 mmol/L) dans chaque puits. L'intensité de fluorescence émise à 528 nm a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm. Toutes les mesures ont été effectuées en trois exemplaires. Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent Trolox par gramme de matière sèche (mg TE/g MS).

3.5. Capacité de réduction des ions cuivriques

Le test de capacité de réduction des ions cuivriques (CUPRAC) a été réalisé selon (Zengin, et al., 2016).

1 mL d'extrait a été mélangé avec 1 mL de Chlorure de cuivre (II) (10 mM), 1 mL de néocupraoine (7,5 mM) et 1 mL de tampon d'acétate (1 mM, pH 7,0). Le mélange réactionnel (4 mL au total) a été agité doucement, puis incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercitrin par gramme de matière sèche (mg QE/g MS).

3.6. Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

Le test de pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) était basé sur la méthode déclarée par (Grochowski, et al., 2017). Elle est basée sur la réduction du fer ferrique en fer ferreux par des composés à propriété antioxydante, entraînant ainsi l'apparition d'une couleur bleue.

Le réactif FRAP a été fraîchement préparé en mélangeant une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6), une solution de 2, 4,6-tri (2-pyridyl)-striaizine (10 mM), une solution ferrique (20 mM) et un tampon d'acétate (0,3 mM, pH 3,6) dans des proportions de 1:1:1:10 (v/v). Pour réaliser le test, 0,9 mL de réactif de FRAP ont été mélangés avec 90 µl d'eau distillée. Environ 30 µl de chaque extrait ont été ajoutés et incubés à 37 °C dans un bain-marie pendant 30 minutes. L'absorbance à 593 nm a été déterminée par rapport à un blanc en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Une gamme d'étalonnage établie avec quercétine. Les valeurs FRAP ont été exprimées en milligramme d'équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg QE/g MS).

3.7. Blanchissement du β -carotène

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres, qui vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. La présence d'un antioxydant dans l'extrait tester pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. L'activité de blanchiment du carotène (β BA) a été déterminée selon la méthode de (Koleva, et al., 2002).

Une quantité de 2 mg de β -carotène est solubilisée dans 10 mL de chloroforme. On prélève 1 mL de cette solution dans un bécher contenant préalablement 200 mg de Tween 40 et 20 mg d'acide linoléique. Après évaporation, un volume de 50 mL d'eau saturée en oxygène est ajouté. 0,15 mL de l'émulsion β -carotène/acide linoléique a été distribué dans chacune des plaques de microtitration à 96 puits et 0,01 mL de l'extrait a ensuite été ajouté. L'absorbance a été mesurée à 470 nm. L'activité antioxydante des extraits a été évaluée en termes de blanchiment au carotène β à l'aide de la formule suivante :

blanchissement du β – carotène(%)

$$= [(AA (120) - AC (120)) / (AC(0) - AC (120))] \times 100$$

AA (120) : Absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min.

AC (0) : Absorbance du contrôle à 120 min.

AC (120) : Absorbance du contrôle à 0 min

II. Effet protecteur des extraits de Ziziphus contre la toxicité induite par le Fer : étude in vivo et in vitro

1. Modèle expérimental

1.1. Module Cellulaire

Notre modèle cellulaire d'étude c'est le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis* (souche GL, L 1630/1) de la Collection de culture d'algues et de protozoaires (Downing Street, Cambridge).

1.2. Modèle animal

Les souris utilisées dans ces études sont des souches Swuis male provenant de l'institut Pasteur à Tit Melil Casablanca. Le poids moyen des souris était de 20 ± 5 g.

2. Conditions de culture

2.1. Conditions de culture des cellules

D'abord les souches ont été conservées à 4 °C dans 5 mL du milieu standard, contenant protéase-peptone (1,5%, w/v) et l'extrait de levure (0,25%, w/v), ce milieu est dépourvu de glucose pour minimiser le taux de croissance cellulaire. À partir de ces cultures, on réalise une pré-culture dans un nouveau milieu riche en glucose (0,2%) qu'on incube à 28 °C pendant 72 h. La culture a été ajustée à une densité de 6×10^6 cellules/mL.

2.2. Conditions d'élevage des souris

Les souris sont maintenues dans l'animalerie du laboratoire où règne une température constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h, avec une ration alimentaire journalière de 12g/jour/souris avec accès libre à l'eau. Les expérimentations sont réalisées après une période d'adaptation minimale de 7 jours. Les travaux sur les souris ont été réalisés selon les recommandations du comité d'éthique de l'université Hassan 1er Settat.

3. Traitements

3.1. Traitement des cellules

3.1.1. Traitement par chlorure de fer (II)

Pour examiner la toxicité du fer, les cellules ont étéensemencées à une densité initiale de 6×10^6 cellules/mL et traitées avec différentes concentrations (0-3 mM) de chlorure de fer (II) pour des intervalles de temps variables (24 h, 36h, 48 h, 60 h et 72 h). La solution de chlorure de fer (10 mM) est commodément préparée en laboratoire par l'addition de poudre de chlorure de fer à l'eau distillée suivie d'un ajustement de pH entre 6,8 et 7 en utilisant soit la solution de NaOH et /ou HCl selon le pH. La solution finale est filtrée en utilisant le papier filtre.

3.1.2. *Traitement par les extraits*

Pour évaluer la dose non létale des extraits, les cultures primaires des cellules ont été cultivées à 6×10^6 cellules/ml et exposées aux gammes de concentrations (0,1-1 mg/mL) de chaque extrait pendant 72 h. La dose non létale correspond à la dose qui ne modifie par la viabilité ou la croissance cellulaire.

3.1.3. *Co-tréatment*

Pour l'évaluation de l'effet protecteur des extraits de *Ziziphus* contre la toxicité induit par chlorure de fer (II) nous avons choisi l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* (ZSC), car il est le mieux classé (0,1 mg/mL) suite aux résultats du screening photochimiques, des activités antioxydantes et des tests de cytotoxicités. Pour cela, les cellules ont été pré-incubées avec 0,1 mg/mL de l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi*. Après 24 h d'incubation, le FeCl_2 a été ajout aux milieux de façon à avoir une concentration finale de 1 mM de chlorure de fer (II) (FeCl_2) puis incubées pendant 24 h (Francis, et al., 2003). Les cellules du groupe témoin ont été incubées avec un milieu sans FeCl_2 et sans extrait.

3.2. *Traitement et sacrifice des souris*

Les souris (Swiss, male) ont reçu pendant 30 jours, l'eau potable enrichie d'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* (200 mL d'extrait (100 $\mu\text{g/mL}$) / litre d'eau potable). Le traitement des souris avec du chlorure de fer (II) a été fait par gavage à l'aide d'une sonde de gavage à une dose de 8 mg/kg poids corporel préparé dans l'eau physiologique saline. Le lot contrôle ont été gavées dans les mêmes conditions avec de l'eau physiologique saline (**Tableau 3**). Toutes les expériences ont été réalisées entre 7 :00 et 9 :00 h du matin. Le poids corporel des animaux a été relevé quotidiennement pendant la période de traitement. Le

traitement des souris a été conforme aux recommandations du comité d'éthique de l'université Hassan 1er Settat.

À la fin du traitement, les souris ont été mis à jeun pendant 12 h avant qu'elles soient sacrifiées. Les prélèvements des organes sont effectués en chambre froide à 4°C. Les animaux sont sacrifiés par décapitation. Après sacrifice des souris, les organes (foie, cœur, reins, cerveau) ont été prélevés, et lavés avec de l'eau physiologique avant d'être pesés. Les organes, sont immédiatement stockés à -80°C jusqu'à leurs utilisations.

Tableau 3 : Composition des groupes expérimentaux des souris

Groupe I :	<i>Représente le lot témoin (n=5). Reçoit par gavage une solution saline et boit de l'eau potable.</i>
Groupe II :	<i>Reçoit par gavage une solution saline et boit de l'eau potable additionnée de l'extrait aqueux de graines de <i>Ziziphus spina christi</i> (200 mL d'extrait/ L d'eau potable) (n=5).</i>
Groupe III :	<i>Représente le model intoxiquées (n=5). Reçoit par gavage du chlorure de fer (II) (8 mg/kg) dans l'eau physiologique saline et boit de l'eau potable.</i>
Groupe IV :	<i>Reçoit par gavage du chlorure de fer (II) (8 mg/kg) dans l'eau physiologique saline et boit de l'eau potable additionnée de l'extrait aqueux des graines de <i>Ziziphus spina christi</i> (200 mL d'extrait/ L d'eau potable) (n=5).</i>

4. Évaluation de la toxicité de fer

4.1. Évaluation de la toxicité sur les cellules

Les effets cytotoxiques in vitro du chlorure de fer (II) sur les cellules *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) ont été évalués en effectuant le test colorimétrique MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), basé sur la conversion mitochondriale du MTT, suivant le protocole de (Mosmann, 1983). En présence des cellules viables, le MTT (colorant jaune) est réduit en un sel de formazan soluble dans l'eau (cristal de formazan bleu).

Après 12 h d'incubation, les cellules ont été exposées au chlorure de fer (II) (0-3 mM) pendant 24, 36, 48, 60 ou 72 h. Les cellules témoins ont reçu la même quantité de diluant (eau distillée). Une fois la période d'exposition terminée, 0,5 mg / mL de MTT a été ajouter au milieu, et incubé pendant 4 heures dans un incubateur à 37°C. La suspension cellulaire a été centrifugée pendant 5 minutes et 0,5 mL de DMSO a été ajouté pour solubiliser les cristaux de

formazan dans le culot. La valeur de densité optique a été mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre. Le pourcentage des cellules viables est déterminé par rapport à celle des cellules contrôles.

4.2. *Évaluation de la toxicité sur les souris*

Afin d'évaluer la mortalité et de la toxicité induite par chlorure de fer (II), tous les animaux ont été observés tout au long de la période d'expérience. Les changements dans la marche et le comportement anormal. Les masses corporelles individuelles ont été enregistrées avant, pendant et à la fin de l'expérience. Les critères d'examen étaient fondés sur la position, la forme, la taille, la couleur et la consistance des organes et les masses relatives.

5. **Évaluation de l'accumulation de fer in vitro**

5.1. *Test de ferrozine*

La concentration de fer est déterminée en mesurant l'absorption des complexes formés entre 3-(2-pyridyle)-5,6-bis(acide 4-phénylsulfonique)-1,2,4-triazine (ferrozine) et le fer ferreux des échantillons à 562 nm.

En bref, les cellules ont été recueillies par centrifugation à 2000×g pendant 10 minutes pour enlever le milieu. Les granulés cellulaires ont été lysés avec 300 µl d'hydroxyde sodium (50 mM) pendant 2 h à température ambiante. Un volume équivalent (300 µl) d'acide chlorhydrique (10 mM) a été ajouté, suivi de l'ajout de 300 µl d'un mélange contenant permanganate de potassium (2,25 %) et d'acide chlorhydrique (0,7mM). Ces mélanges ont été incubés à 60 °C pendant 2 h. Les échantillons chauffés ont été refroidir à température ambiante avant l'ajout de 90 µl de solution de détection de fer fraîchement préparée (6,5 mM de ferrozine, 1 mM d'acide l'ascorbique et 2,5 mM d'acétate d'ammonium). Après 30 min, 280 µl de chaque extrait (100ug/ml de DMSO) ont été transféré dans des puits d'une plaque de 96 puits et l'absorption a été mesurée à 562 nm. Chlorure de fer (III) (FeCl₃) a été utilisé comme standard (Bowlus, 2003).

5.2. *Coloration de Perls*

Afin de mettre en évidence l'accumulation du fer dans les cellules de *Tetrahymena pyriformis*, la technique utilisée est celle de Perls (Perls, 1867). Pour cela, les cellules ont été lavées 3 fois avec une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), fixées avec 4% de

glutaraldéhyde pendant 10 minutes, et incubées à 37 °C pendant 60 minutes avec 2 mL de solution bleue prussienne comprenant des volumes égaux de 40 µL de solution aqueuse d'acide chlorhydrique (20%) et 40 µL de ferrocyanure de potassium (II) trihydrate. Le mélange est ensuite étalé sur lame et les cellules fixées avec une flamme. Les lames sont immergées pendant une heure dans la solution d'acide de ferrocyanure, lavées avec de l'eau distillée et séchées pour être visualisée par le microscope Nikon (l'objectif x100).

6. Préparation des homogénats

6.1. Homogénat des cellules

Les cellules sont centrifugées à 10000 g pendant 6 minutes. Le culot des cellules obtenu est repris dans 200 µl de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4). Les cellules sont lysées par un broyeur de Potter. Cette lyse est suivie d'un passage aux ultrasons de l'échantillon : 3 cycles de 15 secondes à 70W dans de la glace. L'extrait obtenu est centrifugé à 10000 g pendant 6 minutes. Le surnageant qui présente l'extrait cellulaire est collecté, puis congelé à -80°C jusqu'à utilisation (Nishikimi, et al., 1972).

6.2. Homogénat des organes

Une partie des organes (foie, cœur, reins, cerveau) a été grattée et homogénéisée dans un cocktail (60 mL de phosphate de sodium (50 mM), 10 mL de Triton-X 100 (0,1 %) et 5 mL de chlorure de calcium (0,05 mM)). Les homogénats obtenus ont été centrifugés à 10000 g pendant 30 min (4 °C) et le surnageant récupéré a été fractionné en plusieurs aliquotes de 1 mL, conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

7. Dosage des protéines

La méthode de Lowry est un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques : la réaction de Biuret, dans laquelle le cuivre (Cu^{2+}), en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleue-profond et la réaction de Folin-Ciocalteu, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert (Lowry, et al., 1951).

Pour cela, 10 µL d'homogénat est mis en présence de la solution de Lowry A (former de 4 mg/mL d'hydroxyde de sodium, 20 mg/mL carbonate de sodium) et solution de Lowry B

(contient, 10 mg/mL potassium sodium tartrate, 5 mg/mL sulfate de cuivre) (50 :1). Ensuite, on ajoute 0.1 mL de réactif de Folin Ciocalteu (1 N). Après 30 minutes à 37°C, l'intensité de la coloration a été mesurée à 750 nm au spectrophotomètre. La concentration protéique des échantillons a été calculée en mg/mL, à partir de courbe étalon réalisé avec bovin sérum albumine (BSA) dont la concentration varie de 25 à 250 µg/mL. La quantité de protéine est exprimée en mg/g.

8. Évaluation des marqueurs de stress oxydatif

8.1. Catalase

La méthode utilisée dans le dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT) est celle de (Aebi, 1984). Cette enzyme catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène.

Dans une cuve de Quartz, 1,95 mL de tampon phosphatent (50 mM), 1 mL de peroxyde d'hydrogène (0,019 M) et 0,05 mL d'homogénat ont été ajoutés. La densité optique a été lue à 240 nm à l'instant (T₀) et après toutes les 30 secondes pendant 2 minutes. Une unité de l'enzyme est définie comme 1 µmol de H₂O₂ consommée par minute. L'activité spécifique a été normalisée par rapport à la quantité de protéine totale, et elle a été exprimée en unité catalase par milligramme de protéine (U/mg protéine). L'activité de la catalase est déterminée selon la relation suivante :

$$CAT = ((2.3033) / \Delta T) \times (\log A1 / A2)$$

A1 : L'absorbance à 240 nm de H₂O₂ à l'instant T₀.

A2 : L'absorbance à 240 nm de H₂O₂ après un temps T

ΔT : Le temps entre les deux absorbances

8.2. Superoxyde Dismutase

L'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) a été quantifiée selon la méthode de (Nishikimi, et al., 1972).

Un mélange de 3 mL a été préparé en ajoutant du tampon phosphate (50 mM), du triton X-100 (0.025%), d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (pH 8, 0.1 mM), de la L-Méthionine (12 mM), du Nitrobleu de tétrazolium (75 µM), 20 µL de l'homogénat et de

la riboflavine (2 μ M) (ajoutée à la fin pour initier la réaction). La réaction a été effectuée à 25°C sous une lampe de 15W pendant 10 minutes. L'absorbance a été mesurée à 560 nm, l'activité SOD est déterminée selon la relation suivante :

$$SOD = ((Ac - Ae) / Ac) \times 100$$

Ac : Absorbance du blanc sans homogénat et sans NBT

Ae : Absorbance de l'échantillon

8.3. Glutathion Peroxydase

L'activité Glutathion Peroxydase (GPx), a été calculée par la diminution du taux de glutathion réduit (GSH) en utilisant H₂O₂ comme substrat (Paglia, et al., 1967).

L'activité GPx a été déterminée dans un milieu réactionnel de volume de 1 mL contenant 0,3 mL de l'homogénat, 0,3 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), 0,2 mL de GSH (2 mM), 0,1 mL de sodium azide (10 mM) et 0,1 mL de H₂O₂ (1 mM). Après incubation à 37°C pendant 15 minutes, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) (5 %). Une centrifugation 1500 g pendant 5 minutes a été effectuée afin de récupérer 0,1 mL du surnageant qui a été ajouté à 0,2 mL de tampon phosphate (50 mM) et à 0,7 mL de DTNB [5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque)] (0,4 mg/mL, préparé dans tampon phosphate à 0,4 M). L'absorbance est déterminée à 420 nm (une gamme GSH est réalisée dans les mêmes conditions). L'activité est exprimée en unité GSH par milligramme de protéine (U/mg protéine)

8.4. Glutathion réduit

Le principe du dosage du glutathion réduit (GSH) est basé sur la réduction du 5-5'-DiThiobis (2-acide Nitro Benzoïque) (DTNB) par le NADPH. La formation de 5-Thio-2-NitroBenzoate (TNB) est suivie par mesure spectrophotométrique à 412 nm. À cette étape, la totalité du glutathion de l'échantillon est sous forme oxydée (Factor, et al., 1998).

La concentration de GSH a été déterminée dans un milieu réactionnel de volume contenant 0,2 mL d'acide trichloracétique (5%), 0,4 mL de l'extrait. Après centrifugation 12000 g pendant 10 minutes, 50 μ L du surnageant a été prélevé et ajouté à 0,1 mL de DTNB [5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque)] (6 mM) et à 0,85 mL du tampon phosphate (50

mM). La densité optique a été lue après 5 minutes à 412 nm et l'activité est exprimée en unité GR par milligramme de protéine (U/mg protéine).

9. Dosage du malondialdéhyde

La réaction de dosage du malondialdéhyde (MDA) a été décrite par (Ohkawa, et al., 1979). L'essai est basé sur la réaction d'un réactif chromogène, N-méthyl-2-phénylindole, avec MDA et 4-hydroxyalkenals à 45 °C. Une molécule de MDA ou 4-hydroxyalkenal réagit avec 2 molécules d'acide trichloracétique pour produire un chromophore stable avec absorption maximale à 532 nm.

On prépare un mélange de 0,2 mL d'échantillon, 0,2 mL de sulfate de dodécyl de sodium (8,1 %), 1,5 mL de solution d'acide acétique (20 %) et 1,5 mL de solution d'acide thiobarbiturique (0,8 %). Le volume a été complété à 4 mL avec de l'eau distillée. Les tubes ont été maintenus à 95 °C pendant 1 h. Ensuite, ils ont été refroidis sous l'eau du robinet et 2 mL du mélange ont été ajoutés à 2 mL d'acide trichloracétique. Ils ont été centrifugés à 1000 × g pendant 10 min. L'absorbance est lue à 532 nm. Les résultats sont comparés à une gamme d'étalonnage de MDA.

10. Évaluation du dommage d'ADN

10.1. *Extraction de l'ADN*

10.1.1. *ADN de Tetrahymena pyriformis*

L'extraction de l'ADN des cellules a été réalisée avec le surfactant SDS 20%/Triton X-100 (sulfate de dodécyl de sodium 20%/Triton X-100) (40 :60). Le protocole d'extraction et purification d'AND de *Tetrahymena pyriformis* par le surfactant SDS 20%/Triton X-100 est décrit plus en détail en **figure 12**.

10.1.2. *ADN des organes des souris*

Les organes conservés ont été utilisés pour déterminer les dommages causés à l'ADN en appliquant le modèle expérimental standard de (Jollow, et al., 1974). Les tissus de chaque organe (100 mg) ont été homogénéisés dans 10 volumes de solution Tris EDTA (5 mM Tris-HCL ; 20 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique EDTA, pH 8,0) et 0,2 % de Triton X-100. Ils ont été centrifugés à 10000 g pendant 20 min.

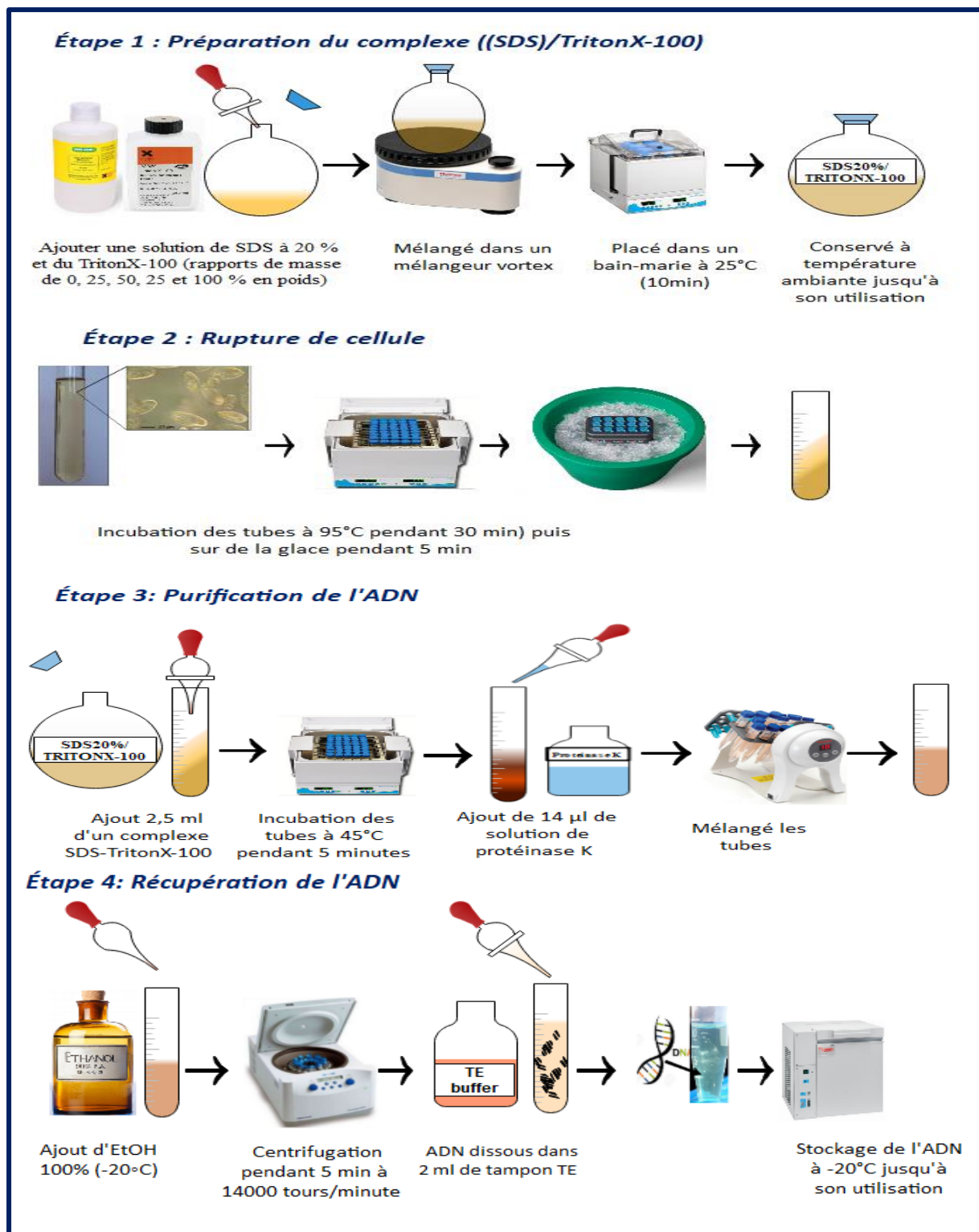


Figure 12: Protocole d'extraction et purification d'AND de *Tetrahymena pyriformis* par le surfactant SDS 20%/Triton X-100

10.2. Dosage d'ADN

Un test quantitatif de l'ADN des cellules et des souris a été effectué à l'aide de NanoDrop et Qubit. L'absorption a été mesurée à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm (A260 et A280). Le quotient d'absorption (A260/A280) fournit une estimation de la pureté de l'ADN. L'ADN est considéré comme pur lorsque le rapport A260/A280 est compris entre 1,8 et 2 (un rapport inférieur à 1,8 est indicatif de contamination protéique, et supérieur à 2 indiquent la contamination par l'ARN).

10.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

5 µL de L'ADN (200 µg) ont été mélangé avec le tampon de charge BET (bromure d'éthidium). Après, le mélange est disposé dans les puits du gel d'agarose 1,5%. La migration a été réalisée pendant 55 minutes à 50V. À la fin le gel est visualisé par l'appareil UV.

10.4. Amplification par réaction en chaîne de la polymérase du gène de la métallothionéine (MT).

L'amplification par PCR du gène de la métallothionéine (MT) a été effectuée en doublons, à l'aide d'amorces ciblant le protiste *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1). Les mélanges de réaction contenaient 50 µL de tampon KCl-MnCl₂ (Fermentas cartalitic méthane pyrolysis in molten, 1,5 mM MnCl₂), 0,5 mM solution de désoxynucléotide (dNTPs), 100 pM de chaque amorces, 1 µL Taq Polymérase Recombinant (1 U µL 174 -1) (Life Technologies, Nærum, Danemark), 350 ng de l'ADN extrait, et 2,5 unités de taq ADN polymérase ont été préparés dans un tube de 300 µL. Les conditions de PCR sont décrites dans le **tableau 4**. Par la suite, 5 µL de produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur 1% de gel agarose dans le tampon 1xTAE (Cheung, et al., 2005).

Tableau 4: Séquences d'amorces, concentrations finales et températures d'annelage des amorces utilisées pour mesurer la dégradation de l'ADN

Séquence de l'ensemble d'amorces	(Référence) (5'-3'), (3'-5')	Dénaturation (°C; min)	Annealation (°C; min)	Élongation (°C; min)	N° Cycles
Métallothionéines Primers	CGTGAATAAAAATGGATAAGGTTAATAA , CATTGCAACATTACAAGTCTTAC	94 ; 3,5	55 ; 0,4	72 ; 0,3	30

10.5. Analyse du produit de digestion de PCR avec l'enzyme de restriction Hindi III Digestion

La digestion de restriction des produits de PCR a été effectuée avec l'enzyme (HindI II). Les produits PCR ont été exposés à la digestion par l'endonucléase de restriction, dans un volume total de 20 μL (10 μL de produit de PCR, 2 μL enzyme buffer, et 7,8 μL d'eau distillée), et placés dans l'incubateur à 37 °C pendant 8 h. Les produits de restriction ont été analysés par électrophorèse (Bio-Rad) sur un gel agarose de 2%, et le poids moléculaire des fragments restreints a été analysé par des systèmes de documentation de gel (G-Box ; Syngene) après une coloration par le bromure d'éthidium (Himedia) (Cheung, et al., 2005).

11. Analyse Statistique

Tous les résultats ont été exprimés sous la forme d'une moyenne \pm SD. Les analyses statistiques ont été effectuées avec SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, IL, USA ; version 21). Les données ont été analysées par une analyse de variance et la signification de la différence entre les moyennes des échantillons a été calculée par le test de Student Newman Keuls ($p < 0,05$ a été considéré comme significatif et $p < 0,005$ comme très significatif).

Résultats et discussion

Chapitre 1. Etude comparative du contenu phytochimique de Ziziphus spina christi et de Ziziphus lotus du Maroc (Article 2)

Introduction

Les plantes ont une grande importance dans notre vie, car elles répondent à nos besoins fondamentaux en matière de nourriture, de vêtements, de combustible, de plantes ornementales, d'arômes et de médicaments. Récemment, plusieurs rapports scientifiques ont été publiés sur les bienfaits pour la santé et le potentiel nutritionnel des composés bioactifs issus des plantes. Avec l'augmentation de la consommation et de l'utilisation empirique du *jujubier* en médecine populaire, une attention particulière est requise pour l'analyse de ses valeurs nutritionnelles et de ses composés poly-phénoliques (Li, et al., 2008). Bien qu'il existe une production scientifique considérable sur l'importance et l'utilité du fruit et de la feuille du jujubier, il y a peu d'informations sur la composition chimique nutritionnelle et sur les métabolites secondaires des différentes parties du fruit (Halliwell, et al., 1985). Cette étude vise donc à étudier la composition chimique, la teneur totale en phénols, en flavonoïdes, en tanins et en anthocyanes dans les fruits entiers, les pulpes, les graines et les amandes de *Z. spina-christi* (L.) et *Z. lotus*. Une extraction séquentielle à six phases utilisant six solvants différents (eau distillé, méthanol, acétone, acétate d'éthyle, chloroforme et éther de pétrole) a été effectuée pour extraire totalement et efficacement les composants phytochimique des différentes parties des plantes.

Article 2.



Comparative study of phytochemical profile between *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus* from Morocco

Ezzouhra El Maaiden¹ · Youssef El Kharrassi² · Khadija Moustaid³ · Abdel Khalid Essamadi¹ · Boubker Nasser¹

Received: 6 May 2018 / Accepted: 30 August 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Ziziphus spina-christi and *Z. lotus* are very important medicinal plants of the family Rhamnaceae. The need for accurate identification and authentication of powdered crude drug samples in the face of growing world demand for herbal products cannot be over-emphasized. The aim of this study was to determine the content of essential nutrients and phytochemical compounds (total phenolics, flavonoids, tannins and anthocyanins) in the fruits, pulps, seeds and almonds of the two species of *Ziziphus* (*Z. spina-christi* and *Z. lotus*). Six-phase sequential extraction using six different solvents was done to totally and efficiently extract the phytochemical components from the different parts of the plants and then the filtrates were pooled together to produce the powders which were thereafter analyzed. The proximate composition showed that *Z. spina-christi* fruit and pulp had higher moisture content, while its almonds had higher lipid and crude protein contents (13.78 and 30.15% respectively), and seed had higher ash content (4.91%) as compared to those of *Z. lotus*. The highest carbohydrate content was observed in the fruit and pulp of *Z. lotus* (83%). The greatest levels of polyphenols and tannins were found in aqueous extract of the seeds and almonds of *Z. spina-christi*. Flavonoid and anthocyanins contents were found to be highest in methanolic extract of the seeds and almonds of *Z. lotus*. Results obtained in this study may be used for identification and authentication purposes, and in the development of a monograph for these medicinal plants.

Keywords *Ziziphus* · Species · Polyphenols · Carbohydrate · Lipids · Proteins

Introduction

Plants have great importance in our lives, fulfilling our basic needs for food, shelter, clothing, fuel, ornamentals, flavoring and medicine. Recently, there have been several scientific reports on the health benefits and nutritional potential of bioactive compounds from *Ziziphus*. The genus *Ziziphus*, belonging to the family Rhamnaceae [1, 2], is widespread in tropical and subtropical regions: Asia, Africa, North

America, South America, Oceania and Europe, with the center of diversity in Asia [2, 3]. Although there are about 170 species of *Ziziphus* worldwide, only two species *Z. spina-christi* and *Z. lotus* are found in Morocco [4–6].

The jujube tree, *Zizyphus lotus* (L.), is a thorny shrub, which forms tufts up to 2 m high [7, 8]. The distribution of *Z. lotus* (L.) extends over the entire north of the Maghreb; it is a species widely distributed in the arid regions of Morocco. The plant called sedra yields small fruits, the jujubes, which are named locally “n’beg” and are eaten fresh [9, 10]. *Z. lotus* is widely used in folk medicine for the treatment of various diseases such as bronchitis, diarrhea, abscess, gastrointestinal disturbance, liver problems, urinary infections, skin infections, insomnia and diabetes [11–13]. Several effects of the fruits of *Ziziphus* have been reported as an antiaging, antitumoral, anti-inflammatory, antiulcerogenic and antibacterial [14–16].

Ziziphus spina-christi is a tree, reaching a height of 20 m [17], commonly known as Christ’s thorn or Jerusalem thorn in English and sidr in Arabic. It is a tropical tree of Sudanese origin. Its fruits are different from those of *Z. lotus*, they

✉ Boubker Nasser
boubker.nasser@uhp.ac.ma

¹ Laboratory of Biochemistry and Neurosciences, Department of Biology, University Hassan I, BP 577, 26000 Serrat, Morocco

² AgroBioSciences Division, Mohammed VI Polytechnic University (UM6P), LOT 660-Hay Moulay Rachid, 43150 Ben Guérir, Morocco

³ Laboratory of Applied Chemistry and Environment, Department of Chemistry, University Hassan I, BP 577, 26000 Serrat, Morocco

are oval, although the fruits are similarly eaten fresh. Like *Z. lotus*, *Z. spina-christi* is also used in folk medicine in the management of pain and inflammatory-related problems [18–21]. In addition, it has been reported to be active against bacterial and fungal pathogens that are normally quite resistant to modern medications. Hence, it is being used for treatment of pulmonary ailments such as tuberculosis, cough, bronchitis, as well as for treatment of fever, dysentery and it promotes the healing of fresh wounds [22–26].

The seeds are sedative and are taken sometimes with buttermilk to halt nausea, vomiting and abdominal pains associated with pregnancy, while the fruit bark infusion is used traditionally in Africa as a remedy for stomach pain and other gastrointestinal tract ailments [27, 28]. In addition, its use in folk medicine as a demulcent, a stomachic, an astringent for toothaches and a mouthwash has been documented [29]. Pharmacological studies have demonstrated that *Z. spina-christi* possesses hypoglycemic, hypotensive, hepatoprotective, antioxidant, antidiarrheal, antitumor and immunostimulatory activities [30–36]. These biological activities could be attributed to the presence of secondary plant metabolites [37, 38].

With increasing consumption and empirical use of *Ziziphus* in folk medicine, considerable attention is required for analysis of its nutrients and polyphenolic compounds. Although a considerable amount of literature exists on the importance and usefulness of *Ziziphus* fruit, there is little information about the chemical composition and secondary metabolites of different parts of the fruit. Specifically, the

almond has received no research interest and as such are usually disposed in Morocco. This study therefore seeks to investigate the proximate chemical composition, phytochemical composition and the total phenolic, flavonoid, tannin and anthocyanin content in six extracts (aqueous, methanol, acetone, ethyl acetate, chloroform and petroleum ether) of fruits, pulps, seeds and almonds of *Z. spina-christi* (L.) and *Z. lotus*. This is with a view to providing new information that will promote their utilization potentials.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals used in the study were of analytical grade, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Loretz GmbH (Hilden, Germany).

Collection of plant materials

Ripened fruits of *Z. spina-christi* and *Z. lotus* were collected from field in November and December from Morocco (Settat and Khouribga cities). The plant material was identified by morphological and botanical traits (Fig. 1a, b).

The fruits were washed with tap water. The different parts of the fruits were separated, dried under shade (Fig. 1c), powdered in a heavy-duty grinder and packaged separately

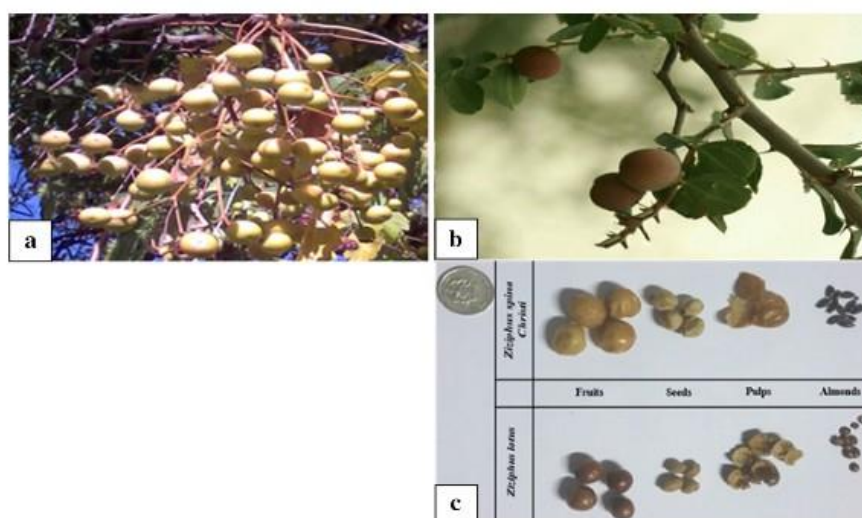


Fig. 1 Pictures of *Z. spina christi* and *Z. lotus* (a *Z. spina christi*; b *Z. lotus*; c fruit compartments of *Z. spina christi* and *Z. lotus*)

in airtight containers at room temperature (24 ± 4 °C) until required for use.

Preparation of extracts

The powders of fruits, pulps, seeds and almonds (100 g each), from *Z. spina-christi* and *Z. lotus*, were each extracted by maceration with 250 mL petroleum for 24 h at 4 °C with

occasional shaking. The extract was filtered through Whatman No. 1 filter paper (Whatman, England) and the marc was subsequently re-extracted by the same process with other solvents successively chloroform, acetone, ethyl acetate, ethanol and water until plant materials were exhausted (Fig. 2). The filtrate was collected and excess solvent was evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (Buchi, Switzerland) at a temperature not exceeding 45 °C,

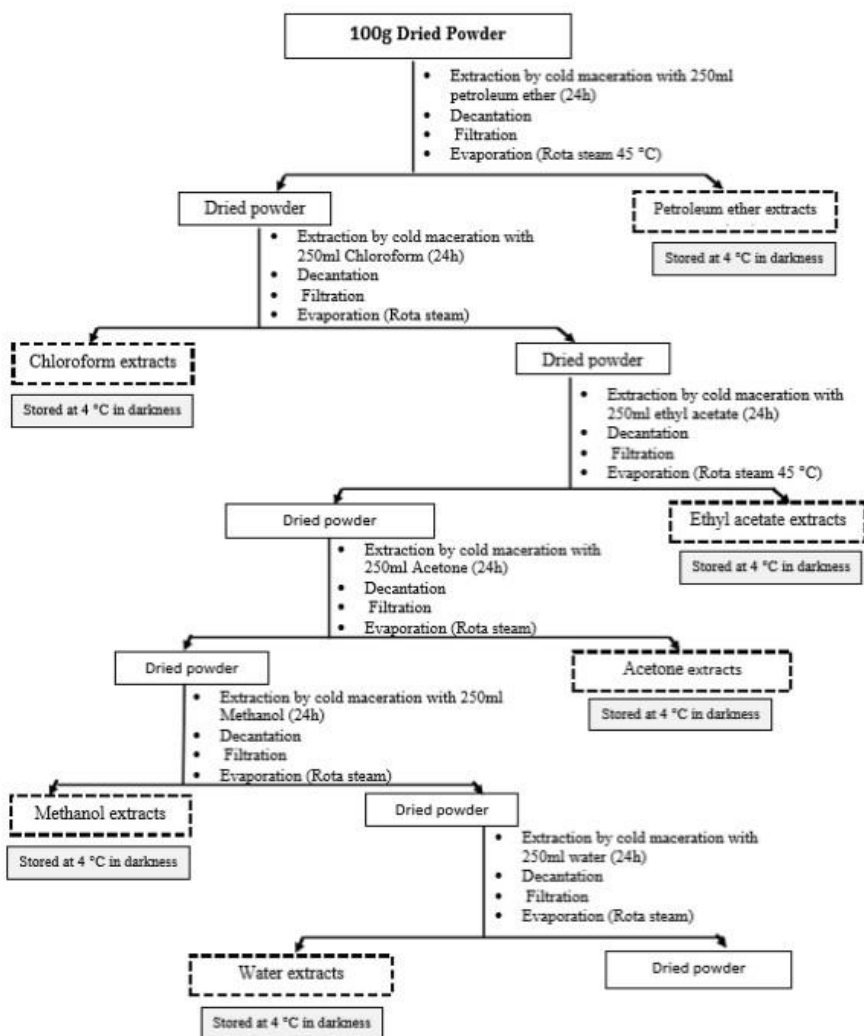


Fig. 2 Scheme of the general procedure applied to bioactive extracts preparation

extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) as stock solution and stored at 4 °C in darkness until use [39].

Determination of proximate composition

Proximate chemical analysis was carried out by using the methods described by the Association of Official Analytical Chemists [40]. The moisture content was determined by weighing after heating to 105 °C until weight stabilization occurred; the result obtained was expressed in relation to the mass of fresh material, while total ash content was obtained by heating 1 g of the sample in a muffle furnace at 550 °C for 24 h. Fat content was determined by solvent extraction using hexane at 45 °C for 8 h using Soxhlet apparatus. Crude protein content was determined according to the standard method of Kjeldahl. Carbohydrate content determined by difference [100 – (moisture content + crude protein + crude fat + total ash)].

Phytochemical screening

The powdered fruits, pulps, seeds and almonds of *Z. spina-christi* and *Z. lotus* were subjected to qualitative phytochemical analysis to determine the presence of various classes of active chemical constituents such as saponins, alkaloids, sterols, quinones, terpenes, steroids, using standard procedures [41–44]. The procedures for the different tests used to analyze the phytochemical composition of each botanical part are given in the Supplementary Information (Table 1).

Determination of total phenolic content

Total phenolic content of the various extracts was estimated by the Folin–Ciocalteu method according to [45]; 0.25 mL of Folin reagent (diluted ten times) was added to 0.25 mL of sample with appropriate dilutions and 2 mL of a solution of sodium carbonate (7.5%). The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min with intermittent shaking for color development. The absorbance of the resulting blue color was measured at 765 nm using a double-beam

UV–Vis spectrophotometer. Gallic acid was used as the standard.

Total phenolic content was calculated as the mean \pm SD ($n=3$; all samples were analyzed in triplicate) and expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dried weight (mg GAE/g DW).

Determination of total flavonoid content

Total flavonoid content was determined according to [46]; 0.5 mL of each extract to be analyzed was added to 1.5 mL of methanol (95%), 0.1 mL of aluminum chloride (10%), 0.1 mL of sodium acetate and 2.8 mL of distilled water. After stirring the mixture, it was incubated in the dark at room temperature for 30 min. Absorbance was measured at 415 nm. Quercetin was used as the standard.

Total flavonoid content was calculated as the mean \pm SD ($n=3$; all samples were analyzed in triplicate) and expressed in milligrams of quercetin equivalent per gram of dried weight (mg QE/g DW).

Determination of condensed tannin content

The content of condensed tannins (proanthocyanidins) was determined according to the Folin–Denis method [47]; 1 mL of extract was made up to 7.5 mL with distilled water. Then, 0.5 mL Folin–Denis reagent and 1 mL sodium carbonate solution were added. The volume was made up to 10 mL with distilled water, and absorbance was measured at 700 nm. Tannic acid was used as the standard.

The total tannin content was calculated as the mean \pm SD ($n=3$; all samples were analyzed in triplicate) and expressed as milligrams of tannic acid equivalent per gram of dried weight (mg TAE/g DW).

Determination of total anthocyanin content

Total anthocyanin content of the extracts was estimated by the differential pH method using two buffer systems: two dilutions of the same sample were prepared using

Table 1 Preliminary qualitative phytochemical composition of fruit, pulp, seed, almond of *Z. spina christi* and *Z. lotus*

Phytochemicals	Name of test	<i>Z. Spina christi</i>				<i>Z. lotus</i>			
		Fruit	Pulp	Seed	Almond	Fruit	Pulp	Seed	Almond
Alkaloids	Hager's, Meyer's and Wagner's test	++	+++	–	–	++	++	+	+
Saponins	Frothing test-proteins and amino acids ninhydrin test	+	+	++	++	+	++	++	++
Sterols and terpenes	Burchard	+	++	++	++	++	++	++	++
Quinones	Quinon	+	–	+	++	+	+	–	++
Steroids	Salkowski	+	–	+	++	+	–	+	++

+++; highly present, ++: moderately present, +: minimally present, –: absent

0.025 mol/L potassium chloride solution and 0.4 mol/L sodium acetate solution adjusted to pH 1.0 and 4.5 with hydrochloric acid respectively [48]. 0.250 mL of the extract was mixed with 2 mL of the buffer, and the absorbance was read from white at 510 nm and 700 nm 15 s later. Total anthocyanin content (mg/g) was expressed as cyanidin-3-glucoside according to the following equation:

$$\text{Anthocyanin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{\left[A \times FD \times \left(\frac{V}{P} \right) \times 100 \right]}{\epsilon \times L}$$

where A is the absorbance:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

and M is the mass of the sample (mg); L is the cell path length (1 cm); PM is the molecular weight of cyanidin-3-glucoside (449.2 g/mol); V is the final volume of the extract (mL); FD is the dilution factor; and ϵ is the molar absorbance coefficient of cyanidin-3-glucoside (26,900/M/cm).

The anthocyanin compound content was calculated as the mean \pm SD (n = 3; all samples were analyzed in triplicate) and expressed in milligrams per gram of dried weight (mg/g DW).

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm SD of three replicates, using the program SPSS version 21 for Windows (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For each analysis and botanical part, the differences of the results between the two species were compared using the Student–Newman–Keuls test.

Results and discussion

The proximate composition of sidr (*Z. spina-christi* and *Z. lotus*) fruits, pulps, seeds and almonds is presented in Table 2. The results indicated the presence of heterogeneous sources of nutrients and energy from different parts of the fruit of these two edible wild plants. The moisture content

was highest (14.23%) in the pulp of *Z. spina christi* and was lowest (3.13 and 3.94% respectively) in almond and seed of *Z. lotus*, although several authors have reported lower values in the seed of *Z. lotus* [49–51]. The relatively low moisture content indicates that seeds, almonds and flours prepared from them will have excellent keeping quality, hard consistency and longer shelf life. Low moisture decreases the probability of microbial growth, unwanted fermentation, premature seed germination and many undesirable biochemical changes normally associated with these processes [52]. The almonds of *Z. spina-christi* show higher lipid content (13.78%) followed by almond of *Z. lotus* (8.71%) and was lowest in pulp of *Z. lotus* and *Z. spina christi* (0.86 and 0.96% respectively). That is closely similar to those reported for pulp of *Z. spina christi* and *Z. lotus* [49, 53]. Although no previous studies have been reported on the almonds, crude protein ranged from 30.15% in *Z. spina christi* almonds to 2.64% in *Z. lotus* pulps. The high protein content of the almonds of *Z. spina-christi* qualifies them for use as feed or food stocks for animals. Amino acids from protein will serve as precursors for repair and replacement of worn-out tissues via protein synthesis [54]. *Z. spina-christi* fruit (5.13%) and seeds (4.91%) had the highest total ash content and these values are in agreement with previous studies [55, 56]. Ash content is indicative of mineral content and this ratio means that they are either deficient or moderately adequate [57]. A considerable amount of carbohydrates was observed in different parts of the two species. The high carbohydrate content in the fruits and pulps (83 and 83.01% respectively) suggests that flours from them may be good sources of energy and may be important as industrial raw materials for feedstock formulation [58–61].

Phytochemical screening

Phytochemical screening of different parts of the fruit of *Z. spina-christi* and *Z. lotus* L. revealed the presence of polyphenols such as saponins, sterols and terpenes. Previous studies have reported similarly the presence of these phytochemicals in species of *Ziziphus* [49, 62, 63]. However, alkaloids were not detected in the seeds and almonds of *Z.*

Table 2 Proximate chemical composition of dried fruit, pulp, seed and almond of *Z. spina christi* and *Z. lotus*

Component (%)	<i>Z. spina christi</i>				<i>Z. lotus</i>			
	Fruit	Pulp	Seed	Almond	Fruit	Pulp	Seed	Almond
Moisture	13.96 \pm 0.221 ^{abc}	14.23 \pm 0.174 ^{abc}	4.88 \pm 0.113 ^{abc}	6.14 \pm 0.162 ^{abc}	8.93 \pm 0.252 ^{abc}	10.86 \pm 0.107 ^{abc}	3.94 \pm 0.119 ^{abc}	3.13 \pm 0.230 ^{abc}
Lipid	1.08 \pm 0.115	0.96 \pm 0.196	6.58 \pm 0.176 ^{ab}	13.78 \pm 0.288 ^{abc}	1.11 \pm 0.170	0.86 \pm 0.108	5.78 \pm 0.203 ^{ab}	8.71 \pm 0.247 ^{abc}
Protein	5.99 \pm 0.295 ^b	5.59 \pm 0.108 ^{abc}	26.34 \pm 0.130 ^{abc}	30.15 \pm 0.102 ^{abc}	3.69 \pm 0.1 ^{ab}	2.64 \pm 0.118 ^{abc}	14.03 \pm 0.270 ^{abc}	16.43 \pm 0.104 ^{abc}
Ash	5.13 \pm 0.202 ^{abc}	2.75 \pm 0.229	4.91 \pm 0.225 ^{abc}	0.175 \pm 0.176 ^a	3.26 \pm 0.225 ^{abc}	2.64 \pm 0.278	1.21 \pm 0.257 ^{abc}	2.40 \pm 0.180 ^a
Carbohydrate	73.84 \pm 0.070 ^{abc}	76.47 \pm 0.252 ^{abc}	57.29 \pm 0.234 ^{abc}	49.75 \pm 0.290 ^{abc}	83.01 \pm 0.259 ^{abc}	83 \pm 0.415 ^{abc}	74.91 \pm 0.491 ^{abc}	69.33 \pm 0.116 ^{abc}

Results expressed as mean \pm standard deviation (n = 3). Different letters on the same row mean significant difference (P < 0.05; *) by Student–Newman–Keuls test between the same botanical part for each parameter

spina-christi, while quinines and steroids were absent in the seeds and pulp of *Z. lotus* respectively (Table 1). These are in agreement with findings from previous research [39, 64, 65]. As compared to other parts of the fruit of both species, almonds had the highest number of secondary metabolites with a high degree of precipitation (+). These classes of compounds have been reported to have curative activity against several pathogens, thus explaining their use as traditional medicine for the treatment of various illnesses and pharmacological activity including antioxidant, antiproliferative and antidiabetic activity [6, 66–68].

Phenolic content

Results obtained showed that the content of total polyphenols differed from one species to another, from one part to another and from one extract to another. Total phenolic content of the different extracts varied as a result of solvent used and its polarity, which has been reported to play a key role in increasing phenolic solubility (Fig. 3a).

The highest phenolic value was seen in aqueous extract of the seeds of *Z. spina-christi* (39.74 mg GAE/g DW), and

the lowest value (0.23 mg GAE/g DW) in chloroform extract of the almonds of *Z. lotus* (Table 3). The present results are consistent with earlier findings [39, 69–74].

Phenolic compounds in plants play a key role as primary antioxidants or free radical scavengers and their antioxidative activity is mainly due to their redox properties, which can play an important role in absorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen and decomposing peroxides [75, 76]. The bioactivity of phenolics is also related to their ability to chelate metals, inhibit lipoxygenase and scavenge free radicals [77, 78]. It has also been proposed that polyphenolic compounds provide anti-mutagenic and anticarcinogenic properties in humans, when ~ 1.0 g is consumed daily from a diet rich in vegetables and fruits [79].

Total flavonoid content

Flavonoids are a widely distributed group of phenolic compounds in fruits and vegetables, which are characterized by a benzo- γ -pyrone structure [80].

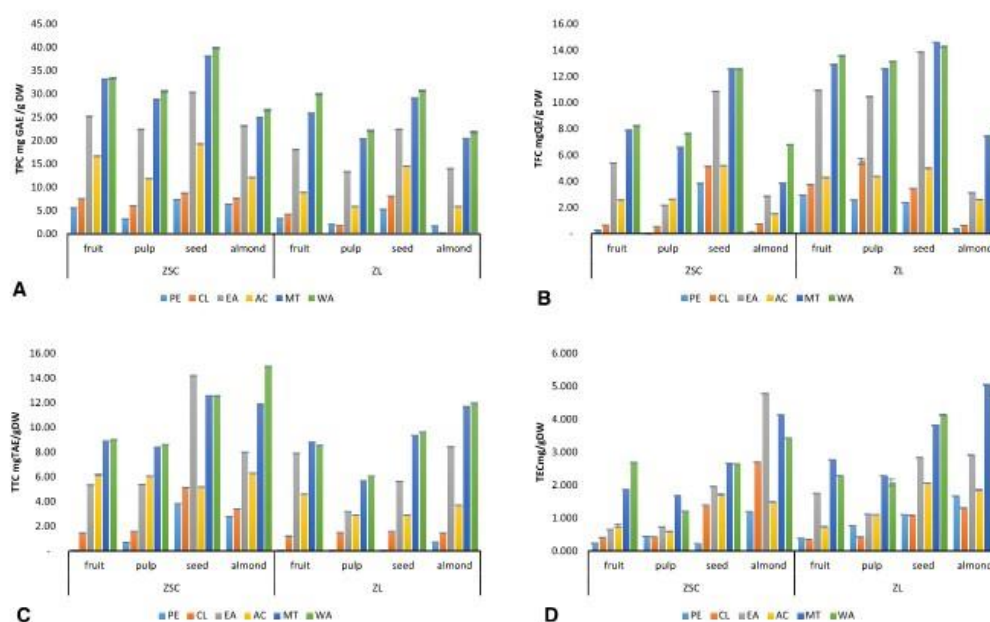


Fig. 3 Contents of major bioactive compounds including: total phenolic content expressed as mg GAE (gallic acid equivalent)/g of dry weight (a), total flavonoid content expressed as mg QE (quercetin equivalent)/g of dry weight (b), total condensed tannin content expressed as mg TAE (tannic acid equivalent)/g of dry weight (c),

total anthocyanin content expressed as mg/g of dry weight (d) in the various parts of *Z. lotus* and *Z. spina-christi*. Reagents (PE petroleum ether, CL chloroform, EA ethyl acetate, AC acetone, ME methanol, WA water)

Table 3 Table summarizing the highest and lowest values for each secondary metabolite, the parts of the fruits and species, which had these values, and the solvent, which gave the most/least efficient extraction

SM	Values	Solvent	Parts of the fruits	Species
TPC ¹	HV 39.74 ± 0.014	Water	Seed	<i>Z. spina christi</i>
	LV 0.23 ± 0.003	Chloroform	Almond	<i>Z. lotus</i>
TFC ²	HV 14.58 ± 0.006	Methanol	Seed	<i>Z. lotus</i>
	LV 0.02 ± 0.009	Petroleum ether	Pulp	<i>Z. spina christi</i>
TTC ³	HV 14.93 ± 0.002	Water	Almond	<i>Z. spina christi</i>
	LV 0.002 ± 0.002	Petroleum ether	Fruit	<i>Z. lotus</i>
TAC ⁴	HV 5.03 ± 0.022	Methanol	Almond	<i>Z. lotus</i>
	LV 0.21 ± 0.004	Petroleum ether	Seed	<i>Z. spina christi</i>

SM Secondary metabolites, HV highest value, LV lowest value, TAC total anthocyanin content expressed as mg/g of dry weight

TPC¹: total phenolic content expressed as mg GAE (gallic acid equivalent)/g of dry weight

TFC²: total flavonoid content expressed as mg QE (quercetin equivalent)/g of dry weight

TTC³: total condensed tannin content expressed as mg TAE (tannic acid equivalent)/g of dry weight

In the present study, the total flavonoid content was found to be higher in the methanolic extract (Fig. 3b), with the highest content of total flavonoids being found in the seeds as compared to the fruits and pulps. In terms of different species, flavonoid content was higher in *Z. lotus*, hence aqueous extract of the seeds of *Z. lotus* had the highest values (14.58 mg QE/g of DW), while petroleum ether extract of the pulp of *Z. spina-christi* had the lowest value of 0.02 mg QE/g of DW (Table 3).

In several studies, various levels of flavonoid content in *Ziziphus* have been reported [71, 81, 82]. Flavonoids present in herbs have been demonstrated to be important for human health due to their pharmacological activity as antioxidants and radical scavengers, which are particularly effective scavengers of most oxidizing molecules, including singlet oxygen and various free radicals [83–85].

Condensed tannin content

Results of the present study show that total condensed tannin content was highest in the aqueous extract (14.93 mg TAE/g of DW) and lowest in petroleum ether extract (Table 3). In terms of the different parts of fruits, the almonds had higher

value as compared to other tissues, while species-wise, tannin content was higher in *Z. spina-christi* than in *Z. lotus* (Fig. 3c).

Condensed tannins are plant-derived polyphenolic compounds, which have astringent properties and hasten the healing of wounds and inflamed mucous membrane [86, 87]. The tannin in the seeds and almonds of *Z. spina-christi* support the use of the plant for treating wounds, various ulcers, hemorrhoids, frost bite and burns in herbal medicine because of the antibacterial effects of tannins [88], and for treating an inflamed throat and mouth and as a veterinary intestinal astringent [89].

Total anthocyanin content

Anthocyanins have an antioxidant role in plants against reactive oxygen species caused by abiotic stresses, such as overexposure to ultraviolet light [90].

Table 3 shows that the higher anthocyanin content was obtained for methanolic extract. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the different parts of *Ziziphus* fruit of the two species (Fig. 3d). Higher amounts of anthocyanins were seen in the almonds of *Z. lotus* (5.03 mg/g DW) while petroleum ether extract of the seed of *Z. spina-christi* had the lowest value of 0.21 mg/g of DW (Table 3).

Anthocyanins are a relatively small group of pigments extracted from some Congolese plants used in traditional medicine against sickle cell disease and have recently been shown to have anti-sickling activity in vitro [91, 92].

Conclusions

The awareness of the use of local plants as traditional medicine for treatment of diseases has continued to increase due to the negative side effects of synthetic drugs. Although *Z. spina-christi* and *Z. lotus* have been in use for many years as folk medicine in Morocco, there is still a draught of information on their nutrient and phytochemical composition. The present study has shown that the fruit, pulp, seeds and almonds of two species of *Ziziphus* (*Z. spina-christi* and *Z. lotus*), are sources of important phytochemicals and phytonutrients, which are in accordance with their use in ethnomedicine. The high carbohydrate content in the fruits and pulps suggests that their flours could be a good source of energy in feed formulation. Given their unique and very rich chemical composition and high nutritional value, seeds of *Z. spina-christi* could be an important component of the daily diet. However, the content of biologically active substances, and high levels of polyphenols (phenolics, tannins, anthocyanins) obtained with aqueous and methanolic extracts, which have been regarded as inessential, or even anti-nutritional could promote the seeds to be used as

functional, health-enhancing foodstuffs, particularly for prevention of diabetes and obesity, which determine the quality of life for millions of people worldwide. In this aspect, *Z. spina-christi* seeds, which have so far been used mainly as animal feed and are currently, gaining importance as a nutraceutical component, should be given special attention. Given the importance of these results, several perspectives can be considered in the study of the antioxidant activity of different extracts from *Z. spina-christi* and *Z. lotus*, thus assessing their protective effect on cytotoxicity and inflammation *in vivo* and *in vitro*.

References

1. A. Hosane, H. Abul, K. Mahbuba, Taxonomic study of the genus *Ziziphus* mill. (Rhamnaceae). *Bangladesh J. Plant Taxon.* **15**(1), 47–61 (2008)
2. N. Rsaissi, M. Bouhache, La lutte chimique contre le jujubier. Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed), N 0 94, Rabat (2002)
3. M. Adeli, V. Samavati, Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Ziziphus lotus* fruit. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 580–587 (2015)
4. J.E. Richardson, L.W. Chatrou, J.B. Mols, R.H.J. Erkens, M.D. Pirie, Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Philos. Trans. R. Soc. B* **359**, 1495–1508 (2004)
5. M. Maraghni, M. Gorai, M. Neffati, Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Ziziphus lotus*. *S. Afr. J. Bot.* **7**, 453–459 (2010)
6. C. Benammar, A. Hichami, A. Yessoufou, A.M. Simonin, M. Belarbi, H. Allali, N.A. Khan, *Ziziphus lotus* L. (Desf.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation. *BMC Complement. Altern. Med.* **10**(54), 1–9 (2010)
7. M. Amara, K.A. Benabdeli, Geobotanical and phenological study of *Ziziphus lotus* in the Naama region (South-Western of Algeria). *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* **7**(11), 1–8 (2017)
8. R. Claudine, Le nom de l'arbre: le gnenadier, le caroubier, le jujubier, le pistachier et l'arbusier. *Actes sud le Majan*, 1er Edition. France. pp. 45–62 (2007)
9. W. Borgi, A. Bouraoui, N. Chouchane, Antitumor activity of *Ziziphus lotus* (L.) extracts. *J. Ethnopharmacol.* **12**, 228–231 (2007)
10. M. Abdeddaim, O. Lombarkia, A. Bacha, D. Fahloul, D.I. Abdeddaim, R. Farhat, M. Saadoudi, Y. Noui, A. Lekbir, Biochemical characterization and nutritional properties of *Ziziphus lotus* L. fruits in Aures region, Northeastern of Algeria. *Ann. Food Sci. Technol.* **15**, 75–81 (2014)
11. B. Adzu, S. Amos, M.B. Amizan, K. Gamaniel, Evaluation of the anti-diarrhoeal effects of *Ziziphus spina-christi* stem bark in rats. *Acta Tropica* **87**(2), 245–250 (2003)
12. J. Lunn, H.E. Theobald, The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr. Bull.* **31**, 178–224 (2006)
13. J. Zhao, S.P. Li, F.Q. Yang, P. Li, Y.T. Wang, Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujube* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. *J. Chromatogr. A* **1108**, 188–194 (2006)
14. W. Borgi, M.C. Recio, J.L. Rios, N. Chouchane, Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Ziziphus lotus* (L.) Lam. *S. Afr. J. Bot.* **14**, 320–324 (2008)
15. M. Lahlou, M. El Mahi, J. Hamamouchi, Evaluation des activités antifongiques et molluscide de *Ziziphus lotus* (L.) Desf. du Maroc. *J. Ann. Pharm. Fr.* **60**, 410–414 (2002)
16. B. Mahboba, O. Rabia, A.N. Abil, Y. Asma, Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* **3**, 79–84 (2010)
17. A. Zargari, *Medicinal Plants*, vol. 2 (Tehran University Press, Tehran, 1988) pp. 42
18. J. Asgarpanah, J. Haghghat, Phytochemistry and pharmacologic properties of *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **6**(31), 2332–2339 (2012)
19. B. Adzu, S. Amos, C. Wambebe, K. Gamaniel, Antinociceptive activity of *Ziziphus spina-christi* root bark extract. *Fitoterapia* **72**(4), 344–350 (2001)
20. K. Kadioglu, J. Onat, B.T. Stefan, N. Stefan, S. Janine, K. Mohamed, M. Hassan, T. Irmgard, P. Eckhardt, E. Tanja, Evaluating ancient Egyptian prescriptions today: anti-inflammatory activity of *Ziziphus spina-christi*. *Phytomedicine* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.01.004>
21. M. Dkhil, S. Al-Quraishy, M. Abdel, *Ziziphus spina-christi* leaf extract pretreatment inhibits liver and spleen injury in a mouse model of sepsis via antioxidant and anti-inflammatory effects. *Inflammopharmacology* (2018). <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0439-8>
22. M.E. Abalaka, S.Y. Daniyan, A. Mann, Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spina-christi* L.) on some microbial pathogens. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **4**(4), 135–139 (2010)
23. M. EL-Hefny, S. Mamoun, M. El-Kareem, M. Ali, Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial activity against some potato bacterial pathogens of fruit extracts from *Phytolacca dioica* and *Ziziphus spina-christi* grown in Egypt. *Sci. Hort.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.046>
24. H.H. El-Kamali, S.A. Mahjoub, Antibacterial activity of *Francoeuria crista*, *Pulicaria undulata*, *Ziziphus spina-christi* and *Cucurbita pepo* against seven standard pathogenic bacteria. *Ethnobot. Leaflet* **13**, 722–733 (2009)
25. N. Essam, R. Saravanan, L. Syed, M. Sherif, R. Jamal, Phytochemical, antimicrobial and cytotoxic evaluation of *Ziziphus spina-christi* (L.) stem bark. *Biomed. Res.* **28**(15), 6646–6653 (2017)
26. G.M. Tom, H.B. Yesufu, F.I. Abdulrahman, Antimicrobial screening and effect of the pulp extracts of *Ziziphus spina-christi* (Linnaeus Desf) on some biochemical parameters in rats. *J. Pharm. Bioresour.* **6**(2), 58–64 (2009)
27. B. Adzu, S. Amos, C. Wambebe, K. Gamaniel, Antinociceptive activity of *Ziziphus spina-christi* root bark extract. *Fitoterapia* **72**, 334–350 (2001)
28. A.A. Shahat, L. Pieters, S. Apers, N.M. Nazeif, N.S. Abdel-Aziz, D.W. Bergh, Chemical and biological investigations on *Ziziphus spina-christi* L. *Phytother. Res.* **15**(7), 593–597 (2001)
29. A.O. Ghafoor, H.K. Qadir, N.A. Fakhri, Analysis of phenolic compounds in extracts of *Ziziphus spina-christi* using RPHPLC method. *J. Chem. Pharm. Res.* **4**(6), 3158–3163 (2012)
30. M.E. Abalaka, A. Mann, S.O. Adeyemo, Studies on in-vitro antioxidant and free radical scavenging potential and phytochemical screening of leaves of *Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spina-christi* L. compared with ascorbic acid. *J. Med. Genet. Genom.* **3**(2), 28–34 (2011)
31. A.O. Abdel-Zaher, S.Y. Salim, M.H. Assaf, R.H. Abdel-Hady, Antidiabetic activity and toxicity of *Ziziphus spina-christi* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **101**(1–3), 129–138 (2005)

32. B. Adzu, S. Amos, C. Wambebe, K. Gamaniel, Antinociceptive activity of *Zizyphus spina christi* root bark extract. *Fitoterapia* **72**, 334–350 (2001)
33. B. Adzu, S. Amos, M. Amizan, K. Gamaniel, Evaluation of the anti-diarrhoeal effects of *Zizyphus spina christi* stem bark in rats. *Acta Trop.* **87**(2), 245–250 (2003)
34. B. Adzu, A.K. Haruna, M. Ilyas, U.U. Pateh, F.D. Tarfa, B.A. Chindo, K.S. Gamaniel, Structural characterization of ZS–2A: an antiplasmodial compound isolated from *Zizyphus spina christi* root bark. *J. Pharm. Nutr. Sci.* **1**, 48–53 (2011)
35. H.M. Hussein, E.M. El-Sayed, A.A. Said, Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Zizyphus spina christi* and *Zizyphus jujube* in alloxan diabetic rats. *Int. J. Pharmacol.* **2**(5), 563–570 (2006)
36. A.M. Waggas, R.H. Al-Hasani, Neurophysiological study on possible protective and therapeutic effects of Sidr (*Zizyphus spina christi* L.) leaf extract in male albino rats treated with pentylenetetrazol. *Saudi J. Biol. Sci.* **5**(3), 1–6 (2010)
37. H.E. Youssef, A.A. Khedr, M.Z. Mahran, Hepatoprotective activity and antioxidant effects of El Nabka (*Zizyphus spina christi*) fruits on rat's hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride. *Nat. Sci.* **9**(2), 1–7 (2011)
38. M. Tripathi, M.B. Pandey, R.N. Jha, V.B. Pandey, P.N. Tripathi, J.P. Singh, Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus jujube*. *Fitoterapia* **72**(5), 507–510 (2001)
39. F. Alhakmani, S. Alam Khan, A.F. Ahmad, Determination of total phenol, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of *Zizyphus spina christi* grown in Oman. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (2014). <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0273>
40. AOCS, in *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, 4th edn. ed. by AOCS (AOCS, Champaign, 2006) (Official Method, Cd. 3–25 reapproved)
41. Y. Békro, J. Békro, B. Boua, H. Tra, E. Ehilé, Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat.* **4**, 217–225 (2006)
42. D. Chothani, N. Patel, Preliminary phytochemical screening, pharmacognostic and physicochemical evaluation of leaf of *Gmelina arborea*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**(Suppl 3), S1333–S1337 (2012)
43. E.J. Cho, T. Yokozawa, D.Y. Rhyu, Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine* **10**(6–7), 544–551 (2003)
44. N. Motohashi, H. Wakabayashi, T. Kurihara, Biological activity of Brabados cherry (acerola fruits, fruits of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. *Phytother. Res.* **18**, 212–223 (2012)
45. E. Osorio-Esquivel, O. Alicia, V.B. Álvarez, L. Dorantes-Álvarez, M.M. Giusti, Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Res. Int.* **44**, 2160–2168 (2011)
46. C. Chang, M. Yang, H. Wen, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **10**, 178182 (2002)
47. T.C. Dinis, V.M. Madeira, L.M. Almeida, Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 161–169 (1994)
48. M.M. Giusti, R.E. Wrolstad, *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (Wiley, New York, 2001)
49. I. Amoo, O. Jokotagba, Comparative analysis of proximate, minerals and functional properties of *Tamarindus indica* pulp and *Zizyphus spina christi* fruit and seed. *Greener J. Agric. Sci.* **2**(1), 21–25 (2012)
50. A. Magdi, A. Mohammed, Chemical and proximate composition of (*Zizyphus spina christi*) nabag fruit. *Nutr. Food Sci.* **39**, 70–75 (2009)
51. A. Onilud, O. Igbinadolor, S. Wakil, Effect of varying relative humidity on the rancidity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernel oil by lipolytic organisms. *Afr. J. Biotechnol.* **9**(31), 4890–4896 (2010)
52. K. Agnieszka, G. Krzysztof, *Criteria of Determination of Safe Grain Storage Time—A Review* (InTech, Rijeka, 2013)
53. B. Soussen, H. Leila, Z. Sara, B. Houada, Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous exploitées en Algérie: *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Zizyphus lotus* L. *Fruits (Paris)* **65**, 75–84 (2010)
54. M. Montiel, S. Campista, L. Camacho, A. Rios, F. Delgado, Physicochemical and nutritional characteristics of fruits of *Zizyphus sonorensis* Wats (Rhamnaceae). *Int. J. Food Sci. Nutr.* **56**(8), 587–596 (2005)
55. A.M.A. Abdalla, H. Baballa Gasmalla Elzebeir, Variation of physicochemical characteristics of *Zizyphus spina christi* fruits from three geographical sites in Sudan. in *Proceeding of the 5th Annual Conference of Postgraduate Studies and Scientific Research*, Khartoum, Sudan, 2014. https://www.researchgate.net/publication/272351439_Variation_of_Physicochemical_Characteristics_of_Zizyphus_spina-christi_Fruits_from_Three_Geographical_Sites_in_Sudan
56. A. Jokotagba, F. Azim, A. Nour, R. A-Halim, A chemical study of *Zizyphus spina christi* (Nabag) fruit grown in Sudan. *Trop. Sci.* **27**, 271–273 (1987)
57. S.M. Saw, F.J. Nieto, J. Katz, S.J. Chew, Family risk scores and the relationship with myopia progression in Singapore children. Paper read at the VII International Myopia Conference, Taiwan. (1998)
58. M. Chouaibi, N. Mahfoudhi, L. Rezig, F. Donsi, G. Ferrari, S. Hamdi, Nutritional composition of *Zizyphus lotus* L. seeds. *J. Sci. Food Agric.* **92**(6), 1171–1177 (2012)
59. P. Reinald, Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Bioenerg.* **1777**(10), 1249–1262 (2008)
60. M. Abdeddaim, O. Lombarkia, A. Bacha, D. Fahloul, D. Abdeddaim, R. Farhat, M. Saadoudi, Y. Noui, A. Lekbir, Biochemical characterization and nutritional properties of *Zizyphus lotus* L. fruits in Aures region, Northeastern of Algeria. *Ann. Food Sci. Technol.* **15**, 75–81 (2014)
61. M. Saadoudi, L. Hambaba, M. Abdeddaim, A. Lekbir, A. Bacha, S. Boudraa, S. Zidani, Nutritional composition, physical properties and sensory evaluation of biscuit produced from jujubes (fruits of *Zizyphus lotus* L.). *Ann. Food Sci. Technol.* **18**(3) (2017). http://afst.valahia.ro/images/documente/2017/issue3/I.8_Saadoudi.pdf
62. C. Catoire, H. Zwang, C. Bouet, Les jujubiers ou le Zizyphus, Fruits oubliés n° 1 (1999)
63. A. El-Khateeb, E. Elsherbiny, L. Tadros, S. Ali, H. Hamed, Phytochemical analysis and antifungal activity of fruit leaves extracts on the mycelial growth of fungal plant pathogens. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **4**, 199 (2013)
64. A. Maciuk, C. Lavaud, P. Thépenier, M. Jacquier, K. Ghédira, M. Zèches-Hanrot, Four new dammarane saponins from *Zizyphus lotus*. *J. Nat. Prod.* **67**(10), 1639–1643 (2004)
65. M. Hassan, A. Oyewale, J. Amupitan, M. Abdullahi, E. Okonkwo, Preliminary phytochemical and antibacterial investigation of crude extracts of the root bark of *Detarium microcarpum*. *J. Chem. Soc. Nigeria* **29**(1), 26–29 (2004)
66. M. Ghalem, S. Merghache, M. Belarbi, Study on the antioxidant activities of root extracts of *Zizyphus lotus* from the western region of Algeria. *Pharmacogn. J.* **6**(4), 32–42 (2014)

67. J. Renault, K. Ghedira, P. Thepenier, C. Lavaud, M. Zeches-Hanrot, Dammarane saponins from *Zizyphus lotus*. *Phytochemistry* **44**(7), 1321–1327 (1997)
68. C. Rice-Evans, Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radic. Biol. Med.* **36**(7), 827–828 (2004)
69. A.M. Pawlowska, F. Camangi, A. Bader, A. Braca, Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chem.* **112**(4), 858–862 (2008)
70. M. Nawwar, M.S. Ishak, H.N. Michael, J. Buddrust, Leaf flavonoids of *Zizyphus spina-christi*. *Phytochemistry*. **23**(9), 2110–2111 (1983)
71. M. Naczk, F. Shahidi, Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523–1542 (2006)
72. E. Tan, A. Aminah, H. Khalid, M. Maskat, M. Ghani, Antioxidant properties of three banana cultivars (*Musa acuminata* 'Berangan', 'Mas' and 'Raja') extracts. *Sains Malays.* **41**, 319–324 (2012)
73. M. Alotman, A. Rajeev, A. Karim, Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.* **115**, 785–788 (2009)
74. S. Jassabi, M. Abdullah, Extraction, purification and characterization of antioxidant fractions from *Zizyphus spina-christi* fruits. *Am.-Eur. J. Toxicol. Sci.* **5**(3), 66–71 (2013)
75. S. Himesh, S. Sarvesh, P. Sharan, A. Singhai, Preliminary phytochemical screening and HPLC analysis of flavonoid from methanolic extract of leaves of *Annona squamosa*. *Int. Res. J. Pharm.* **2**(5), 242–246 (2011)
76. R. Abraham, N. Carty, D. DuFour, M. Pincus, Clinical enzymology, in *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21 edn., Chap. 20, ed. by R. McPherson, M. Pincus (Sunders Elsevier, Philadelphia, 2006)
77. S. Lin, D. Traver, H. Zhu, K. Dooley, B. Paw, R.L. Zon, Analysis of Thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* **106**, 3803–3810 (2005)
78. U. Mallavadhani, A. Sudhakar, K. Sathyanarayana, A. Mahapatra, A. Li, B. Richard, Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chem.* **95**, 58–64 (2006)
79. M. Tanaka, C. Kuie, Y. Nagashima, T. Taguchi, Applications of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**, 1409–1414 (1998)
80. G. Cheng, Y. Bai, Y. Zhao, J. Tao, Y. Liu, G. Tu, L. Ma, N. Liao, X. Xu, Flavonoids from *Zizyphus jujube* Mill var. *spinosa*. *Tetrahedron* **56**, 8915–8920 (2000)
81. J. Jiang, X. Huang, J. Chen, Q. Lin, Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen *Zizyphus jujube*. *Nat. Prod. Res.* **21**, 310–320 (2007)
82. A. Pawlowska, F. Camangi, A. Bader, A. Braca, Flavonoids of *Zizyphus jujube* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chem.* **112**, 858–862 (2009)
83. A. Schubert, D. Pereira, F. Zanin, S. Alves, R. Beck, M. Athayde, Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharm. Sci.* **62**, 876–880 (2007)
84. N. Turkmen, F. Sari, Y. Velioglu, Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem.* **99**, 835–841 (2006)
85. M. Hertog, E. Feskens, D. Kromhout, P. Hollman, K. Katan, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* **342**, 1007–1011 (1993)
86. H. Mehansho, L. Butler, D. Carlson, Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* **7**, 423–440 (1987)
87. W.C. Eric, S.Y. Eu, T.P. Pei, P. Yon, Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacogn. Res.* **3**(4), 266–267 (2011)
88. A. Akinwumi, J. Faleye, Phytochemical quantification and in vitro antioxidant activity of the leaves, stem-bark and root of *Nauclea latifolia* Smith. *FUW Trends Sci. Technol. J.* **2**(2):960–996 (2017)
89. A. Stapleton, Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* **4**(11), 1353–1358 (1992)
90. P.T. Mpiana, K.N.N. Ngbolua, M.T. Bokota, T.K. Kasonga, E.K. Atibu, D.S. Tshibangu, V. Mudogo, In vitro effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfus.* **8**(4), 248–254 (2010)
91. P. Mpiana, V. Mudogo, D.S.T. Tshibangu, E. Kitwa, A. Kanangila, J. Lumbu, K. Ngbolua, E. Atibu, M. Kakule, Antisickling activity of anthocyanins from *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* and *Zizyphus mucronata*: photodegradation effect. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 413–418 (2008)
92. P. Mpiana, V. Mudogo, D.T.S. Tshibangu, E. Kitwa, A. Kanangila, J. Lumbu, K. Ngbolua, E. Atibu, M. Kakule, Activité antifalcémiant et thermodégradation d'une fraction d'anthocyanes extraits de *Zizyphus mucronata*. *Ann. Afr. Méd.* **2**, 91–97 (2009)

Discussion

Les résultats de la composition chimique du jujubier (*Z. spina-christi* et *Z. lotus*) indiquent la présence de sources hétérogènes de nutriments et d'énergie provenant des différentes parties du fruit de ces deux plantes. La teneur en humidité que nous avons obtenue, est plus élevée dans la pulpe de *Z. spina christi* et plus faible dans l'amande et la graine de *Z. lotus* bien que plusieurs auteurs aient signalé des valeurs plus faibles dans la graine de *Z. lotus* (Amoo, et al., 2012). La teneur en humidité relativement faible indique que les graines, les amandes et les farines préparées à partir de celles-ci auront une excellente qualité et une durée de conservation plus longue. Une faible humidité diminue la probabilité de croissance microbienne, de fermentation indésirable, de germination prématurée des graines et de nombreux changements biochimiques indésirables normalement associés à ces processus (Agnieszka, et al., 2013). La teneur en lipides est plus élevée dans les amandes de *Z. spina-christi* et plus faible dans la pulpe de *Z. lotus*. Ces résultats sont en accord avec les résultats de littérature (Soussen, et al., 2010). Concernant la teneur en protéines, les amandes de *Z. spina christi* présentent la teneur la plus élevée, ils peuvent donc être utilisés comme aliments ou stocks de nourriture pour animaux. Par ailleurs il a été décrété que les acides aminés issus des protéines peuvent être utilisés pour la synthèse des protéines in vivo (Montiel, et al., 2005). Les quantités totales des cendres dans les fruits de *Z. spina-christi* sont plus élevées par rapport aux autres parties des plantes ; ces résultats sont en accord avec les études précédentes (Jokotagba, et al., 1987). Cette teneur en cendres est indicative de la teneur en minéraux (Saw, et al., 1998). Une quantité élevée en sucre a été observée dans différentes parties des deux espèces. Cette teneur élevée en sucre dans les fruits et les pulpes suggère que leurs farines peuvent être de bonnes sources d'énergie et peuvent être intéressantes en tant que matières premières industrielles pour la formulation alimentaire (Saadoudi, et al., 2017).

L'analyse phytochimique de différentes parties du fruit de *Z. spina-christi* et *Z. lotus* L. a révélé la présence des polyphénols tels que les saponines, les stérols et les terpènes. Des études précédentes ont rapporté de façon similaire la présence de ces composés chez les différentes espèces du Jujubier (El-Khateeb, et al., 2013). Cependant, les alcaloïdes n'ont pas été détectés dans les graines et les amandes de *Z. spina-christi*. On note l'absence des quinine et des stéroïdes dans les graines et les pulpes de *Z. lotus*. Ces résultats sont en accord avec ceux des recherches précédentes (Hassan, et al., 2004). Ghalem et ses collaborateurs ont montré que les amandes présentaient le plus grand nombre de métabolites secondaires et ils

ont également montré que ces extraits ont un effet bénéfique contre des agents pathogènes ce qui explique leur utilisation traditionnelle pour le traitement de diverses maladies et leurs activités pharmacologiques, y compris l'activité antioxydante, antiproliférative et antidiabétique (Ghalem, et al., 2014).

Les travaux antérieurs ont montré que les composés polyphénoliques des plantes jouent un rôle clé en tant qu'antioxydants pièges de radicaux libres. Leur activité antioxydante est principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et la décomposition des peroxydes (Himesh, et al., 2011). La bio-activité des composés phénoliques est également liée à leur capacité à chélater les métaux, à inhiber la lipoxigénase et à neutraliser les radicaux libres (Lin, et al., 2005). Il a également été confirmé que les composés phénoliques présentent des propriétés antimutagènes et anticarcinogènes chez l'homme lorsque ~ 1,0 g est consommé quotidiennement dans le cadre d'un régime alimentaire riche en fruit et légumes (Tanaka, et al., 1998). Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la teneur en polyphénols totaux différait dans les deux espèces et dans les différentes parties de fruits étudiées. En plus, la composition phénolique totale des différents extraits varie en fonction du solvant utilisé et de sa polarité, qui joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité phénolique. La teneur en phénol la plus élevée a été observée dans l'extrait aqueux des graines de *Z. spina-christi*, et la valeur la plus faible dans l'extrait chloroformique des amandes de *Z. lotus*. Les résultats actuels sont conformes aux résultats de la littérature (Jassabi, et al., 2013). Les flavonoïdes sont largement répandus dans les fruits et légumes, ils sont caractérisés par une structure benzo-y-pyrone (Cheng, et al., 2000). Dans la présente étude, nous avons montré que la teneur totale en flavonoïdes est plus élevée dans les graines que dans les autres parties du fruit, et chez *Z. lotus* par rapport à *Z. spina christi*., l'extrait aqueux des graines de *Z. lotus* présente des valeurs plus élevées alors que l'extrait d'éther de pétrole obtenu à partir de la pulpe de *Z. spina-christi* présente la valeur la plus faible ; plusieurs études ont d'ailleurs montré la richesse des plantes du jujubier en flavonoïdes (Jiang, et al., 2007). Les flavonoïdes sont connus pour leur effet bénéfique sur la santé humaine en raison de leur activité pharmacologique en tant qu'antioxydants et capteurs des radicaux (Schubert, et al., 2007). Les tanins sont des composés poly-phénoliques d'origine végétale, qui ont des propriétés astringentes et accélèrent la cicatrisation des blessures et des muqueuses enflammées (Mehansho, et al., 1987). Les résultats obtenus en tanin montrent que l'extrait aqueux représente la teneur la plus élevée et celui de l'éther de pétrole la teneur la plus faible. Les amandes avaient la teneur en tanin la plus élevée par rapport aux autres

parties étudiées. La teneur en tanin est plus élevée dans le *Z. spina-christi* par rapport à *Z. lotus*. La richesse des graines et des amandes de *Z. spina-christi* en tanin favorise l'utilisation de la plante pour le traitement des blessures, des ulcères divers, des hémorroïdes, des gelures et des brûlures en phytothérapie en raison des effets antibactériens des tanins (Akinwumi, et al., 2017). Les anthocyanes sont un groupe relativement restreint de pigments extraits de certaines plantes congolaises utilisées en médecine traditionnelle contre la drépanocytose et il a été démontré qu'ils ont une activité anti-drépanocytaire in vitro (Mpiana, et al., 2008). Les résultats que nous avons obtenus montrent que la teneur en anthocyanes la plus élevée a été obtenue dans l'extrait méthanolique. Il y avait une différence significative entre les différentes parties du fruit du Jujubier des deux espèces. Des quantités plus élevées d'anthocyanes ont été observées dans les amandes de *Z. lotus* alors que l'extrait d'éther de pétrole de la graine de *Z. spina christi* avait la valeur la plus faible. Les anthocyanes ont un rôle antioxydant contre les espèces réactives de l'oxygène causées par les stress abiotiques, comme la surexposition des animaux aux rayons ultraviolets (Mpiana, et al., 2008).

Chapitre 2. Variation des teneurs en minéraux, en polyphénols et de l'activité antioxydante des différentes parties de fruit des espèces de Ziziphus cultivées au Maroc (Article 3)

Introduction

Les antioxydants sont des agents protecteurs potentiels qui réduisent considérablement les dommages oxydatifs dans le corps humain afin de régler toute inefficacité des mécanismes enzymatiques (Halliwell, 1992). L'hydroxyanisole butylé (HAB) et l'hydroxytoluène butylé (HTB) sont les antioxydants synthétiques les plus couramment utilisés pour prévenir la détérioration oxydative (Li, et al., 2008). Cependant, ces antioxydants synthétiques se sont avérés cancérigènes chez les animaux de laboratoire (Sarikurkcu, et al., 2009). À l'origine, l'hydroxyanisole butyrique semblait avoir une action d'initiation et de promotion des tumeurs (Botterweck, et al., 2000). Les produits naturels d'origine végétale ont été proposés comme source potentielle d'antioxydants naturels ayant des effets toxiques minimales et une forte activité (Lim, et al., 2001). Par conséquent, une plus grande attention a été portée aux antioxydants et chélateurs de fer naturels d'origine végétale. Certaines plantes médicinales sont connues par leur richesse en biomolécules d'intérêt biologique à savoir la prévention du stress oxydatif (Barbusiński, 2009). Toutefois, les besoins croissants en antioxydants naturels ont suscité une grande importance pour la découverte de puissants capteurs de radicaux libres à partir des plantes (Lim, et al., 2001); sans oublier les minéraux qui sont très importants dans les processus biologiques et qui jouent un rôle vital dans la prévention de certaines maladies chroniques (Gorinstein, et al., 2001). Les plantes de jujubier ont été identifiées comme de principales sources d'antioxydants alimentaires, en particulier les composés phénoliques. Toutefois, cette activité varie selon l'espèce ou la partie de l'espèce étudiée. Les informations disponibles sur les minéraux et les propriétés antioxydantes de la pulpe et de la graine de *Z. Spina Christi* et de *Z. Lotus* sont rares. Aussi, aucune étude précédente n'a documenté les minéraux et l'activité antioxydante de l'amande de ces plantes. L'objectif principal de cette étude est de comparer la composition en minéraux (potassium, magnésium, calcium, sodium, fer et zinc) et en poly-phénols (flavan-3-ols et proanthocyanidines) ainsi que les activités antioxydantes (DPPH, ABTS et absorption de radicaux d'oxygène) entre les fruits entiers, la pulpe, les graines et les amandes des espèces de jujubier cultivées au Maroc.

Article 3.



ORIGINAL ARTICLE

Variation in minerals, polyphenolics and antioxidant activity of pulp, seed and almond of different *Ziziphus* species grown in Morocco

Variação em minerais, polifenóis e atividade antioxidante da polpa, semente e amêndoa de diferentes espécies do gênero Ziziphus cultivadas no Marrocos

Ezzouhra El Maaiden^{1,2*}, Youssef El Kharrassi², Mouna Lamaoui³, Larbi Allai⁴, Abdel Khalid Essamadi², Boubker Nasser², Khadija Moustaid¹

¹University Hassan I, Department of Chemistry, Settat - Morocco

²University Hassan I, Department of Biology, Settat - Morocco

³Cadi Ayad University, Department of Biology, Marrakech - Morocco

⁴University Chouaib Doukkali, Department of Biology, El Jadida - Morocco

*Corresponding Author: Ezzouhra El Maaiden, University Hassan I, Department of Chemistry, Laboratory of Applied Chemistry and Environment, BP 577, 26000, Settat - Morocco, e-mail: zohra.elmaaiden@gmail.com

Cite as: El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Lamaoui, M., Allai, L., Essamadi, A. K., Nasser, B., & Moustaid, K. (2020). Variation in minerals, polyphenolics and antioxidant activity of pulp, seed and almond of different *Ziziphus* species grown in Morocco. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23, e2019206. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20619>

Abstract

Vegetables from the genus *Ziziphus* (Rhamnaceae) have been identified as one of the main dietary antioxidants, especially phenolic compounds. However, their chemical composition varies according to the specie or the part of the plant. Mineral composition (potassium, magnesium, calcium, sodium, iron, and zinc), polyphenolic content (Flavan-3-ol, Proanthocyanidin, total polyphenol content) and antioxidant capacity (DPPH, ABTS, and ORAC Assay) in four different matrices (whole fruit, pulp, seed and almond) of *Ziziphus* (*Z. Lotus* and *Z. Spina Christi*) commonly grown in Morocco were investigated. As a result, minerals, polyphenolic contents and antioxidant capacity fluctuated significantly ($p \leq 0.05$) between different matrices and *Ziziphus* species analyzed. Seeds displayed a significantly higher mineral level, polyphenolic content and antioxidant capacity in comparison to whole fruit, pulp and almond. Among species, *Z. spina-christi* have a significantly higher content of mineral, phenolics and antioxidant activity. These results suggest that the mineral level, polyphenolic content and antioxidant capacity vary considerably depending on the *Ziziphus* species and part of the plant analyzed. Furthermore, *Z. spina-christi* seeds presented properties desirable for use in functional food.

Keywords: *Ziziphus*; Minerals; Proanthocyanidins; Flavan-3-ols; Antioxidant activity.

Resumo

Vegetais do gênero *Ziziphus* (Rhamnaceae) têm sido identificados como uma das principais fontes alimentares de antioxidantes, especialmente compostos fenólicos. No entanto, a sua composição química varia de acordo com a espécie ou parte da planta utilizada. Foi avaliada a composição mineral (potássio, magnésio, cálcio, sódio, ferro e



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

zinco), o conteúdo polifenólico (Flavan-3-ol, Proantocianidina, conteúdo total de polifenóis) e a capacidade antioxidante (ensaios DPPH, ABTS e ORAC) em quatro matrizes (fruta inteira, polpa, semente e amêndoa) de diferentes espécies de *Ziziphus* (*Z. Lotus* e *Z. Spina Christi*), geralmente cultivadas em Marrocos. Minerais, conteúdo polifenólico e capacidade antioxidante variaram significativamente ($p \leq 0,05$) em função das matrizes e das espécies analisadas. Em relação às diferentes matrizes, as sementes apresentaram conteúdo mineral, polifenólicos e capacidade antioxidante em teores significativamente mais elevados que o fruto inteiro, a polpa e a amêndoa. Entre as espécies, *Z. Spina Christi* tem um conteúdo significativamente maior de minerais, fenólicos totais e antioxidantes. Estes resultados sugerem que o conteúdo mineral, de polifenólicos e de antioxidantes varia consideravelmente dependendo da espécie de *Ziziphus* e da matriz analisada. Ademais, sementes de *Z. Spina Christi* apresentaram propriedades desejáveis para utilização em alimentos funcionais.

Palavras-chave: *Ziziphus*; Minerais; Proantocianidinas; Flavan-3-ols; Atividade antioxidante.

1 Introduction

Ziziphus (Rhamnaceae) is a widespread genus in the tropical and subtropical regions of Asia, Africa, North America, South America and Europe (Adeli & Samavati, 2015). Although there are around 170 types of *Ziziphus* around the world, just two species *Z. Lotus* and *Z. Spina Christi* are found in Morocco. *Z. Lotus* normally called Sedra is a prickly bush that spans up to 2 meters high. It yields small and freshly consumed fruits called the jujube and locally “n’beg”. In addition, *Z. Lotus* is broadly used in the folk medicine for the treatment of different sicknesses such as bronchitis, diarrhea, abscess, liver problem, insomnia, inflammation and diabetes (Adzu et al., 2003). *Z. Spina Christi*, which is known as Christi’s thorn or Jerusalem thorn in English and Sidr in Arabic, is a tropical tree of Sudanese origin reaching a height of 20 meters (Zargari, 1988). It has oval fruits, which are different from those of *Z. Lotus*, are equally used in the folk medicine for the management of pain, diabetes and other inflammatory-related problems (Kadioglu et al., 2016).

The antioxidants are potential protective agents that reduce significantly the oxidative damage in the human body to recover any ineffectiveness of the enzymatic mechanisms (Halliwell, 1995). Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), the most common synthetic antioxidants, is fortified as fat and oily food additives to prevent oxidative deterioration (Li et al., 2008). Due to their reported side effects, such as carcinogenicity, recent restrictions have been raised and attention has been redirected toward the natural antioxidants for food and/or medicinal industries).

Main minerals are very important in biological processes, play a vital role in the prevention of some chronic diseases (Gorinstein et al., 2001). That is why mineral content in food potentially useful as supplementary information to current food composition. The available information on the minerals and antioxidant properties of *Z. Spina Christi* and *Z. Lotus* pulp and seed are sporadic. Also, to the best of our understanding, no previous studies have documented the minerals and antioxidant activity of the almond of *Ziziphus sp.*, so the main objective of this investigation was to compare the minerals (potassium, magnesium, calcium, sodium, iron, and zinc), polyphenolic contents (total phenols, flavan-3-ols, and proanthocyanidins) and antioxidant activities (DPPH, ABTS, and oxygen radical absorbance) between whole fruit, pulp, seed and almonds of *Ziziphus sp.* grown in Morocco.

2 Material and methods

2.1 Plant material and sample preparation

Ripened fruits of *Z. Spina Christi* and *Z. Lotus* were collected from the field in Settat and Khouribga cities of Morocco (32°52'49.3" N 6°46'10.5" W, 33°03'49.6" N 7°37'24.7" W respectively), between November and December 2018. The plant material was identified through morphological and botanical traits. After harvest,

the fruits were cleaned with water and carefully separated into pulps, seeds and almonds using a stainless-steel knife dried shade; powdered in a heavy-duty grinder and packaged separately in airtight containers at room temperature (24 ± 4 °C), until use.

We mixed 100 g of each powder with 250 mL of double-distilled water (ddH₂O). The mixture was subjected to a hot and continuous extraction in the Soxhlet apparatus (reflux conditions). Extracts were filtered and evaporated under low pressure to give a viscous mass with a percentage yield of 5% to 20% (w/w). The concentrated crude extracts were stored at 4 °C until being used polyphenolic and antioxidant activities analysis (Elmaïden et al., 2019).

2.2 Mineral and trace elements content

Minerals analysis was performed according to the methods described by the Association of Official Analytical Chemists (1990). Briefly, 1g of dried samples was ashed in a muffle furnace (550 ± 10 °C, 6 h) then digested with 5 mL of HCl (6M) in a water bath. After drying, 7 mL of HNO₃ (0.1 M) was added and the contents were diluted to 100 mL with double-deionized water. Potassium (K) was done on a flame photometer (Systronics-130) whereas magnesium (Mg), calcium (Ca), sodium (Na), iron (Fe), and zinc (Zn) were determined on an atomic absorption spectrophotometer (ECIL Atomic Absorption Spectrophotometer-4141). Standard calibration curves were constructed for each element individually utilizing linear correlation by the least square method after running standard solutions. The blank reading was used to make necessary corrections during the calculation of elemental concentrations.

2.3 Polyphenolic content

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu's reagent according to the method of Laličić-Petronijević et al. (2016). Briefly, 0.25 mL of Folin reagent (diluted 10 times) was added to 0.25 mL of the sample with appropriate dilutions and 2 mL of a solution of sodium carbonate (7.5%). The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min with intermittent shaking for color development. The absorbance of the resulting blue color was measured at 765 nm using a double-beam UV-Vis spectrophotometer. Gallic acid was used as the standard. All measurements were performed in triplicate. Results were expressed as mg of gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

Total proanthocyanidin content (TPAC) were determined by the Bate-Smith method, described by Laličić-Petronijević et al. (2016). Briefly, 0.2 mL of each sample was mixed with 20 mL of butanol/HCl (50:50) and 0.54 mM FeSO₄. The mixture was incubated at 90 °C for 1 h and after cooling, the volume was completed to 25 mL with the butanol-HCl mixture. The absorbance was measured at 550 nm against a blank prepared in a similar way but without heating. The standard used was cyanidin chloride (which served to draw a calibration curve. All measurements were performed in triplicate. Results were expressed as mg of cyanidin chloride equivalent per gram of dry weight (mg CCE/g DW).

Total Flavan-3-ol content (TFC) were determined by the vanillin assay using the daily prepared working solution of 4% vanillin in methanol according to the method of Laličić-Petronijević et al. (2016). The content of flavan-3-ol was calculated according to Equation 1:

$$\omega(\text{flavan-3-ol}) = 290 \times \Delta A \quad (1)$$

where ΔA is the difference by subtracting the absorbance (550) of the blank from the absorbance of the corresponding vanillin-containing sample. All measurements were performed in triplicate. Results were expressed as mg of (+)-catechin equivalent per gram of dry weight (mg CE/g DW).

2.4 Antioxidant activity

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay was performed based on the procedure described by Zakaria et al. (2008). Briefly, 0.4 mL of the diluted sample solution and 2 mL of DPPH-methanolic solution (0.1 mM) were mixed and the obtained mixture was placed at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance (abs) was subsequently measured at 517 nm by spectra ax M5 microplate reader (Molecular Devices, America). Vitamin C was used as a positive control. All measurements were performed in triplicate. DPPH was expressed as the inhibition percentage of DPPH radical and was calculated following the Equation 2:

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[\frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Sample})}{(\text{Abs Control})} \right] \times 100 \quad (2)$$

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolinc-6-sulphonic acid) (ABTS) assay was realized as described by Ammar et al. (2015). The stock solution of the ABTS radical was produced by reacting 10 mL of ABTS (2 mM) with 0, 1 mL of potassium persulphate (70 mM) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS radical working solution was diluted with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) to an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm. All measurements were performed in triplicate. The samples were prepared by diluting 0, 1 mL of dried extracts in 2 mL of the diluted ABTS + solution; the mixture is left for 1 minute so that the reaction can be carried out. The absorbance is recorded on a spectrophotometer at 734 nm. The ABTS radical-scavenging activity of the extract was calculated from the calibration curve of Trolox and expressed as mg Trolox equivalent per gram of dried weight (mg TE/g DW).

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay was conducted on an automated plate reader with 96-well plates following the method of Prior et al. (2003). Analyses were conducted in phosphate buffer (7.4 pH, 37 °C). Peroxyl radical was generated using 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride prepared freshly for each run. Fluorescein was used as the excitation at 485 nm and emission at 520 nm. All measurements were performed in triplicate. The results were expressed as mg Trolox equivalent per gram of dry weight (mg TE/g DW).

2.5 Data analysis

All data were expressed as means the standard deviation ($n = 3$). Statistical analyses were performed with SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, IL, USA; version 21). The data were analyzed by an analysis of variance and the significance of the difference between sample means was calculated by Student Newman Keuls test ($p < 0.05$ was regarded as significant and $p < 0.005$ as very significant).

3 Results and discussion

3.1 Mineral composition

Minerals assume a key role in different physiological functions of the body, particularly in the regulation of process and building (Yasser et al., 2010).

Results of the mineral profile are shown in Table 1. The contents of most evaluated elements varied significantly according to the fruit tissue and specie evaluated. Independently of the fruit tissue, results showed greater variation amongst the different *Ziziphus sp.* analyzed. Among species, *Z. spina christi* had the highest mineral content. Regarding the different fruit tissues, the seeds exhibited the highest contents of K, Mg, Ca and Na (203.20 to 179.65, 78.37 to 74.80, 73.53 to 68.69 and 33.70 to 22.77 mg/100 g respectively). Similar results were reported by Djemai (2009), who determined that seed of *Z. lotus* contains a higher amount of minerals compared to pulp.

Table 1. Mineral contents of *Z. Lotus* (ZL) and *Z. spina Christi* (ZSC) whole fruit, pulp, seed and almond (mg/100 g of dry weight).

	Potassium (K)	Calcium (Ca)	Magnesium (Mg)	Sodium (Na)	Iron (Fe)	Zinc (Zn)
ZSC	Fruit	110.87 ± 6.71 ^a	63.26 ± 1.63 ^b	63.83 ± 0.36 ^a	20.43 ± 0.94 ^b	0.26 ± 0.02 ^b
	Pulp	78.90 ± 0.67 ^b	77.70 ± 0.67 ^a	58.07 ± 0.58 ^a	18.23 ± 0.49 ^{bc}	0.22 ± 0.06 ^{ab}
	Seed	203.20 ± 3.33 ^a	78.37 ± 0.23 ^{ab}	73.53 ± 0.29 ^a	33.70 ± 0.15 ^b	0.75 ± 0.18 ^c
	Almond	138.90 ± 0.67 ^b	52.23 ± 1.90 ^b	63.57 ± 0.44 ^c	19.62 ± 0.16 ^{bc}	0.90 ± 0.01 ^{ab}
ZL	Fruit	78.57 ± 0.44 ^b	63.26 ± 1.63 ^b	60.80 ± 1.33 ^a	18.50 ± 0.67 ^c	0.16 ± 0.13 ^c
	Pulp	65.73 ± 1.11 ^b	70.40 ± 0.67 ^b	51.20 ± 0.67 ^a	8.93 ± 0.64 ^{bc}	0.11 ± 0.40 ^b
	Seed	179.60 ± 0.10 ^a	74.80 ± 0.67 ^b	68.69 ± 0.14 ^a	22.77 ± 0.84 ^c	0.50 ± 0.01 ^c
	Almond	89.52 ± 0.11 ^a	45.17 ± 0.89 ^a	62.76 ± 0.05 ^b	10.63 ± 0.66 ^a	0.70 ± 0.03 ^{cd}

Values represent the mean ± standard deviation (n = 3). Different letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$; ^a and $p < 0.005$; ^{ab}) by the Student Newman Keuls test between the same botanical parts for each species.

While the content of Fe and Zn were found to be highest in the almonds (0.70-0.90 and 0.78-0.86 mg/100 g) for *Z. spina christi* and *Z. Lotus* respectively.

Several factors, such as variety, soil state, irrigation regime, harvest time, maturation, storage conditions, state of ripeness, may cause variation in the mineral contents in various sorts of fruits as well as within different parts of the same fruit (Leterme et al., 2006).

3.2 Polyphenolic contents

Polyphenolics are one of the major bio-compounds acting as primary antioxidants. Therefore, it is worthwhile to determine their total amount within the species subject of our study. Total phenolic (TPC), proanthocyanidin (TPAC), and flavan-3-ol content (TFC) in each fruit tissue of *Z. Lotus* (ZL) and *Z. spina Christi* (ZSC) are summarized in Table 2. The obtained results reveal that the content of the polyphenol fluctuates significantly ($p < 0.05$) depending on the botanical parts and the species subject of study. In term of *Ziziphus sp.* analyzed, *Z. spina christi* exhibited notable polyphenolic contents compared to *Z. lotus*. Regarding the different fruit tissues, the seeds of both species ZSC and ZL revealed the highest average values of TPC (30.24-24.46 mg GAE/gDW), TPAC (22.98-18.88 mg CCE/gDW), TFC (6.43-5.85 mg CE/gDW), while the pulp extracts contain clearly the lowest content of TPC (18.80-20.97 mg GAE/gDW), TPAC (11.09 -7.88 mg CCE/gDW), TFC (4.89-2.10 mg CE/gDW) for ZSC and ZL respectively. It should be noted that determination of polyphenolic contents can be influenced by the method employed, the solvent used, the nature of the compound, sample size, time and storage conditions, reference standard used and interfering elements (Bucić-Kojić et al., 2009).

Table 2. Polyphenolic contents including total phenolic, proanthocyanidin and flavan-3-ol content of fruit tissues for *Z. Lotus* (ZL) and *Z. spina Christi* (ZSC).

	TPC (mg GAE/g DW)		TPAC (mg CCE/g DW)		TFC (mg CE/g DW)	
	ZSC	ZL	ZSC	ZL	ZSC	ZL
Whole fruit	26.33 ± 0.07 ^{ab}	22.00 ± 0.15 ^{ab}	12.66 ± 0.10 ^{abc}	8.12 ± 0.09 ^{abc}	4.74 ± 0.12 ^{ab}	5.49 ± 0.10 ^{ab}
Pulp	18.80 ± 0.08 ^{ab}	20.97 ± 0.07 ^{ab}	11.09 ± 0.03 ^{abc}	7.88 ± 0.09 ^{abc}	4.89 ± 0.08 ^{ab}	2.10 ± 0.10 ^{ab}
Seed	30.24 ± 0.1 ^a	24.46 ± 0.08 ^{ab}	22.98 ± 0.14 ^a	18.88 ± 0.11 ^a	6.43 ± 0.09 ^a	5.85 ± 0.11 ^a
Almond	21.40 ± 0.02 ^{ab}	21.05 ± 0.06 ^{ab}	17.20 ± 0.10 ^{ab}	14.66 ± 0.08 ^{ab}	4.99 ± 0.11 ^{ab}	3.65 ± 0.10 ^{bc}

Results expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Different letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$; ^a and $p < 0.005$; ^{ab}) by the Student-Newman-Keuls test between the same botanical parts for each species. TPC: Total phenolic content, TFC: Total Flavan-3-ol content, TPAC: Total proanthocyanidin content.

3.3 Antioxidant activity

The antioxidant properties are extremely complex. Therefore, the use of more than one method is essential for acquiring reliable results. In our study tree assays were used to assess the total antioxidant capacity of fruit tissues from *Ziziphus sp.* (DPPH, ABTS, and ORAC assay). The DPPH test is based on the reaction of

the antioxidants with the stable free radical. α -diphenyl- β -picrylhydrazyl, which have a deep violet color producing a less colored compound which is α -diphenyl- β -picrylhydrazine. ABTS is another synthetic radical more versatile than DPPH as it can assess the scavenging activity for both the polar and non-polar extracts (Re et al., 1999). ORAC measures include all the traditional antioxidants counting the hydrophilic and lipophilic (Cao et al., 1997).

The antioxidant capacity of whole fruit, pulp, seed and almond of *Ziziphus* sp., are shown in Table 3. DPPH, ABTS and ORAC value was significantly different depending on the *Ziziphus* sp. and the fruit tissue evaluated. *Z. spina christi* showed a significantly higher antioxidant capacity than *Z. lotus*. Regarding the different fruit tissue seed of two species exhibited a remarkable antioxidant activity, DPPH (64.87 to 48.28%), ABTS (75.87 to 33.60 mg TE/g DW), ORAC (20.94 to 17.1 mg TE/g DW) for ZSC and ZL respectively, compared to the other fruit tissues.

Table 3. Antioxidant activities of fruit tissues for *Z. Lotus* (ZL) and *Z. spina Christi* (ZSC) determined by the DPPH, ABTS and ORAC assay.

	DPPH%		ABTS (mg TE/g DW)		ORAC (mg TE/g DW)	
	ZSC	ZL	ZSC	ZL	ZSC	ZL
Whole fruit	51.98 ± 0.31 ^{ab}	61.91 ± 0.85 ^a	23.56 ± 0.28 ^{abc}	18.38 ± 0.20 ^{abc}	13.88 ± 0.23 ^{ab}	13.06 ± 0.05 ^{ab}
Pulp	35.74 ± 0.70 ^{abc}	33.65 ± 0.21 ^{abc}	24.78 ± 0.21 ^{abc}	19.6 ± 0.17 ^{abc}	12.10 ± 0.35 ^{ab}	10.53 ± 0.24 ^{abc}
Seed	64.87 ± 1.42 ^a	48.28 ± 0.41 ^{ab}	75.87 ± 0.36 ^a	33.60 ± 0.21 ^{abc}	20.94 ± 0.46 ^a	17.1 ± 0.15 ^a
Almond	55.88 ± 0.72 ^{ab}	26.36 ± 0.28 ^{abc}	65.84 ± 0.90 ^a	26.36 ± 0.28 ^{abc}	15.91 ± 0.27 ^{ab}	14.76 ± 0.12 ^{ab}

All values are presented as the means ± standard deviation. Different letters in the same column mean significant difference ($p < 0.05$:^a and $p < 0.005$:^{ab}) by the Student-Newman-Keuls test between the same botanical parts for each species. DPPH: 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, ABTS: assay, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), ORAC: Oxygen radical absorbance capacity.

4 Conclusion

In the present study, the minerals, polyphenolic contents and antioxidant activities of different fruit tissues (whole fruit, pulp, seed and almond) of two locally available species of *Ziziphus* fruit from Morocco were evaluated. Among the two species analyzed, *Z. Spina Christi* exhibited higher mineral, polyphenolic contents and antioxidant activity compared to *Z. Lotus*. Besides, the present results also revealed that *Ziziphus* seed exhibited higher mineral, polyphenolic contents and antioxidant activity compared to that of whole fruit, pulp and almond, indicating that removal of seed from such fruits may induce significant nutrient losses. Therefore, the *Ziziphus* sp. seeds could be used for functional foods. However, further research trials are required to isolate the main constituents responsible for the antioxidant nature and biological activities for further applications in the food and pharmaceutical industries.

Acknowledgements

Authors thank Dr. Gérard Lizard director of Bio-PeroxiL Laboratory, University of Bourgogne, France, for the discussion and the careful reading of the manuscript. The help in redaction of abstract in Portuguese by Nilson César Castanheira Guimarães, federal inspector of agriculture/agricultural attaché and Brazilian Embassy in Rabat - Kingdom of Morocco is duly acknowledged.

References

- Adeli, M., & Samavati, V. (2015). Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Ziziphus lotus* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 580-587. PMID:25195543. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.047>
- Adzu, B., Amos, S., Amizan, M. B., & Gamaniel, K. (2003). Evaluation of the antidiarrhoeal effects of *Ziziphus spina-christi* stem bark in rats. *Acta Tropica*, 87(2), 245-250. PMID:12826300. [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00114-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00114-1)
- Ammar, I., Ennouri, M., & Attia, H. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. *Industrial Crops and Products*, 64, 97-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.030>

- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (1990). *Official methods of analysis* (Vol. 1). Gaithersburg: AOAC.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2394-2401. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x>
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749-760. PMID:9119242. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- Djemaï, Z.S. (2009). *Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de Zizyphus Lotus L.* (Mémoire de master). Université El Hadj Lakhdar, Batna.
- El Maaïden, E., El Kharrassi, Y., Moustaid, K., Essamadi, A. K., & Nasser, N. (2019). Comparative study of phytochemical profile between *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus* from Morocco. *Food Measure*, 13(1), 121-130. <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-018-9925-y>
- Gorinstein, S., Zachwieja, M., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., Weisz, M., Trakhtenberg, S., & Martín-Belloso, O. (2001). Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 952-957. PMID:11262055. <http://dx.doi.org/10.1021/jf000947k>
- Halliwel, B. (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348. PMID:7763275. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00088-H](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(95)00088-H)
- Kadioglu, O., Jacob, S., Bohnert, S., Naß, J., Saeed, M. E., Khalid, H., Merfort, I., Thines, E., Pommerening, T., & Efferth, T. (2016). Evaluating ancient Egyptian prescriptions today: Anti-inflammatory activity of *Ziziphus spina-christi*. *Phytomedicine*, 23(3), 293-306. PMID:26969383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.01.004>
- Laličić-Petronijević, J., Komes, D., Gorjanović, S., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Pastor, F., Ostojić, S., Popov-Raljić, J., & Sužnjević, D. (2016). Content of total phenolics, flavan-3-ols and proanthocyanidins, oxidative stability and antioxidant capacity of chocolate during storage. *Food Technology and Biotechnology*, 54(1), 13-20. PMID:27904388.
- Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., & Londoño, A. M. (2006). Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chemistry*, 95(4), 644-652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.003>
- Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 41(3), 385-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.011>
- Prior, R., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273-3279. PMID:12744654. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0262256>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Yasser, D., Ayub, M., Ali, M., & Asad, A. (2010). Physicochemical response of apple pulp to chemical preservatives and antioxidant during storage. *Internet Journal of Food Safety*, 12, 20-28.
- Zakaria, Z., Aziz, R., Yoga, L., Sreenivasan, S., & Rathinam, X. (2008). Antioxidant activity of *Coleus blumei*, *Orthosiphon stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae Family. *International Journal of Natural Sciences*, 2, 93-95.
- Zargari, A. (1988). *Medicinal plants*. Tehran: Tehran University of Medical Sciences.

Funding: None.

Received: Aug. 11, 2019; Accepted: Jan. 08, 2020

Discussion

Les minéraux jouent un rôle clé dans différentes fonctions physiologiques de l'organisme (Yasser, et al., 2010). Les teneurs de la plupart des minéraux évalués varient de manière significative selon la partie du fruit étudiée. Indépendamment du tissu de fruit, les résultats ont montré une plus grande variation parmi les différentes espèces de jujubier analysées. L'espèce *Z. spina christi* s'est avérée plus riche en minéraux par rapport à *Z. lotus*. En ce qui concerne les différentes parties du fruit, les graines présentent les teneurs les plus élevées en potassium (K), en calcium (Ca), en magnésium (Mg) et en sodium (Na). Des résultats similaires ont rapporté que les graines de *Z. lotus* contiennent une quantité plus élevée de minéraux que la pulpe (Djemai, 2009). La teneur en fer (Fe) et en zinc (Zn) s'est avérée plus élevée dans les amandes des deux espèces étudiées. Plusieurs facteurs, tels que la variété génétique, l'état du sol, le régime d'irrigation, la période de récolte, la maturation, peuvent entraîner des variations de la teneur en minéraux dans diverses sortes de fruits ainsi qu'au sein de différentes parties d'un même fruit (Leterme, et al., 2006).

Les polyphénols sont l'un des principaux bio-composés agissant comme antioxydants. Il est donc intéressant de les quantifier dans les espèces faisant objet de notre étude. Les teneurs totales en phénols (TPC), en proanthocyanidine (TPAC) et en flavan-3-ol (TFC) de chaque tissu du fruit de *Z. Lotus* et de *Z. spina Christi* obtenu révèle que la teneur en phénols fluctue de manière significative en fonction des parties botaniques et des espèces étudiées. En termes d'espèces analysées, *Z. spina christi* présente des teneurs en polyphénols notables par rapport à *Z. lotus*. En ce qui concerne les différents tissus de fruits, les graines des deux espèces ont révélé les valeurs les plus élevées, tandis que les extraits de pulpe contiennent les plus faibles teneurs. Il convient de noter que la détermination des teneurs en polyphénols peut être influencée par la méthode d'extraction employée, le solvant utilisé, la nature du composé, la taille de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage (Bucić-Kojić, et al., 2009).

Les propriétés antioxydantes sont extrêmement complexes. Par conséquent, l'utilisation de plus d'une méthode est essentielle pour obtenir des résultats fiables. Dans notre étude, nous avons utilisé différentes méthodes pour évaluer la capacité antioxydante totale des différents tissus des fruits des espèces de jujubier étudiées (DPPH, ABTS et ORAC). Les mesures ORAC incluent tous les antioxydants traditionnels en comptant les hydrophiles et les lipophiles (Akinwumi, et al., 2017). Les valeurs de la DPPH, de l'ABTS et de l'ORAC étaient significativement différentes selon les extraits et le tissu du fruit évalué. *Z. spina christi* a

montré une capacité antioxydante significativement plus élevée que *Z. lotus*. Concernant les différentes parties des fruits, les extraits issus des graines des deux espèces étudiées ont montré une activité antioxydante remarquable par rapport aux autres parties de fruits.

Chapitre 3. Effet protecteur de Ziziphus spina-christi contre le stress oxydatif et les dommages d'ADN induits par le Fer chez Tetrahymena pyriformis (Article 4 et 5)

Introduction

Le Fer (Fe) est un élément essentiel pour plusieurs processus cellulaires et métaboliques tels que le transport des électrons, la respiration, la synthèse des protéines et des acides nucléiques, ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire (Pari, et al., 2015). Cependant, une surcharge de ce métal de transition catalyse également la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO), ce qui conduit à l'endommagement oxydatif des composants cellulaires (Kehrer, 2000). Le système antioxydant endogène joue un rôle principal dans la régulation de l'homéostasie intracellulaire des ERO en activant les biomolécules antioxydantes cellulaires et les enzymes impliquées dans le stress oxydatif telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Madhusudhan, et al., 2011). La perte d'équilibre entre le niveau de génération des ERO et l'activité de défense antioxydante déclenche le stress oxydatif cellulaire (Madhusudhan, et al., 2011). Une conséquence majeure de l'exposition à long terme aux ERO induite par la surcharge en fer est le changement et la dégradation de l'ADN cellulaire, entraînant un déséquilibre chronique du métabolisme cellulaire, ce qui conduit à des maladies telles que les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, ainsi que le diabète et le cancer (Pari, et al., 2015). En général, les antioxydants synthétiques offrent la possibilité de protéger et de traiter les dommages oxydatifs en inhibant ou en piégeant les radicaux libres (Madhusudhan, et al., 2011). Bien que certains médicaments antioxydants synthétiques aient été développés, leur utilisation dans le domaine de la santé a été limitée en raison de leurs effets secondaires indésirables (Mariod, et al., 2010). Au cours de la dernière décennie, les plantes médicinales ont généralement suscité plus d'intérêt en tant que sources potentielles d'antioxydants naturels et/ou en tant que sources de précurseurs dans le développement de médicaments.

Z.spina-christi a été traditionnellement utilisé en médecine populaire pour ses divers bienfaits thérapeutiques (Kadioglu, et al., 2016) . Cependant, il n'existe pas d'informations bien documentées concernant le rôle protecteur de cette plante contre la toxicité induite par le surcharge des métaux traces, dont le Fer. Ce travail vise à identifier et quantifier les métabolites secondaires par CLHP dans les extraits des différentes parties de fruit, ainsi qu'à

évaluer leurs effets chélateurs et antioxydant. Pour évaluer l'effet protecteur de l'extrait des graines contre les dommages oxydatifs de l'ADN induits par le fer, nous avons choisi le *Tetrahymena pyriformis* comme modèle cellulaire d'étude. Pour ce faire,

Le cilié *Tetrahymena pyriformis* est un modèle cellulaire couramment utilisé pour tester l'effet bénéfique des biomolécules (Darcy, et al., 2002). Le processus d'extraction et de purification d'ADN doit être efficace, simple, rapide et peu coûteux. L'élimination des matériaux par des agents surfactants est l'une des méthodes de purification les plus favorables, en raison de leur excellente capacité de liaison avec une variété de biomolécules et d'ions (Fenicia, et al., 2007). Les méthodes classiques d'extraction d'ADN ne sont pas satisfaisantes pour *tetrahymena pyriformis*, raison pour la quelle nous avons mis au point une nouvelle méthode efficace, simple, rapide et peu coûteuse comme décrit dans l'article 4. En effet, l'extraction a été réalisée à l'aide d'un nouveau mélange (dodécylsulfate de sodium (SDS) 20%/Triton X-100). L'efficacité de cette technique a été comparée à trois techniques alternatives largement utilisées, à savoir la matrice Chelex 100, le complexe APD (Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate) et les méthodes SDS-chloroforme.

Le premier objectif de ce chapitre est de mettre en évidence une technique d'extraction et de purification d'ADN de *Tetrahymena pyriformis* avec laquelle on va travailler pour tester l'effet protecteur des extraits aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* contre les dommages oxydatifs d'ADN induits par le chlorure de fer. Le deuxième objectif de ce chapitre est d'identifier et doser les métabolites secondaires par chromatographie liquide à haute performance et tester l'effet protecteur des extraits aqueux de *Z. spina christi* contre la toxicité de FeCl_2 (stress oxydatif, peroxydation lipidique, dommage d'ADN). Pour cela, les cellules ont été incubées avec du chlorure de fer (FeCl_2) (1mM) pendant 24h en l'absence et/ou en présence d'extrait de graines de *Z. spina christi*. Nous avons choisi l'extrait des graines de *Z. spina christi* vue sa composition chimique, son activité antioxydante puissante et sa faible cytotoxicité. La peroxydation des lipides et la production d'espèces réactives de l'oxygène ont été mesurées par des méthodes biochimiques, et l'accumulation intracellulaire de Fer par la coloration au bleu de Prusse de Perl et le test de ferrozine. L'analyse de la dégradation de l'ADN a été effectuée par électrophorèse sur gel. Nous avons évalué par réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (PCR) une enzyme impliquée dans la dégradation d'ADN par les métaux (métallothionéine (MT)). Puis les produits de la (PCR) sont analysés par électrophorèse après digestion avec l'enzyme de restriction Hindi III.

Article 4.

Protocol

Improved Method for DNA Extraction and Purification from *Tetrahymena pyriformis*

Ezzouhra El Maaiden^{1,2}, Youssef El Kharrassi¹, Abdel Khalid Essamadi¹, Khadija Moustaid² and Boubker Nasser^{1,*}

¹ Laboratory of Biochemistry and Neurosciences, Department of Biology, University Hassan I, BP 577, 26000 Settat, Morocco; zohra.elmaaiden@gmail.com (E.E.M.); elkharrassiyoussef@gmail.com (Y.E.K.); essamadi2002@yahoo.fr (A.K.E.)

² Laboratory of Applied Chemistry and Environment, Department of Chemistry, University Hassan I, BP 577, 26000 Settat, Morocco; moustaid_khadija@yahoo.fr

* Correspondence: boubker.nasser@uhp.ac.ma; Tel.: +212-067-373-9479

Received: 16 March 2019; Accepted: 13 May 2019; Published: 15 May 2019



Abstract: *Tetrahymena pyriformis* (protozoa) is intensely investigated as a model organism, offering numerous advantages in comprehensive and multidisciplinary studies using morphologic or molecular methods. Since DNA extraction is a vital step of any molecular experiment, here a new mixed surfactant (Sodium dodecyl sulfate (SDS) 20%/Triton X-100) was adopted for effective DNA extraction from *Tetrahymena pyriformis* under an easy, fast protocol. The efficiency of this technique was then compared with three widely-used alternative techniques, namely the Chelex 100 matrix, Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APD) complex and SDS–chloroform methods. DNA extraction was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis, spectral measurement, fluorometry (Qubit), restriction enzyme digestion, and polymerase chain reaction. Data analysis revealed that the quantity and quality of the recovered DNA varied depending on the applied DNA extraction method. The new method (SDS 20%/Triton X-100) was the most efficient for extracting DNA from *Tetrahymena pyriformis* with high integrity and purity, affordable cost, less time, and suitability for molecular applications.

Keywords: *Tetrahymena pyriformis*; DNA extraction; SDS 20%/Triton X-100; Chelex[®] 100 matrix; APD complex; SDS-chloroform

1. Introduction

The ciliate *Tetrahymena pyriformis* is a cell model for cellular and molecular biology [1,2]. Like other ciliates, this species has separate germline and soma functions that are embodied by distinct nuclei within a single cell. The germline-like micronucleus (MIC) has its genome held in reserve for sexual reproduction. The soma-like macronucleus (MAC), which possesses a genome processed from that of the MIC, is the center of gene expression, and does not directly contribute DNA to sexual progeny. High-quality isolation and purification of DNA is the first and most undervalued step in molecular biology methods, and depends on the high purity and concentration of extracted DNA [3]. On the other hand, the process should be safe, simple, quick, and low-cost. Finally, the DNA extraction technique chosen should be able to deliver pure DNA samples ready to be used in downstream molecular applications [4]. The basic steps of DNA isolation are (1) the disruption of the cellular structure to create a lysate, (2) the separation of the soluble DNA from cell debris and other insoluble material, and (3) the purification of the DNA of interest from the soluble proteins and other nucleic acids [5]. The elimination of materials by surfactants is one of the most favourable methods of purification, due to their excellent binding ability with a variety of biomolecules and ions [6]. This paper describes a simplified and quick method of DNA extraction from *Tetrahymena pyriformis* using a new mixed

surfactant (sodium dodecyl sulfate (SDS) 20%/Triton X-100). The efficiency of this technique was compared with three widely-used alternative techniques, namely the Chelex 100 matrix, Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APD) complex and SDS–chloroform methods.

2. Experimental Design

Our method consists of the following steps, as shown in Figure 1. The first step was the culture of our strain of *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) axenically in the standard medium PPYE (proteose peptone-yeast extract). The culture medium PPYE was removed and the protozoa pellet was submitted to DNA extraction with the SDS/Triton X-100 method. We needed to determine the ratio of SDS/Triton X-100 that provided a high quality and quantity of DNA, so different ratios of SDS/Triton X-100 were tested (0/100, 20/80, 40/60, 60/40, 80/20, and 100/0); the ratio that provided the highest quality and yield of DNA was compared with three widely-used techniques (Chelex 100 matrix APD complex and SDS–chloroform).

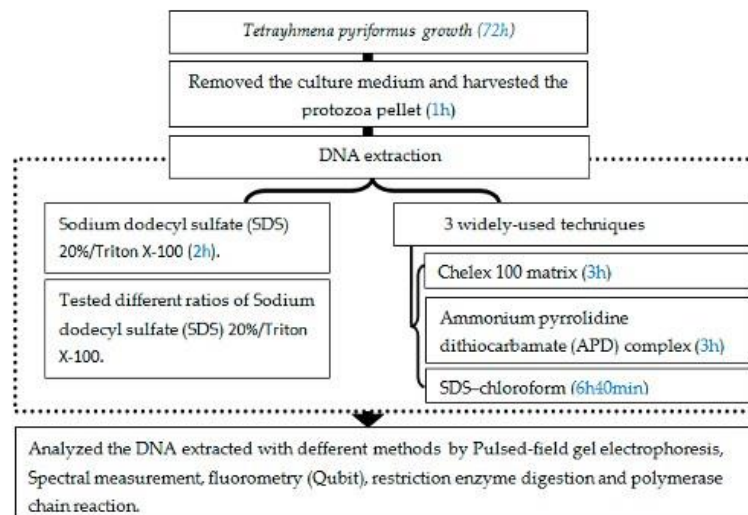


Figure 1. Experimental design for the extraction of DNA with sodium dodecyl sulfate (SDS)/Triton X-100, and the comparison of its quality and quantity with other widely-used methods.

2.1. Materials

The following materials were used in the experiment:

- SDS 20% solution (Thermo Fisher; Waltham, MA, United States; Cat.no.:AM9820);
- Chelex 100 matrix (BIO-RAD; Hercules, CA, United States; Cat.no.:1421253);
- Tris, 1 M, pH 8.0 (Thermo Fisher; Waltham, MA, United States; Cat. no.: AM9855G);
- Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, United States; Cat. no.: 17892);
- Ethanol 100% (VWR chemicals, VWR, Radnor, PA, United States; Cat. no.: 64-17-5);
- Proteinase K (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, United States; Cat. No.: EO0491);
- Agarose molecular grade (Roche, Burgess Hill, United Kingdom; Cat. no.: 11388983001);
- Tris- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), (TE, St. Louis, MI, United States; Cat. No.: 99302);
- Restriction endonuclease HindIII (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States; Cat.no.:ER0501);
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark; Cat.no.:SM0311);

- Primers MT (see Table 1);
- Ethidium Bromide (Thermo Fisher; Wilmington, DE, United States; Cat.no.: 10342020);
- Deoxynucleotide (dTNP) mixture (25 mM) (Takara bio; Shiga, Japan; Cat.no.: 4030);
- Taq Polymerase; (Thermo Fisher; Naerum, Denmark; Cat.no.: 10342020);
- Manganese (II) chloride (Thermo Scientific; Karlsruhe, Allemagne, Cat.no.: 7773-01-5);

2.2. Equipment

The following equipment was used in the experiment:

- Microcentrifuge tubes 1.5 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany; Cat. no.: T9661-500EA);
- Pipette-tips, 10 μ L, 200 μ L, 1 mL (Axygen, Union City, CA, United States; Cat.no.: 14-222-690, 14-222-812 and 14-222-737);
- Shaking heat block (Thermomixer, Eppendorf; Hercules, CA, United States, Cat.no.: 363000233);
- Water bath (JULABO TW9; JULABO, Seelbach, Germany; CAT.no.: 9550323);
- Vortex (Genie 2; Scientific Industries, Bohemia, NY, United States; Cat.no.: SI-T236);
- Laboratory scales (Sartorius, Göttingen, Germany; Cat.no.: ENTRIS623i-1S);
- pH meter (HANNA Edge HI2020-02; HANNA, Woonsocket, RI, United States; Cat.no.: HI2020-20);
- Homogenizer (Bullet Blender; Next Advance; Bohemia, NY United States; Cat.no.: 344-0014);
- Autoclave (HIRAYAMA, Saitama, Japan; Cat.no.: 344-0014);
- Microcentrifuge (Eppendorf; Cat. No.: 5424R);
- -20 °C freezer (Thermo scientific™; Goteborg, Sweden; Cat.no.: TSX2320FD);
- 4 °C refrigerator (Nor-Lake™, Goteborg, Sweden; Cat.no.: 22-650-528);
- MilliQ water purification system (Merck Millipore, Burlington, MA, United States; Cat.no.: ZIQ7003T0);
- Gel electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States; Cat.no.: 150-0739);
- NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, DE, United States; Cat.no.: 13-400-519);
- BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences; Hercules, CA, United States; Cat.no.: 170-3612);
- Qubit fluorometer (Thermo Fisher; Hercules, CA, United States; Cat. no.: Q33226);
- Molecular Imager Gel Doc XR System (BIO-RAD; Hercules, CA, United States; Cat.no.: 1708195EDU);
- Chef-DR II Gel Electrophoresis System (BIO-RAD; Hercules, CA, United States; Cat.no.: 170-3612);
- Polymerase chain reaction (PCR) tubes (Axygen; Hercules, CA, United States; Cat. no.: 14-222-262);
- Rotaphor (Biometra; Gottingen, Germany; Cat.no.: 846-021-101);
- Thermocycler (Super Cycler SC300G, Kyrtec, Mansfield, Australia; Cat.no.: SC-200);

3. Procedure

3.1. Strains and Culture Conditions

- *Tetrahymena pyriformis* (strain GL, L 1630/1, from The Culture Collection of Algae and Protozoa, The Botany School, Downing Street, Cambridge) was cultured axenically in 5 mL of the standard medium (PPYE), containing proteose peptone (1.5%, w/v) and yeast extract (0.25%, w/v) (Figure 2).
- The culture was then inoculated with 1% (v/v) *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) preculture in the same medium and incubated at 28 °C without shaking for 72 h [7].
- At the end of the incubation time, the culture (6×10^6 cells/mL) was then harvested at the exponential phase by centrifugation at 5000 rpm for 5 min at 4 °C.

▲ CRITICAL STEP To remove the medium completely, decant the medium from the centrifuge tube after centrifugation, invert the centrifuge tube on a paper towel to remove any residual liquid, then tap the tube gently on the paper towel to remove any liquid stuck to the sides of the tube.

▲ **CRITICAL STEP** To get more culture for DNA extraction, repeat the above process by adding more culture to the same centrifuge tube.

- After removing the medium, wash the protozoa cells with 500 μ L ice cold Tris–EDTA (TE) solution (Tris–EDTA: 100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0), resuspend the protozoa pellet by vortexing or slow rounds of pipetting, and centrifuge at 4 $^{\circ}$ C for 10 min at 5000 rpm.
- Afterwards, completely remove the supernatant from the tube, add 3.5 mL of TE solution, and resuspend the protozoa pellet by vortexing or slow rounds of pipetting; then, divide it into aliquots of 1 mL and submit to DNA extraction, as reported below.

OPTIONAL STEP We follow the proliferation of a cell population with regards to their DNA content using flow cytometry (BD Accuri C6 Plus).

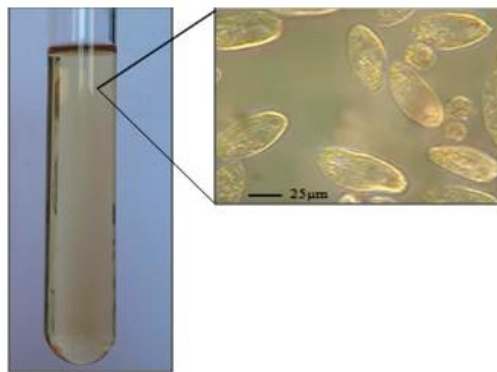


Figure 2. Microscopic image of *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) in proteose peptone-yeast extract medium ($\times 100$).

3.2. DNA Extraction Methods

3.2.1. Sodium Dodecyl Sulphate 20%/Triton X-100 (the Addition of Mixed Surfactant)

1. Preparation of the 20% SDS solution/Triton X-100 complexes (time for fulfillment: 1 h, Figure 3):

- To perform the SDS/Triton X-100 extraction method, the extraction complex 20% SDS solution/Triton X-100 was prepared beforehand.

OPTIONAL STEP If sodium dodecyl sulfate (20% solution) is not available, it can be prepared with SDS solid. To prepare 100 mL of SDS (20% solution), weigh 20 g of SDS in a 250 mL conical flask/beaker. Add 80 mL deionised/Milli-Q water and mix, heat to 68 $^{\circ}$ C. Adjust the volume to 100 mL with deionised/Milli-Q water and mix again.

- SDS (20% solution) and Triton X-100 (mass ratios of 0, 20, 40, 60, 80, and 100 wt %) were mixed intensively in a vortex mixer, and placed in a water bath at 25 $^{\circ}$ C for 45 min.

▲ **CRITICAL STEP** If there SDS in the solvent precipitate, re-dissolve it by warming the mix at 60 $^{\circ}$ C for 10 min.

Ⓜ **PAUSE STEP** The mix can be stored at room temperature for several months. Do not store the SDS (20% solution) at 4 $^{\circ}$ C, because SDS will precipitate at temperatures below 15 $^{\circ}$ C.

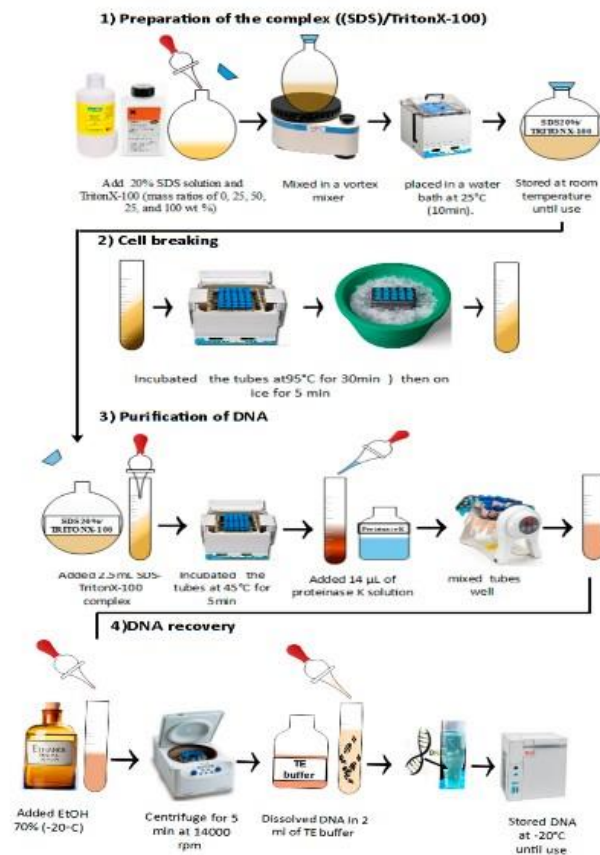


Figure 3. Schematic representation of the SDS 20%/Triton X-100 method for the extraction and purification of DNA from *Tetrahymena pyriformis*.

2. Cell breaking using thermal shock methods (time for fulfillment: 30 min, Figure 3):
 - The tubes (1 mL protozoa pellet) were incubated in a water bath at 95 °C for 20 min (intermittently vortexing every 5 min).
 - The tubes were put on ice for 10 min.
3. Purification of DNA (time for fulfillment: 10 min, Figure 3):
 - A total of 2.5 mL of the SDS/Triton X-100/H₂O complex was added to the tube.
 - The tubes were incubated in a water bath at 45 °C for 5 min.
 - After that, 14 µL of proteinase K solution (20 mg/mL) was added to the suspension, and the tubes were mixed well.
4. DNA recovery (time for fulfillment: 20 min, Figure 3)
 - First, 500 µL of 70% ethanol was added to the tube.
 - The tube was closed and inverted several times

- The tubes were centrifuged at 14000 rpm (maximum speed) for 10 min at 25 °C.
- The supernatant was completely removed.

OPTIONAL STEP To remove the supernatant, one can decant the supernatant after the first centrifugation.

▲ CRITICAL STEP Take care with this step, as the pellet sometimes does not adhere tightly to the tube and can be lost while removing the supernatant.

- Liquid remains will be stuck on the wall of microcentrifuge tube.
- A second flash spin is sufficient to collect all the liquid at the bottom, which can be then removed by pipetting.
- The pellet was air dried for 5 min.
- The traces of ethanol must then be removed, as they may inhibit some enzyme reactions and dissolve the pellet in 25 µL sterile double distilled water or TE (pH 8.0).

▲ CRITICAL STEP Do not overdry the pellet; overdried pellets are difficult to dissolve.

OPTIONAL STEP To dissolve the pellet, one can vortex the solution gently for a brief period and also incubate it at 37 °C for ~20 min.

Ⓜ PAUSE STEP The solution can be stored at 4 °C for a few days or stored at –20 °C for years

3.2.2. DNA Extraction by Chelex 100 Resin APD Complex and SDS–Chloroform

The extraction of DNA by the Chelex 100 matrix APD complex and SDS–chloroform methods was conducted as described in Table 2, and according to Fenicia et al. [8], Manaffar et al. [9], and Sambrook and Green [10].

3.3. Cost and Time Consumed

The cost for each method was estimated based on the price of chemicals, enzymes, and disposable items (including microfuge tubes and pipette tips) consumed for one extraction from a single pellet. The time required to finish one extraction from a single pellet for each method was estimated.

3.4. Evaluation of the Genomic DNA Quality, Quantity, and Integrity

A quantitative spectrophotometric assay of DNA was performed using NanoDrop and Qubit. Absorbance was measured at wavelengths of 260 and 280 (A_{260} and A_{280} , respectively) nm. The absorbance quotient (A_{260}/A_{280}) provides an estimate of DNA purity. An absorbance quotient value of $1.8 < \text{ratio (R)} < 2.0$ was considered to be good, purified DNA. A ratio of <1.8 is indicative of protein contamination, where as a ratio of >2.0 indicates RNA contamination. A total of 5 µL of DNA was run on a 1% agarose gel and visualized by UM illumination.

3.5. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been used extensively to prove that both compartments (micronucleus and macronucleus) have been isolated. PFGE was performed in a 1% agarose gel with 0.52 XTBE buffer (Tris-borate-EDTA) at 8 °C in a Rotaphor (Biometra). The voltage was set at 200 to 150 V/cm, and the pulse times ranged from 10 to 100 s (log). The pulse angle ranged from 120 to 110 (lin) with ramping. The electrophoresis lasted for 24 h. Afterward, the gel was stained with ethidium bromide in the same buffer [11].

Table 1. Primer sequences, final concentrations and annealing temperatures for the primers used for measuring the degradation of DNA.

Primer Set (Reference)	Sequence (5'-3'), (3'-5')	Denaturing (°C; min)	Annealing (°C; min)	Elongation (°C; min)	N° Cycles
Metallothionein (MT) primers [12]	CGTGAATAAAATGGATAAGGTAATAA, CATTGCAACATTCACAAGTCCTAC	94; 3.5	55; 0.4	72; 0.3	30

Table 2. Summary of results from comparative study of DNA extraction methods.

DNA Extraction Methods	DNA Extraction Protocol Stage				Time Required (min)	Toxic Compound	Cost Per Sample (US\$)	A260/280 ¹	NanoDrop µg/µL	Qubit µg/µL
	Cell Lysis	Denaturation of Nucleoproteins	Removal of Contaminants	DNA Precipitation						
SDS-TritonX100	Thermal shock	Proteinase K	SDS/Triton X-100	Ethanol	2 h	None	< 3	1.81	34.75	33.77
Chelex100matrix	Heat	Chelex/Proteinase K	Chelex	Isopropanol	3 h	Isopropanol	< 3	1.84	2.62	2.08
APD complex	SDS	Proteinase K	Ammonium Pyrrolidine Dithiocarbamate	Ethanol	3 h	None	> 3	ND	ND	ND
SDS-chloroform	SDS	Phenol/Proteinase K	Phenol-chloroform isoamyl alcohol	Ethanol	6 h 40 min	Phenol, chloroform	< 3	1.08	30.87	28.79

ND: not detected. ¹ A ratio of approximately 1.8 is accepted as pure DNA. Lower values might be related to the presence of phenol, or other reagent residues used in the DNA extraction. ² SDS/Triton X-100: this SDS and Triton X-100 ratio (40/60) provided the best result.

3.6. Polymerase Chain Reaction Amplification of the Metallothionein (MT) Gene

PCR amplification of *metallothionein (MT)* gene was done in duplicates, using primers targeting the protist *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) (Table 1). Reaction mixtures contained 50 μL of 1 \times buffer KCl–MnCl₂ (Fermentas), 1.5 mM MnCl₂, 0.5 mM deoxynucleotide solution (dNTPs), 100 pM of each primer set, 1 μL Taq Polymerase Recombinant (1 U μL 174 –1) (Life Technologies, Nærum, Denmark), 350 ng of the extracted DNA, and 2.5 units of Taq DNA polymerase was prepared in a 300 μL PCR tube. The PCR conditions are described in Table 1. Subsequently, 5 μL of PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel in 1XTAE buffer.

3.7. Restriction Enzyme Digestion Analysis

The restriction digestion of the PCR products was carried out with the HindIII enzyme. The PCR products were exposed to digestion by the restriction endonuclease, in a total volume of 20 μL (10 μL PCR product, 2 μL enzyme buffers, 0.2 μL enzymes, and 7.8 μL distilled water), and placed in the incubator at 37 °C for 8 h. The digested products were analyzed on 2% agarose gel. The restriction products were analyzed by electrophoresis (Bio-Rad) on a 1% agarose gel, and the molecular weight of restricted fragments was analyzed by gel documentation systems (G-Box; Syngene) after ethidium bromide (Himedia) staining [12].

4. Expected Results

DNA was extracted from *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) using the supplementation of the mixed surfactant (SDS/Triton X-100) with different ratios (0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%). The purity and yield of genomic DNA samples were estimated with NanoDrop for the purpose of evaluating parameters like quality and quantity (Figure 4a). The DNA yields were consistently approximately 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for all tested samples and replicates. In addition, the DNA was accepted as pure, since the A260/280 ratio was 1.8. Using this measurement method, the A260/280 ratio varied from 1.06–1.80. There was a linear correlation between the starting SDS/Triton X-100 ratio and the purity of the extracted DNA. Based on our results, we observed that the optimal SDS/Triton X-100 ratio for the successful extraction of DNA was 40% SDS/60% Triton X-100 (A260/A280 = 1.81).

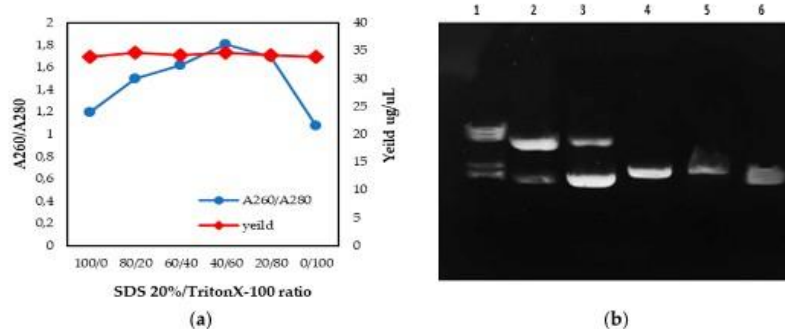


Figure 4. DNA was extracted and purified from *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) using the SDS 20%/TritonX-100 method. (a) Overview of DNA quality and quantity (NanoDrop), according to the SDS/Triton X-100 ratio—a description of what is contained in the second panel. (b) Electrophoretic analysis of *Tetrahymena pyriformis* DNA, isolated using various SDS/Triton X-100 ratios. Each lane indicates a different sample (Lane 1: 100/0; Lane 2: 80/20; Lane 3: 60/40; Lane 4: 40/60; Lane 5: 20/80; Lane 6: 0/100).

The integrity of the extracted DNA was determined by gel electrophoresis. As shown in Figure 4b, lane 4 (40% SDS/60% Triton X-100) appeared to correspond to a high-quality extract. Lanes 1, 2, and 3

showed more than one band, and lanes 5 and 6 showed a non-pure band. This suggests that the DNA in lane 4 was neither contaminated with RNA nor degraded, compared to the DNA in the other lanes; this confirmed the results found with NanoDrop ($A_{260}/A_{280} = 1.81$).

The efficiency of our SDS/Triton X-100 ratio was then compared with three widely-used alternative techniques, namely the Chelex 100 matrix APD complex and SDS–chloroform methods. As shown in Table 2, data analysis revealed that the time required (min), toxic compound, cost estimate per sample (in USD), and quality and quantity of the recovered DNA varied depending on the DNA extraction method. The highest quality of DNA (A_{260}/A_{280}) was obtained by the SDS/Triton X-100 and Chelex 100 matrix methods (1.81 and 1.84, respectively, where a ratio of approximately 1.8 is accepted as pure DNA). In addition, the maximum yield was obtained with the SDS/Triton X-100 method (34.75 and 33.77 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for NanoDrop and Qubit, respectively), while no DNA was detected for the APD complex method. The required time for different methods uses for DNA extraction varied from 2 h up to 6.4 h. The SDS/Triton X-100 method was the fastest compared to other methods used, although no toxic compound was used and the cost estimate per sample $< \$3$ USD.

Figure 5a shows the DNA results visualized by agarose gel electrophoresis. The extracts from the Chelex 100 matrix (lanes 1 and 2) and SDS/Triton X-100 (lanes 3 and 4) methods generated clean single bands, while the SDS–Chloroform method (lanes 7 and 8) gave a larger range of fragment sizes. Regarding the APD complex method, no positive bands were detected in the gel electrophoresis (lanes 5 and 6).

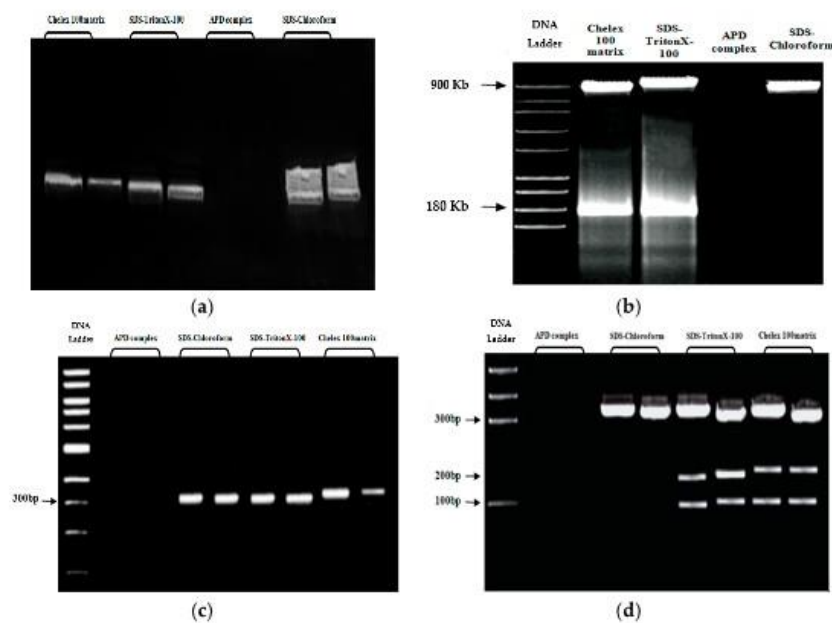


Figure 5. Electrophoretic analysis (a), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis (b), electrophoresis analysis of the PCR product (c), and electrophoresis analysis of the polymerase chain reaction (PCR) product after digestion with HindIII restriction enzyme (d) of DNA extracted from *Tetrahymena pyriformis* using various extraction methods.

To prove that both compartments (micronucleus and macronucleus) have been isolated, the DNA extracts from all methods were further subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). As shown in Figure 5b, PFGE generated two bands—one for macronuclear DNA, with a size of 180 kb, and very

prominent band for micronuclear DNA, with a size of 900 kb. In a previous study, the macronuclear DNA of *Tetrahymena* was found to fluctuate between 100kb to 1500 kb, while the micronuclear DNA is much larger [13–15].

In order to confirm their suitability for amplification, DNA extracts were subsequently subjected to PCR analysis for *metallothionein* (MT) gene-specific primers. Figure 5c shows the results of PCR amplification of DNA isolated from *Tetrahymena pyriformis* (GL, L 1630/1) using different extraction methods. All extracts had positive amplification of the *metallothionein* gene (310 bp), except for the DNA extracted by the APD complex method (Lanes 1–2).

The restriction digestion of the PCR products was carried out. As it is seen in Figure 5d, digestion of a 310 bp fragment of *metallothionein* (MT) gene by HindIII restriction endonuclease generated three clear bands (310, 220, 104 bp) for the Chelex 100 matrix and SDS/Triton X-100 methods and one band (310 bp) for the SDS–Chloroform method, while no band was observed for the APD complex method.

5. Conclusions

Here, we report a simple method for the extraction and purification of DNA from *Tetrahymena pyriformis*. The efficiency of this technique was compared to three widely-used alternative techniques, namely the Chelex 100 matrix APD complex and SDS–chloroform methods. We demonstrated that the improved method using SDS/Triton X-100 was the easiest and most cost-effective, and was more suitable for molecular applications, such as the extraction and purification of DNA from *Tetrahymena pyriformis* compared to the other methods.

Author Contributions: Conceptualization, E.E.M.; validation and formal analysis, all; investigation, B.N. and K.M.; writing—original draft preparation, E.E.M., M.L., and Y.E.K.; writing—review and editing, all; Supervision, E.E.M., B.N., and K.M.; project administration, E.E.M., B.N., and M.K.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Many thanks to Nagib Qarah (Al-Hodeidah University, Department of chemistry) and Aajmi Abderrahman (Ibn Zohar University, Laboratory of engineering and process, Department of chemistry) for the assistance and support in PCR amplification and pulsed-field gel electrophoresis analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Darcy, P.; Kelly, J.P.; Leonard, B.E.; Henry, A.B. The effect of lofepramine and other related agents on the motility of *Tetrahymena pyriformis*. *Toxicol. Lett.* **2002**, *128*, 207–214. [[CrossRef](#)]
2. Leick, V.; Bog-Hansen, T.C.; Christensen, S.T.; Kaufman, S.J. Concanavalin A Receptors and the Chemosensory Behaviour of *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Biol. Online* **1996**, *1*, 1–12. [[CrossRef](#)]
3. Yu, S.; Geng, J.; Zhou, P.; Wang, J.; Chen, X.; Hu, J. New hydroxyapatite monolithic column for DNA extraction and its application in the purification of *Bacillus subtilis* crude lysate. *J. Chromatogr.* **2008**, *1183*, 29–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kan, C.W.; Fredlake, C.P.; Doherty, E.A.S.; Barron, A.E. DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3564–3588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Barbosa, C.; Nogueira, S.; Gadanho, M.; Chaves, S. DNA extraction: Finding the most suitable method. In *Molecular Microbial Diagnostic Methods*; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 135–154.
6. Fenicia, L.; Anniballi, F.; De Medici, D.; Delibato, E.; Aureli, P. SYBR Green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2891–2896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Pousada, R.C.; Cyrne, M.L.; Hayes, D. Characterization of Preribosomal Ribonucleoprotein Particles from *Tetrahymena pyriformis*. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *102*, 389–397. [[CrossRef](#)]
8. Walsh, P.S.; Metzger, D.A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* **2013**, *54*, 506–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Manaffar, R.; Maleki, R.; Zare, S.; Agh, N.; Soltanian, S.; Sehatnia, B.; Sorgeloos, P.; Bossier, P.; Van, G. A New Method for Rapid DNA Extraction from *Artemia* (Branchiopoda, Crustacea). *Int. J. Bioeng. Life Sci.* **2010**, *6*, 123–127.

10. Green, M.R.; Sambrook, J. Molecular cloning. In *A Laboratory Manual*, 4th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2012.
11. Carle, G.F.; Frank, F.; Olson, M.V. Electrophoretic separations of large DNA molecule by periodic inversion of electric field. *Science* **1986**, *232*, 65–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cheung, A.; Pok, L.; Vincent, K.L.L.; King, M.C. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1731*, 654–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Conover, R.K.; Brunk, C.F. Macronuclear DNA Molecules of *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 900–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yao, M.C.; Gorovsky, M.A. Comparison of the DNA sequences of *Tetrahymena* macro- and micronuclei. *Chromosoma* **1974**, *48*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yao, M.C.; Yao, C.H. Repeated hexanucleotide C-C-C-A-A is present near free ends of macronuclear DNA of *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7436–7439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 5.

36 ROS enzymes such as reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione
37 peroxidase (GPx) respectively [4]. Loss of balance between ROS generation level and antioxidant defence
38 activity triggers the cellular oxidative stress [5]. A major consequence of long-term ROS exposure induced by
39 iron overload is cell DNA damage, thereby causing a chronic imbalance in cellular metabolism, leading to
40 disease such as neurodegenerative and cardiovascular diseases, as well as diabetes and cancer [1]. Generally,
41 synthetic antioxidants provide possibilities to protect and treat oxidative damage by inhibiting or scavenging free
42 radicals [5]. Although some synthetic antioxidant drugs have been developed in the past few years, their use in
43 health has been restricted due to their adverse side effects [6]. During the last decade, medicinal plants have
44 generally earned more interest as potential sources of natural antioxidant and/or as sources of precursors in drug
45 development.

46 *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. (ZSC) belongs to the *Rhamnaceae* family. It is a tropical evergreen commonly
47 known as Sidr and Nabeq or Nabaj in North Africa, armed shrub or evergreen tree, which can reach a 20 m
48 height; producing edible sweet fruits, bark light grey [7, 8]. *Ziziphus* has been extensively used in the folk
49 medicine for curing many diseases including malaria, anemia, weakness, digestive disorders, constipation,
50 diarrhea, dysentery, hepatic diseases, urinary problems, ulcers, diabetes, tuberculosis, pneumonia, cough, fever,
51 obesity, skin infections, heal wounds, sores, against ringworm, sex diseases heal swellings, antispasmodic,
52 purgative and against gonorrhoea and scorpion stings [8, 9]. Phenolic compounds are powerful chain-breaking
53 agents, representing good antioxidants [10]. The extensive investigation carried out on phytochemical,
54 pharmacological activities of ZSC fruits, leaves, bark, and roots reveal that the plant possesses many biologically
55 active compounds, including cyclopeptide alkaloids (such as spinanine A, tanines), flavonoids (such as rutin and
56 quercetin derivatives), triterpenoid saponins and saponins (betulinic acid) [8, 11]. However, information
57 regarding phytochemical, pharmacological activities of ZSC seed (ZSCS), pulp (ZSCP) and almond (ZSCA),
58 remains unknown. It is unclear whether or not this plant has any antioxidant and protective effects against
59 oxidative DNA damage. Therefore, this study aimed to explore the phytochemical composition, antioxidant
60 potential and cytotoxic effects of aqueous extracts of ZSCS, ZSCP and ZSCA. In addition, the protective effects
61 of ZSCS against oxidative and DNA damage induced by iron overload were explored *in vitro*.

62 **Materials and methods**

63 **Plant material**

64 Ripened fruits of *Z. spina-christi* (ZSC) were collected in June 2018 from the field in Settat city, Morocco
65 (32°52'49.3"N6°46'10.5"W). The plant was authenticated and identified by a Taxonomist and deposited at the
66 local Herbarium of the Biology Department at the University Hassan I (Morocco). ZSC fruits randomly selected
67 were cleaned with distilled water, carefully separated into almonds, pulps and seeds and, powdered in a heavy-
68 duty grinder, then packaged separately in airtight containers at room temperature ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) for later analyses.

69 **Preparation of plant extracts**

70 The aqueous extracts were performed by the soaking method according to [12]. Briefly, dried almonds, seeds or
71 pulps (100g) were pulverized and macerated twice with 250mL of bidistilled water for 72 h (4°C). After filtering
72 through a paper filter, the filtrates were concentrated under reduced pressure at $40 \pm 5^\circ\text{C}$. Then, the residue was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

73 lyophilized to give a brown powder (yield: 16-19%). The final products were named: seed extract of *Z. spina-*
74 *christi* (ZSCS), pulp extract of *Z. spina-christi* (ZSCP) and almond extract of *Z. spina-christi* (ZSCA)
75 respectively. The stock solutions for the bioassays were prepared by dissolving each extract in bidistilled water
76 to a final concentration of 100 mg/mL, and then stored at 4 °C until use.

77 **Evaluation of total polyphenols content and antioxidant activities**

78 Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride colorimetric assay were used for determining the total phenolic
79 (TPC) and flavonoid contents (TFC) respectively. The obtained values were expressed as equivalents of standard
80 compounds, using gallic acid for TPC (mg GAE/g extract) and rutin for TFC (mg RE/g extract) [12].
81 Antioxidant activities were determined according to [13] by different methods, including metal chelating assay
82 (MCA), cupric ion reducing capacity assay (CUPRAC), and ferric reducing power assay (FRAP). The MCA
83 values were mentioned as equivalent of EDTA per gram dry weight (mg EDTAE/g DW), while CUPRAC and
84 FRAP assay values were expressed as equivalent of quercetin per gram dry weight (mg QE/g DW).

85 **HPLC-DAD analysis**

86 Phenolics profiling were performed by High-Performance Liquid Chromatography system from Agilent
87 Technology (1200 series), which includes a quaternary pump, a thermostatic auto-sampler, a column oven and a
88 diode array detector (DAD) plus on-line degasser. The separation was carried out using a Zorbax SB-C₁₈
89 analytical column (4.6 mm×150 mm, I.D., 3.5 µm particle size, supplied by Agilent Technologies, USA). The
90 binary phase was performed according to Tsao & Yang procedure [14]. Gradient elution with mobile phase
91 consisting of (A) 6% acetic acid in 2mM sodium acetate (final pH 2.55, v/v) and (B) pure acetonitrile as
92 solvents. The nonlinear gradient elution program was utilized. Pure acetonitrile percentage was 40% (in the
93 initial time), 0-15% (27 min), 15-30% (9min), 30-50% (3 min) and 50-100% (3 min). All solvents were filtered
94 and degassed through a 0.45-µm nylon filter before analysis. A 10µL injection value was used in all analysis,
95 and the column temperature 35 °C. Phenolic identification was achieved by comparing retention times and UV-
96 Vis spectra with those of standards, purchased from Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St. Louis, MO, USA).

97 **Cell culture and treatments**

98 *Tetrahymena pyriformis* cells (strain *GL L 1630/1*), from the Culture Collection of Algae and Protozoa
99 (Downing Street, Cambridge), were seeded in 5 mL of the standard medium PPYE (1.5% w/v protease peptone,
100 0.25% w/v yeast extract). Medium was changed every 48 h. *Tetrahymena pyriformis* cells were cultured at
101 1x10⁵ cells/ well and exposed to ZSCS, ZSCP or ZSCA extract at concentrations ranging from 0.1 to 1000
102 µg/mL during 72 h. Regarding the evaluation of the protective effect of ZSC against FeCl₂ toxicity, cells were
103 preincubated with 100 µg/mL of ZSCS for 24 h, and then 100 µM Iron (II) chloride (FeCl₂) was added to the
104 culture medium and further incubated for 4 h. The control group cells were incubated with a medium alone. The
105 extract concentration giving an appropriate effect was selected according to Heinrich et al. [15]. The
106 concentration of FeCl₂ and time duration of the treatment was selected according to Francis et al. [16] as well as
107 on preliminary studies performed in our laboratory using flow cytometry BD Accuri C6 Plus (data not shown).

108 **Analysis of cell viability**

109 Conventional MTT reduction assay was used to assess cell viability as previously described [17]. Cells were
110 treated with MTT solution (0.5 mg/mL) and incubated for 4 h at 37 °C. The dark blue formazan crystals formed
111 in intact cells were solubilized in DMSO and spectrophotometrically measured at 595 nm using a micro-plate
112 reader (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Cell viability was expressed as the percentage of non-
113 treated cells.

114 **Analysis of intracellular iron accumulation**

115 The cellular iron uptake was validated by the quantification of the total iron content of cells using ferrozine
116 assay, according to Bowlus [18]. Briefly, cells were lysed for 2h with NaOH (50mM), 100µ L of cell lysates was
117 mixed with 100 µL of HCl (10mM), and 100 µL of the iron releasing reagent. The mixtures were incubated for
118 2h, and 30 µL of iron-detection reagent was added. After 30min, 280µl aliquot of each sample was transferred to
119 a well of a 96-well plate in triplicates, and the absorbance at 550 nm was recorded. FeCl₃ (0–300mM), was used
120 as iron standards. For histochemical analyses of intracellular iron using Perl's Prussian blue staining, TEP cells
121 were washed 3 times with PBS, fixed with 4% glutaraldehyde for 10 minutes, and incubated with 2mL of
122 Prussian blue solution for 1h (37°C). Following this, the cells were stained for 3 minutes with 0.5% neutral red,
123 and then iron staining was visualized by Nikon microscope [19].

124 **Oxidative stress markers and lipid peroxidation**

125 After exposure to extract and FeCl₂ treatments, cells were harvested and washed twice with PBS at 4°C for 6min
126 at 1500 rpm. The cell pellet was then sonicated at 15W for 10 s (3 cycles) to obtain the cell lysate. Protein
127 content was measured by the method of Lowry et al. [20] using BSA as standard. Superoxide dismutase (SOD)
128 assay was done according to the method of Nishikimi et al. [21]. The absorbance of the reaction mixture was
129 recapitulated at 480 nm. SOD activity was expressed as absorbance at 480nm/min/mg protein (U/mg protein).
130 Catalase (CAT) assay was determined, according to Aebi [22]. Change in the absorbance of the reaction solution
131 was measured at 240 nm after 1 min. CAT activity was expressed as absorbance at 240nm/min/mg protein
132 (U/mg protein). Glutathione peroxidase (GPx) assay was determined, according to Paglia et al. [23]. The
133 remaining GSH at the end of the reaction was complexed with DTNB, which has a maximum of absorbance at a
134 wavelength of 412nm. Enzyme activity was expressed as absorbance at 412nm/min/mg protein (U/mg protein).
135 Glutathione reductase (GR) assay was determined according to Factor et al. [24]. The absorbance was measured
136 at 420 nm. GR activity was expressed as absorbance at 420nm/min/mg protein (U/mg protein). The lipid
137 peroxidation (LPO) biomarker, the Malondialdehyde (MDA) was determined as described by Ohkawa et al. [25].
138 The end product of LPO, MDA, was measured as thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS). The
139 concentration of TBARS was represented as nmol/mg protein.

140 **Analysis of DNA damage**

141 Total DNA of the TEP cells was extracted using SDS/Triton X-100 extraction method according to El maaiden
142 et al. [26]. A quantitative spectrophotometric assay of DNA was conducted using Qubit and NanoDrop. To prove
143 that both compartments (micronucleus and macronucleus) have been isolated, the DNA extracts were further
144 subjected to pulsed-field gel electrophoresis. For DNA integrity, 5 µL of DNA (33.77 and 34.75 µg/ µL for Qubit
145 and NanoDrop, respectively) was run on agarose gel (1%) and visualized by UM illumination. PCR
146 of metallothionein (MT) gene was done using primer (5'CGTGAATAAAATGGATAAGGTTAATAA3',

147 5'CATTGCAACATTACACAAGTCTTAC3'). Subsequently, 5 µL of PCR products were analyzed by
148 electrophoresis on agarose gel (1%) in 1xTAE buffer. Each PCR product was digested with HindIII. The
149 restriction reaction products were electrophoresed on agarose gel (1%), stained with ethidium bromide, and
150 analyzed by gel documentation systems as described previously by El maaiden et al. [12].

151 **Statistical analysis**

152 Data obtained in all bioassays were expressed as the means ± standard deviation (SD), using the program SPSS
153 version 2.1 for Windows (IBMSPSS Inc., Chicago, IL, USA). The variables between treated and control samples
154 were compared using the Student–Newman–Keuls test. Statistical significance was considered if P-values were
155 <0.05.

156 **Results and Discussion**

157 **Chemical profile and in vitro antioxidant activities**

158 Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of different *Ziziphus* extracts were appraised
159 using Folin-Ciocalteu and aluminium chloride colorimetric methods, respectively. Table 1 show that among the
160 extracts examined, ZSCS had the highest TPC (74.46 mg GAE/g DW), followed by ZSCA (31.05 mg GAE/g
161 DW) and ZSCP (30.97 mg GAE/g DW). The TFC was ranged from 5.05 ± 1.09 to 19.85± 1.56 mg RE/g DW,
162 and the higher contents of flavonoids were found in ZSCS extract (Table 1). The richness of ZSCS extract in
163 TPC and TFC highlighted in this study corroborate with the previous report [27-29]. In line with the results
164 obtained with the spectrophotometric method, the HPLC-DAD analysis showed a rich phenolic composition that
165 differs significantly (quantitatively and qualitatively) among extracts (Table 2). This analysis revealed 21
166 different secondary metabolites; most of them are flavonoids and phenol acid. Most of these phenolic
167 compounds were identified in the ZSCS extract, while the ZSCA extract exhibited a weak composition. In
168 contrast, Gallic, caffeic, chlorogenic, cyanidin-3-galactosidase and sinapic acid were identified in all extracts.
169 The most abundant compounds in ZSCS were anthocyanin, caffeic acid, and rosmarinic acid at 586.09, 576.33
170 and 560.08 µg/g respectively; in ZSCP extract, was syringic acid at 269.55 µg/g, and for ZSCA extract was
171 sinapic acid at 185.67 µg/g. Several studies have been carried out on whole fruit, leaves, bark and roots of ZSC
172 [10]. Most of them are consistent with our data, showing that the main phytoconstituents of *Ziziphus spina-*
173 *christi* were flavonoids, phenolic acids and alkaloids [8, 30-32].

174 Antioxidant activities of the obtained extracts from different ZSC fruit parts were evaluated by reducing power
175 (CUPRAC and FRAP), and metal chelating assays (MCA). As summarized in Table 1, among the tested
176 extracts, the highest CUPRAC radical scavenging activity was observed in ZSCS extract (43.63 mg QE/g DW),
177 followed by ZSCA extracts (34.38 QE/g DW). ZSCA extract possessed the highest FRAP value (64.89 mg QE/g
178 DW), whilst the ZSCP extract was less potent (23.69 mg QE/g DW). Regarding MCA, our results showed
179 considerable chelating activity for ZSCS followed by ZSCA and ZSCP extracts (Table 1). Chelating agents are
180 the compounds which bind with prooxidant metals and are effective as bioactive antioxidants [33]. The
181 antioxidant activities recorded may be attributed to the phenol and/or flavonoid compounds identified in
182 different fruit part extracts, particularly in seeds. These phenolic compounds are potent reducing agents, causing
183 an increase in antioxidant capacity through the reduction of the oxidized state of the antioxidant compounds [34].

184 **Table 1.** Total bioactive component and *in vitro* antioxidants activities of *Ziziphus spina-christi* extracts.

	ZSCP	ZSCS	ZSCA
TPC (mg GAE/g DW)	30.97 ± 0.67 ^b	74.46 ± 2.12 ^a	31.05 ± 1.30 ^b
TFC (mg RE/g DW)	5.05 ± 1.09 ^c	19.85 ± 1.56 ^a	8.65 ± 0.78 ^b
FRAP (mg QE/g DW)	23.69 ± 0.36 ^c	43.14 ± 1.83 ^b	64.89 ± 0.39 ^a
CUPRAC (mg QE/g DW)	24.78 ± 0.16 ^c	43.63 ± 0.09 ^a	34.38 ± 0.55 ^b
MCA (mg EDTAE/g DW)	61.37 ± 1.49 ^c	81.19 ± 1.19 ^a	72.36 ± 1.67 ^b

185 Values expressed as means ± S.D. of four parallel measurements (n=4); means with different superscript letters in the line are significantly
 186 (p < 0.05) different; with **a**, indicates the highest and **c** the smallest value. ZSCA, *Ziziphus spina-christi* almond; ZSCP: *Ziziphus spina-*
 187 *christi* pulp; ZSCS: *Ziziphus spina-christi* seed; TPC: Total phenolic content; TFC: Total flavonoid content; GAE: Gallic acid equivalents;
 188 RE: Rutin equivalents; QE: Quercetin equivalent; FRAP: ferric reducing antioxidant power; CUPRAC: cupric reducing antioxidant
 189 capacity; MCA: chelating metal activity.

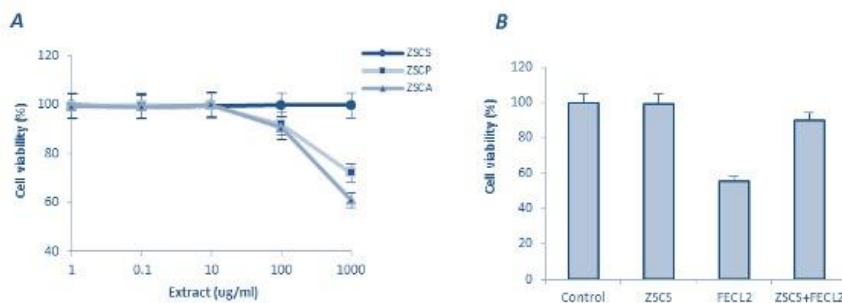
190 **Table 2.** HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in *Ziziphus spina-christi* extracts.

Compound (µg/g DW)	Rt (min)	ZSCP	ZSCS	ZSCA
Galic acid	2.49	5.09 ± 1.23 ^b	13.38 ± 1.66 ^a	3.00 ± 0.84 ^b
Procyanidin B1	3.88	2.89 ± 1.00 ^a	nd	nd
Catechin	5.48	1.28 ± 1.66 ^b	10.98 ± 2.78 ^a	nd
Procyanidin B2	6.89	63.22 ± 10.21 ^b	425.44 ± 11.35 ^a	nd
Chlorogenic acid	7.11	33.80 ± 2.66 ^a	15.00 ± 4.88 ^b	8.00 ± 1.77 ^c
Cyanidin-3-galactosidase	8.25	36.77 ± 4.12 ^b	131.78 ± 12.78 ^a	22.85 ± 2.60 ^{bc}
Caffeic acid	9.82	52.19 ± 17.02 ^b	576.33 ± 23.19 ^a	2.78 ± 0.92 ^c
Anthocyanin	10.64	1.27 ± 0.78 ^c	586.09 ± 34.77 ^a	nd
Epicatechin	12.20	11.33 ± 1.56 ^b	73.66 ± 12.66 ^a	nd
Cyanidin-3-rutinoside	12.88	10.27 ± 0.80 ^b	43.88 ± 15.03 ^a	nd
p-Hydroxybenzoic acid	24.59	nd	113.45 ± 11.30	nd
Vanillic acid	28.00	nd	13.79 ± 1.09	nd
Syringic acid	23.09	269.55 ± 22.89 ^a	210.04 ± 28.66 ^b	nd
Ferulic acid	31.07	125.22 ± 11.67 ^a	nd	nd
Sinapic acid	31.79	171.88 ± 31.02 ^a	119.78 ± 10.55 ^b	185.67 ± 12.67 ^a
Naringin	33.58	1.23 ± 0.12 ^b	2.78 ± 0.78 ^a	nd
Rosmarinic acid	35.31	222.18 ± 34.89 ^b	560.08 ± 35.28 ^a	nd
Hyperin	35.67	1.18 ± 0.19 ^b	2.11 ± 0.73 ^a	nd
Avicularoside	35.90	nd	19.23 ± 1.37	nd
Resveratrol	36.15	19.33 ± 4.86 ^b	22.60 ± 2.82 ^a	nd
Quercetin	36.38	25.08 ± 1.83 ^b	31.78 ± 6.88 ^a	nd

191 Each value represents the mean of three independent measurements ± standard deviation (n = 3). Different letters in the same line indicate
 192 a significant difference (p < 0.05). nd: not detected. DW: dry weight of extract. ZSCP: *Ziziphus spina-christi* pulp; ZSCS: *Ziziphus spina-*
 193 *christi* seed; ZSCA, *Ziziphus spina-christi* almond.

194 **Effect of ZSC extracts and FeCl₂ on *T. pyriformis* viability**

195 Before determining whether the ZSC extracts had any protective activity against FeCl₂ damage, the cytotoxicity
 196 of these extracts in TEP cells was measured by MTT assay (Fig. 1A). TEP cells were cultured for 24 h and then
 197 pretreated with the ZSCS, ZSCA and ZSCP extracts (0.1 -1000 µg/mL). Cells treated with the aqueous extract of
 198 ZSCS showed no cytotoxicity even at high concentrations up to 1000 µg/mL, while ZSCA and ZSCP extracts
 199 were cytotoxic at 100µg/mL or higher concentrations. These results revealed that *Ziziphus* seed extract is
 200 virtually not toxic. To evaluate protective effect against FeCl₂ overload, *T. pyriformis* cells were pretreated
 201 ZSCS extract at 100 µg/mL for 24 h and then cells were exposed to FeCl₂ (100 µM, added to the medium) and
 202 incubated further for 4 h. Cells exposed to FeCl₂ (100 µM) alone revealed 50% significant decrease in their cell
 203 viability (Fig. 1B). In contrast, cells pretreated with ZSCS extract, exhibited almost 89 % viability in the
 204 presence of 100 µM FeCl₂. Interestingly, our data revealed that ZSCS extract significantly protected *T.*
 205 *pyriformis* cells against FeCl₂-induced cytotoxicity. To our knowledge, for the first time that we document the
 206 cytotoxicity of different ZSC fruit parts. Comparatively, McGaw et al. and Gadir reported the cytotoxicity of
 207 ZSC leaves, using crustacean Brine shrimp cell line, revealing an IC₅₀ of 300 µg/ mL [35, 36]. In addition, Abu-
 208 Raghif et al. [37] showed that leave ZSC methanolic extract has an anti-proliferative activity in human
 209 Rhabdomyosarcoma cells in a dose-dependent manner with an IC₅₀ at 154.44µg /mL. The MTT assay has also
 210 been used to investigate the cytotoxicity of leave ZSC extracts obtained with different solvents: hexane,
 211 chloroform, methanol, chloroform: methanol, methanol: water or butanol: water of towards Hela and MDA-MB-
 212 468 tumor cells. Among these different extracts, the chloroform: methanol extract was the most potent one [11].



213
 214 **Fig. 1** Effect of ZSC extracts and FeCl₂ on viability of TEP cells. **A)** Cells were incubated with various concentrations of
 215 ZSCS, ZSCA and ZSCP for 24 h then MTT assay was used to measure the cell viability. **B).** TEP cells were pretreated with
 216 ZSCS (100ug/ml) for 24 h, then exposed to 100 µM FeCl₂ for 4 h before MTT assay. Results were represented as mean ± SD
 217 (n=4). Control, cells incubated with medium only. ZSCP: *Ziziphus spina-christi* pulp; ZSCS: *Ziziphus spina-christi* seed;
 218 ZSCA, *Ziziphus spina-christi* almond.

219 **Protective effect of ZSCS extract against FeCl₂-induced oxidative stress and lipid peroxidation**

220 Free radicals' production is the primary mechanism linked to iron toxicity [3]. However, cell developed its
 221 antioxidant defense system, which is efficient at least a certain extent for the destruction of these free radicals.
 222 Accordingly, here we show that the treatment of *T. pyriformis* with ZSCS extract had no effect on the basal
 223 activity levels of the antioxidant enzymes (CAT, SOD, GPx and GR). However, when cells were overloaded
 224 with FeCl₂, the specific activities of CAT, SOD, GPx and GR decreased strongly by 50 to 70%. While lipid
 225 peroxidation increased by 65% (Table 3), revealing an iron-induced cellular oxidative stress. By contrast, *T.*

226 *pyriformis* pretreatment with ZSCS extract contracted the impact of FeCl₂ on antioxidant enzyme activities,
 1 227 showing 75 to 95% level of those measured in the control cells. In addition, even TBARS, as a marker of lipid
 2 228 peroxidation, return almost to the level of the control. The ability of *Ziziphus* extracts to inhibit lipid
 3 229 peroxidation and scavenge free radicals may be attributed, to their phenolic constituents, which can act as
 4 230 electron donors, reacting with the free radicals and convert them to more stable products [38, 39]. As shown
 5 231 here, ZSCS extract is rich in phenolic compounds, which are potent antioxidants and can inhibit the lipid
 6 232 peroxidation strongly. Indeed, a work carried out by Youssif et al. in the Wistar rats reported that ZSC fruits
 7 233 could protect the liver against carbon tetrachloride-induced oxidative damage [40], as well as the correlation of
 8 234 the hepatoprotective effect due to its antioxidant and free radical scavenger effects. This antioxidant activity of
 9 235 ZSC was also confirmed by Othman et al. [41]. Additionally, it was also reported that *Ziziphus* almond oil
 10 236 exhibited a higher antioxidant activity, which is ten times higher than BHT and Quercetin but still comparable to
 11 237 that measured for the pulp of the dry fruit [42, 43].

18 238 **Table 3.** Sustained effects of the ZSCS on the antioxidant enzyme levels in TEP cells overloaded with FeCl₂.

	Control	ZSCS	FeCl ₂	ZSCS+FeCl ₂
CAT (U/mg protein)	14.41 ± 0.128 ^a	14.22 ± 0.102 ^a	7.14 ± 0.113 ^c	13.78 ± 0.131 ^b
SOD (U/mg protein)	23.84 ± 0.105 ^a	24.01 ± 0.074 ^a	9.33 ± 0.140 ^c	17.91 ± 0.395 ^b
GPX (U/mg protein)	3.62 ± 0.111 ^a	3.40 ± 0.178 ^a	1.11 ± 0.044 ^c	2.26 ± 0.151 ^b
GR (U/mg protein)	1.64 ± 0.031 ^a	1.62 ± 0.040 ^a	1.01 ± 0.027 ^b	1.43 ± 0.024 ^a
TBARS (nmol/mg protein)	0.52 ± 0.027 ^b	0.51 ± 0.046 ^b	0.86 ± 0.029 ^a	0.59 ± 0.010 ^b

20 239 *All biochemical results are expressed as the mean ± S.D (n = 4). Different letters in the same line indicate a significant*
 21 240 *difference (p < 0.05). ZSCP: Ziziphus spina-christi pulp; ZSCS: Ziziphus spina-christi seed; ZSCA, Ziziphus spina-christi*
 22 241 *almond.*

23 242 **Protective Effects of ZSCS extract against the iron accumulation**

24 243 Perls's staining for ferric iron (catalytic) was used to study the involvement of ZSCS extract in preventing iron
 25 244 accumulation. ZSCS extract alone did not influence Perls's stain compared to control (P > 0.05, fig 2A). On the
 26 245 contrary, in TEP cells treated with FeCl₂, an accumulation of Fe³⁺ was observed. Pretreatment with ZSCS extract
 27 246 was able to modulate this accumulation. To confirm these data, the ferrozine-based colorimetric assay presented
 28 247 in this study permits the quantitation of iron in TEP cultured cells (Fig. 2B). Ferrozine forms a complex with
 29 248 ferrous iron that strongly absorbs light at 550 nm. As shown in Fig. 2B, there was a significant increase in iron
 30 249 accumulation in FeCl₂ treated cells. The ferrozine-based assay permits the quantitation of iron in cultured cells in
 31 250 levels ranging between 0.85 and 24.44 nmol. The basal amounts of iron in untreated cells were approximately
 32 251 0.85 nmol iron per mg protein. Incubation of the cells with FeCl₂ for 4h significantly increased the intracellular
 33 252 iron to 24.44 nmol per mg protein. However, the pretreatment with ZSCS extract significantly decreased this
 34 253 level to be 11 nmol per mg protein. Several phytochemicals in ZSCS extract as the polyphenolic flavonoid, in
 35 254 addition to their free radical scavenger property and modulation of defense genes expression [44], which can
 36 255 regulate the influx and/or efflux of the intracellular iron and reduce its accumulation inside the cell [1, 45].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

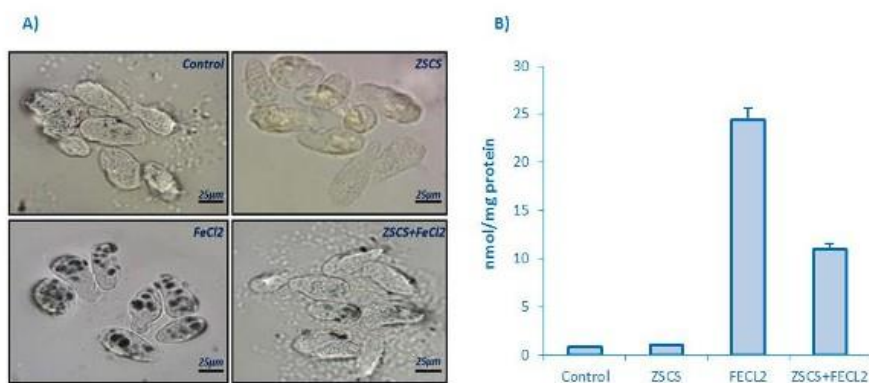
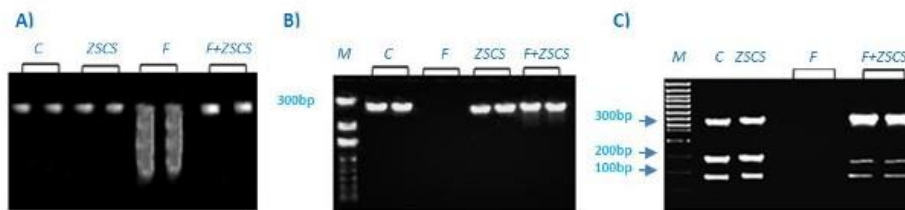


Fig.2 Protective effect of ZSCS against iron accumulation. **A)** Histological detection of iron by staining with Perls' Prussian blue. **B)** Cells iron quantification by the ferrozine assay. Results were obtained from four independent experiments (n=4) and were expressed as mean ± SD. Control: cell control; FECL₂: Cell treated with FeCl₂; ZSCS: Cell treated with ZSCS extract; ZSCS+FeCl₂: Cell pretreated with ZSCS than FeCl₂.

Protective effect of ZSCS extract against FECL₂-induced DNA damage

The ability of ZSCS to protect against FECL₂-induced DNA damage was further investigated by agarose gel electrophoresis. As shown in fig. 3A, the DNA extracts from the FeCl₂-treated cells generated a smear of degraded DNA (lanes F). In contrast, the pretreatment with ZSCS extract (lanes F+ZSCS) revealed a clean single band on agarose gel, similar to control untreated cells (lane C). Thus, the ZSCS extract seems to display a considerable protective activity against FeCl₂-induced DNA damage. DNA damage can also be detected by a sensitive and qualitative PCR method [44]. Therefore, to confirm the result shown by agarose gel profile, including the protective effect of ZSCS extract against FeCl₂-induced DNA damage, DNA samples from control and treated cells were subsequently subjected to PCR analysis for metallothionein (MT) gene expression. As shown in fig. 3B, a 310 bp band of MT gene has been amplified successfully, except for the DNA extracted from FeCl₂-treated cells (lanes F), for which no band was observed, confirming the DNA damage. The restriction digestion of the PCR products was carried out to confirm the specificity of the amplified band [44]. PCR band HindIII-digestion revealed two bands around 200 and 100 bands in samples from the control and ZSCS-FeCl₂ treated cells. As shown in fig. 3C, digestion of a 310 bp fragment of MT gene by HindIII restriction endonuclease generated clear two bands (220 and 104 bp) for the control of the cells (lanes C) and cells treated with ZSCS extract (lanes ZSCS), while no band was observed for the FeCl₂ treated cells (lanes F), confirming then the DNA degradation under iron overload. The protecting effect of ZSCS extract towards FeCl₂-induced DNA damage is highlighted by the presence of bands (Lane F+ZSCS). Iron excess leads to the generation of ROS by catalyzing the Fenton reaction, generating reactive hydroxyl radicals, which can break the phosphodiester backbone of DNA, leading to the fragmentation of nucleic acids [46]. The DNA strands cross-linking increases the sensitivity of DNA to degradation and blocks PCR amplification [46].



1
2
3
4
5
6
7
8 282

9
10 283 **Fig. 3** DNA damage protecting effect of ZSCS extract against FeCl₂-induced DNA damage. **A)** Electrophoretic analysis. **B)** Electrophoresis
11 284 analysis of the PCR product. **C)** Electrophoresis analysis of the PCR product after digestion with HindIII restriction enzyme. Lane C: DNA
12 285 cell control; Lane F: DNA of Cell treated with FeCl₂ (DNA damage); Lane ZSCS: DNA of Cell treated with ZSCS extract; Lane
13 286 ZSCS+FeCl₂: DNA of Cell treated with ZSCS and FeCl₂.

14
15
16 287 **Conclusion**

17
18 288 The use of the antioxidants to prevent oxidative stress and iron-induced DNA damage has aroused considerable
19 289 interest because of their potential beneficial effects to fighting human diseases. In the current study, the DNA
20 290 cleavage analysis demonstrated the intense DNA protective activity of ZSCS extract. Accordingly, it should be
21 291 taken into consideration that the DNA protecting ability is related to the antioxidant activities of the extracts.
22 292 These activities could be assigned to the presence of bioactive compounds, which may stabilize the DNA
23 293 damage by destroying or neutralizing the free radicals. The studied extracts, in particular, the aqueous extract is
24 294 rich in flavonoids and phenolic acids like rosmarinic, sinapic, syringic and caffeic acids, which can prevent the
25 295 production of ROS by complexing cations such as iron that participate in free radical formation [47-49]. ZSCS
26 296 extracts exhibit good antioxidant activity and conferred protection against iron oxidative and DNA damage. So
27 297 ZSCS extract could be a promising antioxidant source for the prevention and/or treatment of oxidative stress-
28 298 related diseases or as food additives, as it could slow oxidative degradation of nucleic acids and lipids and
29 299 thereby improving the nutritive value of food.

30
31
32
33
34
35
36
37 300 **Funding**

38
39 301 Any funding agency provided no funding support.

40
41
42 302 **Disclosure statement**

43
44 303 The authors declare no conflict of interest.

45
46 304 **Acknowledgements**

47
48 305 The authors would like to thank Prof. Mustapha Cherkaoui Malki from the University of Burgundy-Franche-
49 306 Comté, BioPeroxiL laboratory, Dijon, France, for their valuable suggestions and the careful reading of the
50 307 manuscript.

51
52
53 308 **References**

- 54
55
56 309 [1]. L. Pari, K.Asaithambi, K.Paramasivam,R. Ayyasam Toxicol. Rep. **2**, 46-55(2015)
57 310 [2]. J.P. Kehrer, Toxicol. **149**, 43-50(2000)
58 311 [3]. J.W. Eton, M.Qian, Free Radic Biol Med. **32** ., 833-840 (2002)
59 312 [4]. E.Dimitriou, M. Kairis, J.Sarafidou, H.Michelakakis, Biochem. Biophys. Act. **1501**, 138-148 (2000)
60 313 [5]. K.S. Madhusudhan, R. Oberoi, Indian J Nephrol. **21**, 134-135 (2011)

61
62
63
64
65

- 314 [6]. A.A. Mariod, R.M. Ibrahim, M. Ismail, N. Ismail, *Food Chem.* **118**, 120-127(2010)
- 1 315 [7]. N. Sameera, B. Mandakini, *Int Food Res J.* **22**(2), 849–853 (2015)
- 2 316 [8]. E.El Maaiden, Y. El Kharrassi, N.A.S. Qarah, A.K.Essamadi, K.Moustaid, B. Nasser, *J. Ethnopharmacol.*
3 317 112950 (2020)
- 4 318 [9]. M.G.E.Karar, L. Quiet, A.Rezk, R.Jaiswal, M.Rehders, MS.Ullrich, K.Brix, N.Kuhnert, *Med Chem.* **6**(3),
5 319 143–156 (2016)
- 6 320 [10]. Liu J., Wang C., Wang Z., Zhang C., Lu S., Liu J, *Food Chem.* **126**, 261–269 (2011)
- 7 321 [11]. A. Jafarian, B. Zolfaghari, K. Shirani, *Adv Biomed Res.* **3**, 38 (2014)
- 8 322 [12]. G. Zengin, M. Locatelli, R. Ceylan, A. Aktumsek, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31** , 754–759 (2016)
- 9 323 [13]. D.M. Grochowski, S. Uysal, A. Aktumsek, S. Granica, G. Zengin, R. Ceylan, M. Locatelli, M. Tomczyk
10 324 *Phytochem. Lett.* **20** , 365-372 (2017)
- 11 325 [14]. R. Tsao, R. Yang, *J. Chroma.* **1018**, 29–40 (2003)
- 12 326 [15]. M. Heinricha, G.Appendino, T. Effërth, R. Fürst, A. Izzoe, O. Kayserf, J. Pezzutog, Viljoenh. **246**,
13 327 112230 (2020)
- 14 328 [16]. L.Francis, Sally J.M., Katerina E., Omar M. A., David, *J. NeuroChem.* **87**, 620–630. (2003)
- 15 329 [17]. T. Mosmann *J Immunol Methods.* **65** ,55–63 (1983)
- 16 330 [18]. C.L. Bowlus, *Autoimmun Rev.* **2**(2), 73-78 (2003)
- 17 331 [19]. S. Guo, S. Jiang, N. Epperla, et al, *Blood.* **133**, 17 (2019)
- 18 332 [20]. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J.Randall, and others, *J Biol Chem.* **193**, 265–275 (1951)
- 19 333 [21]. M. Nishikimi, N. Appaji, K. Yagi **46**(2), 849–54 (1972)
- 20 334 [22]. H. Aebi, *Methods Enzymol.* **105** ,121–6 (1984)
- 21 335 [23]. D.E. Paglia, W.N. Valentine, *J Lab Clin Med.* **70**(1), 158–69 (1967)
- 22 336 [24]. V.M. Factor, A. Kiss, J.T. Woitach, P.J. Wirth, S.S Thorgeirsson, *J Biol Chem.* **273**(25) , 15846–53
23 337 (1998)
- 24 338 [25]. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K *Anal Biochem.* **95**(2), 351–8(1979).
- 25 339 [26]. E. El Maaiden, Y. El Kharrassi, K. Moustaid, A.K. Essamadi, N. Nasser, *Food Measure.* **13**, 121(2019)
- 26 340 [27]. Adekunle A.E., Adenike J.O *J Agric Sci.* **2**(1) ,21–25(2012)
- 27 341 [28]. F. Alhakmani, S.A. Khan, A. Ahmad, *Asian Pac J Trop Biomed.* **4**(2) , S656–S660(2014)
- 28 342 [29]. E.M.M. Ahamed, PhD thesis, Sudan University of Science and Technology (2016)
- 29 343 [30]. A.O. Ghafoor, H.K. Qadir, N.A. Fakhri, *J Chem Pharm Res.* **4**(6) , 3158–3163(2012)
- 30 344 [31]. A.M. Abu-Taleb, K.El-Deeb, F.O. Al-Otibi, *Afr J Microbiol Res.* **5** (9) , 1001–1011(2011)
- 31 345 [32]. M.H.A. Suleiman, *J. Ethnopharmacol.* **176**, 232–242(2015)
- 32 346 [33]. M. EL-Hefny, A.A. Mohamed, M.Z.M. Salem, M.S.M. Abd El-Kareem, H.M Ali *Sci Hortic.* **233**, 225–
33 347 232(2018)
- 34 348 [34]. G. Abeywickrama, S.C. Debnath, P. Ambigaipalan, F. Shahidi *J. Agric. Food Chem.* **64**, 9342–
35 349 9351(2016)
- 36 350 [35]. L. McGaw, E. Elgorashi, J. Eloff, *Toxicol Surv Afr Med Plants.* 181–133 (2014)
- 37 351 [36]. S.A Gadir, *J Chem Pharm Res.* **4**, 5145–5148 (2012)
- 38 352 [37]. A.R. Abu-Raghif, G.A. Jasim, M.M. Hanoon, *Int J Pharm Pharm Sci.* **9**(2) , 279–282 (2017)
- 39 353 [38]. A.L.J. Lizcano, M. Vilorio-Bernal, F. Vicente, L.A. Berrueta, B. Gallo, M. Mart, M.B. Ruiz-Larrea, J.I,
40 354 Ruiz-Sanz, *Int J Mol Sci.* **13** , 5454–5467(2012)
- 41 355 [39]. M.R. Saleh, M.H. Hasan, A. Adam, *J Pharmacogn Phytochem.* **3** , 5–11(2015)
- 42 356 [40]. H.E. Youssif, Khedr A.A., M.Z. Mahran, *Nat Sci.* **9**(2), 1–7 (2011)
- 43 357 [41]. A.I. Othman, M.A. Amer, M. Abdel-Mogib, R.F. Samaha, *Egypt J Hosp Med.* **37**, 759–771(2009)
- 44 358 [42]. J.Azangueu Mafo, D.Kamga Gueobu, R.Regonne, R.Kamga, R. Ndjouenkeu, In., 20th SAAFoST biennial
45 359 conference Pretoria. (2013)
- 46 360 [43]. P.Biyanzi, R. Ndjouenkeu, C.M.F. Mbofung Montpellier., France, **20–23**(2012)
- 47 361 [44]. C.Chen, Y. Zhou, C. Hu, Y. Wang, Z. Yan, R. Wu, *Free Radic Biol Med.* **136** , 22–34 (2007)
- 48 362 [45]. D.Malesev, V. Kuntic, *J. Serb.Chem. Soc.* **72** , 921–939 (2019)
- 49 363 [46]. V.Katarina, M.Todorovića, T.Varljenb, Z.Slovića, Maticé S *J.acthis* (2018)
- 50 364 [47]. T.Jun, Z.Liancai, W. Bochu, *Int J Pharmacol.* **3**, 19–26 (2007)
- 51 365 [48]. H. Bouriche, S.Kada, A.M. Assaf, A.Senator, F.Gul, Demirtas *I Pharm Biol.* **54**, 2584–2590 (2016)
- 52 366 [49]. S.Kada, H.Bouriche, A. Senator, I.Demirtas, T.Özen, B.Toptanci, G.Kızıl & Kızıl M, *Pharm Biol.* **55**, 1,
53 367 330-337 (2017)
- 54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Discussion

Le *Tetrahymena pyriformis* (protozoaire) est intensément étudié en tant qu'organisme modèle offrant de nombreux avantages dans les études complètes et multidisciplinaires utilisant des méthodes morphologiques ou moléculaires (Darcy, et al., 2002). L'extraction de l'ADN étant une étape essentielle de toute expérience moléculaire. Jusqu'à présent il n'y a pas une méthode validée pour l'extraction d'ADN de *Tetrahymena pyriformis*. Dans cette étude un nouveau mélange de surfactants (Sodium dodécyl sulfate (SDS) 20% / Triton X-100) a été adopté ici pour une extraction efficace de l'ADN de *Tetrahymena pyriformis* selon un protocole simple et rapide. L'efficacité de cette technique a ensuite été comparée à trois techniques alternatives largement utilisées, à savoir la matrice Chelex 100, le complexe APD (Ammonium pyrrolidone dithiocarbamate) et les méthodes SDS-chloroforme. Cette nouvelle méthode d'extraction a donné des résultats meilleurs sur le plan qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) des extraits de *Z. spina christi*, a montré une composition phénolique riche qui diffère de manière significative (quantitativement et qualitativement) entre les extraits des différentes parties de fruit étudié. Cette analyse a révélé la présence d'un nombre considérable de métabolites secondaires (21 métabolites). La plupart de ces composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait des graines de *Z. spina christi*, tandis que l'extrait d'amandes présentait un nombre de métabolites phénoliques plus faible. En revanche, les composés les plus abondants dans l'extrait des graines de *Z. spina christi* sont l'anthocyanine, l'acide caféique et l'acide rosmarinique, alors que dans l'extrait des pulpes, c'est l'acide syringique et dans l'extrait des amandes, c'est l'acide sinapique. Plusieurs études ont été menées sur la composition phénolique des fruits entiers, feuilles, écorces et des racines de *Z. spina christi* (Liu, et al., 2002).

Les activités antioxydantes des extraits obtenus des différentes parties de fruit ont été évaluées par pouvoir réducteur (CUPRAC et FRAP), et par des essais de chélation des métaux (MCA). La capacité de réduction des ions cuivriques (CUPRAC) la plus élevée a été observée dans l'extrait aqueux des graines. On note que l'extrait des amandes présente la valeur de FRAP la plus élevée, tandis que l'extrait de pulpes la plus faible. En ce qui concerne le MCA, nos résultats ont montré une activité chélatrice plus importante de l'extrait des graines par rapport aux autres extraits testés. Les agents chélateurs sont des composés qui se lient aux métaux prooxydants et sont efficaces en tant qu'antioxydants bioactifs. Les activités antioxydantes et chélatrices enregistrées peuvent être attribuées aux composés phénoliques

et/ou flavonoïdes identifiés dans différents extraits issus de différentes parties de fruits, en particulier dans les graines. Ces composés phénoliques sont de puissants agents réducteurs qui augmentent la capacité antioxydante en réduisant l'état d'oxydation des composés antioxydants (Ahmad, et al., 2016).

Avant de déterminer si les extraits de *Z. spina christi* ont une activité protectrice contre les dommages causés par le FeCl₂, la cytotoxicité de ces extraits sur les cellules *Tetrahymena pyriformis* (TEP) a été mesurée par le test MTT. Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures, puis prétraitées avec les différents extraits aqueux des graines, pulpes et amandes (0,1 -1000 µg/mL). Les cellules traitées avec l'extrait aqueux des graines n'ont montré aucune cytotoxicité, même à des concentrations élevées allant jusqu'à 1mg/mL, tandis que les extraits des pulpes et d'amandes étaient cytotoxiques à partir de 0.1mg/mL. Pour évaluer l'effet protecteur de *Z. spina christi* contre la surcharge en FeCl₂, les cellules ont été prétraitées par un extrait des graines de *Z. spina christi* à 0.1 µg/mL pendant 24 h, puis les cellules ont été exposées au FeCl₂ (1mM, ajouté au milieu) et incubées pendant 24 h. Les cellules traitées au FeCl₂ seul ont révélé une diminution significative de la viabilité cellulaire de 50 %. En revanche, les cellules prétraitées avec l'extrait des graines, ont montré une viabilité de près de 89 % en présence de FeCl₂. Il est intéressant de noter que nos données ont révélé que l'extrait des graines protégeait de manière significative les cellules contre la cytotoxicité induite par le FeCl₂. La cytotoxicité induite par les différentes parties du fruit de *Z. spina christi* a été étudiée pour la première fois dans cette étude et a permis de déduire que l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* ne révèle aucune toxicité même à forte dose. Comparativement, McGac et ses collaborateurs ont rapporté la cytotoxicité des extraits des feuilles de *Z. spina christi* en utilisant une lignée cellulaire de crevettes saumâtres de crustacés, révélant une CI50 de 0,3mg/ mL (McGaw, et al., 2014). En outre, Abu-Raghif et ses collaborateurs ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Z. spina christi* a une activité antiproliférative contre les cellules de rhabdomyosarcome humaines avec une CI50 de 0,15mg /mL (Abu-Raghif, et al., 2017).

La production de radicaux libres est le principal mécanisme lié à la toxicité ferreuse. Cependant, la cellule développe son système de défense antioxydant, qui est efficace au moins dans une certaine mesure pour la neutralisation des radicaux libres. En conséquent, nous montrons ici que le traitement des cellules avec un extrait aqueux de graines n'a eu aucun effet sur les niveaux d'activité des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPx et GR). Cependant, lorsque les cellules ont été surchargées en FeCl₂, les activités spécifiques des CAT, SOD,

GPx et GR ont fortement diminué de 50 à 70%. Alors que la peroxydation des lipides a augmenté de 65 %, révélant un stress oxydatif cellulaire induit par le FeCl₂. En revanche, le prétraitement des cellules avec l'extrait a contracté l'impact du FeCl₂ sur les activités enzymatiques antioxydantes, montrant un niveau de 75 à 95 % de celles mesurées dans les cellules témoins. La capacité des extraits de *Ziziphus* à inhiber la peroxydation des lipides et à neutraliser les radicaux libres peut être attribuée à leurs constituants phénoliques, qui peuvent agir comme des donneurs d'électrons, réagissant avec les radicaux libres et les convertissant en produits plus stables (Saleh, et al., 2015). Comme on le voit ici, l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* est riche en composés phénoliques, qui sont de puissants antioxydants et peuvent fortement inhiber la peroxydation des lipides. En effet, un travail réalisé par (Youssif, et al., 2011) sur les rats Wistar a montré que les fruits de *Z. spina christi* pouvaient protéger le foie contre les dommages oxydatifs induits par le tétrachlorure de carbone, ainsi que la corrélation de l'effet hépato protecteur dû à ses effets antioxydants et de piégeage des radicaux libres. Cette activité antioxydante a également été confirmée par (Othman, et al., 2009). De plus, il a également été rapporté que l'huile d'amande de *Ziziphus* présentait une activité antioxydante plus élevée, qui est dix fois supérieure à celle du HTB et de la Quercitrine, mais qui reste comparable à celle mesurée pour la pulpe du fruit sec (Azangueu Mafo, et al., 2013).

La coloration de Perls pour le fer ferrique a été utilisée pour étudier l'implication de l'extrait des graines de *Z. spina christi* dans la prévention de l'accumulation du fer dans les cellules. L'extrait seul n'a pas influencé la coloration de Perls comparée au contrôle. Au contraire, dans les cellules traitées avec de FeCl₂, une accumulation de fer a été observée. Le prétraitement avec l'extrait a pu démunie cette accumulation. Pour confirmer ces données, le test colorimétrique à base de ferrozine présente des complexes avec le fer ferreux qui absorbe fortement la lumière à 550 nm. On a constaté une augmentation significative de l'accumulation de fer dans les cellules traitées au FeCl₂. Le dosage à base de ferrozine permet de quantifier le fer dans les cellules cultivées à des niveaux compris entre 0,85 et 24,44 nmol par mg de protéine. Les quantités basales de fer dans les cellules non traitées étaient d'environ 0,85 nmol de fer par mg de protéine. L'incubation des cellules avec du FeCl₂ pendant 4 heures a permis d'augmenter significativement le fer intracellulaire à 24,44 nmol par mg de protéine. Cependant, le prétraitement avec l'extrait a diminué ce niveau pour atteindre 11 nmol de fer par mg de protéine. Plusieurs substances phytochimiques dans l'extrait des graines de *Z. spina christi* peuvent réguler l'afflux et/ou l'efflux du fer intracellulaire et réduire son accumulation à l'intérieur de la cellule (Malesev, et al., 2007).

La capacité d'extrait à protéger contre les dommages causés à l'ADN par la FeCl_2 a été étudiée plus en détail par électrophorèse sur gel d'agarose. Les extraits d'ADN des cellules traitées au FeCl_2 ont généré un frottis d'ADN dégradé. En revanche, le prétraitement avec l'extrait a révélé une bande unique propre sur le gel d'agarose, similaire aux cellules témoins non traitées. Ainsi, l'extrait semble présenter une activité protectrice considérable contre les dommages de l'ADN induits par le FeCl_2 . Les lésions de l'ADN peuvent également être détectées par une méthode de PCR. Les échantillons d'ADN des cellules témoins et traitées ont ensuite été soumis à une analyse PCR pour l'expression du gène de la métallothionéine (MT). Une bande de 310 pb du gène de la MT a été amplifiée avec succès, sauf pour l'ADN extrait des cellules traitées au FeCl_2 , pour lequel aucune bande n'a été observée, confirmant les dommages à l'ADN. La digestion de restriction des produits de la PCR a été effectuée pour confirmer la spécificité de la bande amplifiée (Chen, et al., 2012). La digestion d'un fragment de 310 pb du gène MT par l'endonucléase de restriction HindIII a généré deux bandes claires (220 et 104 pb) pour le contrôle des cellules et les cellules traitées avec l'extrait, alors qu'aucune bande n'a été observée pour les cellules traitées au FeCl_2 , ce qui confirme la dégradation de l'ADN en cas de surcharge en Fer. L'effet protecteur de l'extrait vis-à-vis des dommages à l'ADN induits par le FeCl_2 est mis en évidence par la présence des bandes. L'excès de Fer conduit à la génération de ERO en catalysant la réaction de Fenton, générant des radicaux hydroxyles réactifs, qui peuvent briser le squelette phosphodiester de l'ADN, conduisant à la fragmentation des acides nucléiques (Katarina, et al., 2018). La réticulation des brins d'ADN augmente la sensibilité de l'ADN à la dégradation et bloque l'amplification d'ADN PCR (Katarina, et al., 2018).

Chapitre 4. Effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de Ziziphus spina christi contre le stress oxydatif induit par le fer chez les souris

I. Introduction

Le fer est un élément vital pour la vie des êtres vivants. Il joue un rôle très important dans le transport d'oxygène et dans des réactions biochimiques, comme celles impliquées dans le transport d'électrons, la production d'adénosine triphosphate (ATP) et la synthèse d'acide ribonucléique (ADN). Cependant, si les réserves de fer augmentent, une saturation complète de la transferrine et ensuite de la ferritine se produit (Sadrzadeh, et al., 1988). Un groupe de molécules chimiques hautement réactives comportant un ou plusieurs électrons non appariés se forment. Lorsque l'équilibre entre la production de ces radicaux libres et leur élimination par les antioxydants est perturbé, un stress oxydatif se produit dans l'organisme (Bowlus, 2003). Les antioxydants sont considérés comme de possibles agents de protection réduisant les dommages oxydatifs du corps humain lorsque les mécanismes enzymatiques internes échouent ou sont insuffisamment efficaces (Halliwell, et al., 2007). Les polyphénols, tels que les dérivés phénoliques et les flavonoïdes, sont connus pour leur capacité à empêcher les acides gras de se dégrader par oxydation et à apporter une valeur ajoutée aux plantes utilisées comme ingrédients alimentaires (Fecka, et al., 2007).

L'objectif principal de cette partie consiste à étudier in vivo sur des souris l'effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* contre la toxicité induite par le FeCl₂. Pour cela, les souris ont été traitées pendant 28 jours par intubation gastrique avec FeCl₂ à raison de 8 mg / kg de masse corporelle. Le lot contrôle est traité uniquement avec de l'eau physiologique. Les souris de lot Co-traité reçoivent par gavage du chlorure de fer (II) (8 mg/kg) et boivent de l'eau potable additionnée de l'extrait aqueux des graines de *Ziziphus spina christi* (200 mL d'extrait/ L d'eau potable). La masse corporelle a été suivie tout au long de l'étude, l'état de santé comportementale a été aussi suivi. Ensuite, les souris ont été décapitées, les organes (cœurs, foies, reins, et cerveaux) ont été prélevés, les masses relatives de ces organes ont été déterminées, puis les homogénats des organes ont été préparés pour l'étude de l'évaluation du stress oxydatif, de la peroxydation lipidique et de la fragmentation d'ADN.

II. Résultats

1. Évaluation de l'effet des traitements sur les comportements des souris et suivi des masses relatives des organes

Pendant toute la période d'étude, nous n'avons constaté aucune différence dans le comportement ni de masse corporelle entre les souris témoins et celles traitées. Les résultats présentés dans la **figure 13** montrent qu'il n'y a pas de variation des masses relatives des organes (cœurs, foies, reins, et cerveaux) quel que soit les traitements effectués sur les souris.

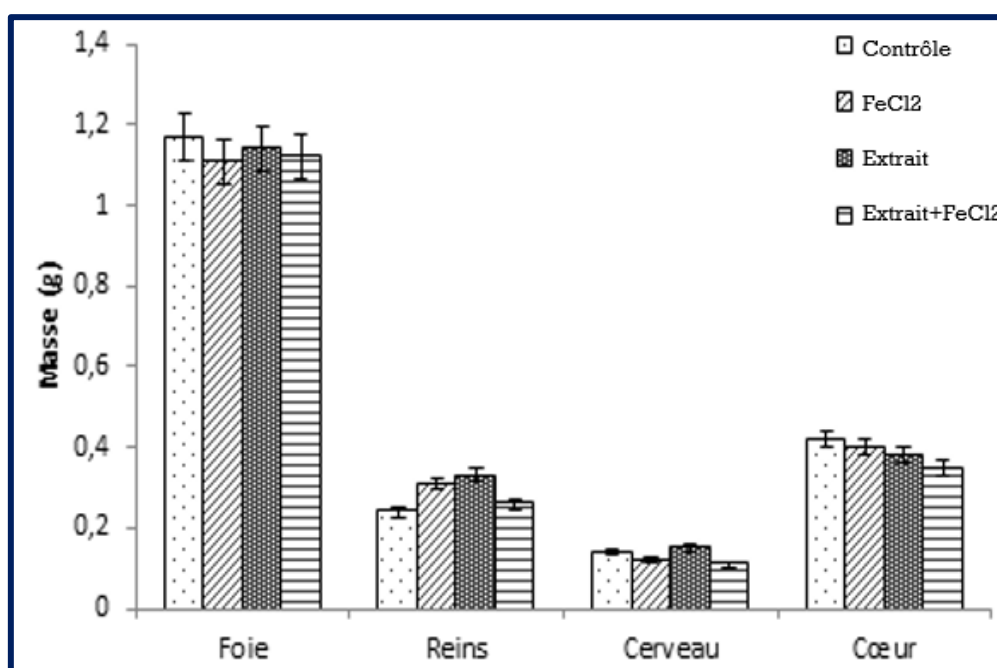


Figure 13: Évolution de la masse relative des organes au cours des traitements

Les résultats représentent la moyenne \pm SD (n=4)

2. Évaluation de l'effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* contre le stress oxydatif induit par le fer

Une étude comparative des activités des enzymes à savoir la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) est réalisée sur les homogénats des organes (cœur, foie, cerveau et reins) des souris traitées par le FeCl₂ et celles co-traitées avec l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi*. Les résultats obtenus dans (**figure 14**) montrent qu'au niveau des foies des souris traitées avec le FeCl₂, on observe une diminution de l'activité enzymatique de la CAT, de la SOD et de la GPx par rapport au contrôle non traité. Dans le même sens, les cerveaux des animaux traités par le chlorure de

fer montrent une diminution de l'activité enzymatique de la CAT et de la SOD de 12 et 26% respectivement par rapport au contrôle , et une augmentation de l'activite de la GPx de 70% par rapport au contrôle. Au niveau des homogénats des reins, l'activité de la CAT est dimunie chez les animaux traités par le FeCl₂ alors que celle de la GPx est augmentée de 10 %, en revanche, l'activité enzymatique de la SOD a été diminuée de 10 % par rapport au contrôle. Les mesures des activités enzymatiques de CAT, SOD et de GPx dans les cœurs et les reins n'ont montré aucune variation significative par rapport au contrôle . Globalement, on note que le traitement des souris avec l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* a courigé le niveau des activités des enzymes altérées par le FeCl₂ par rapport au contrôle particulièrement dans le foie et le cerveau.

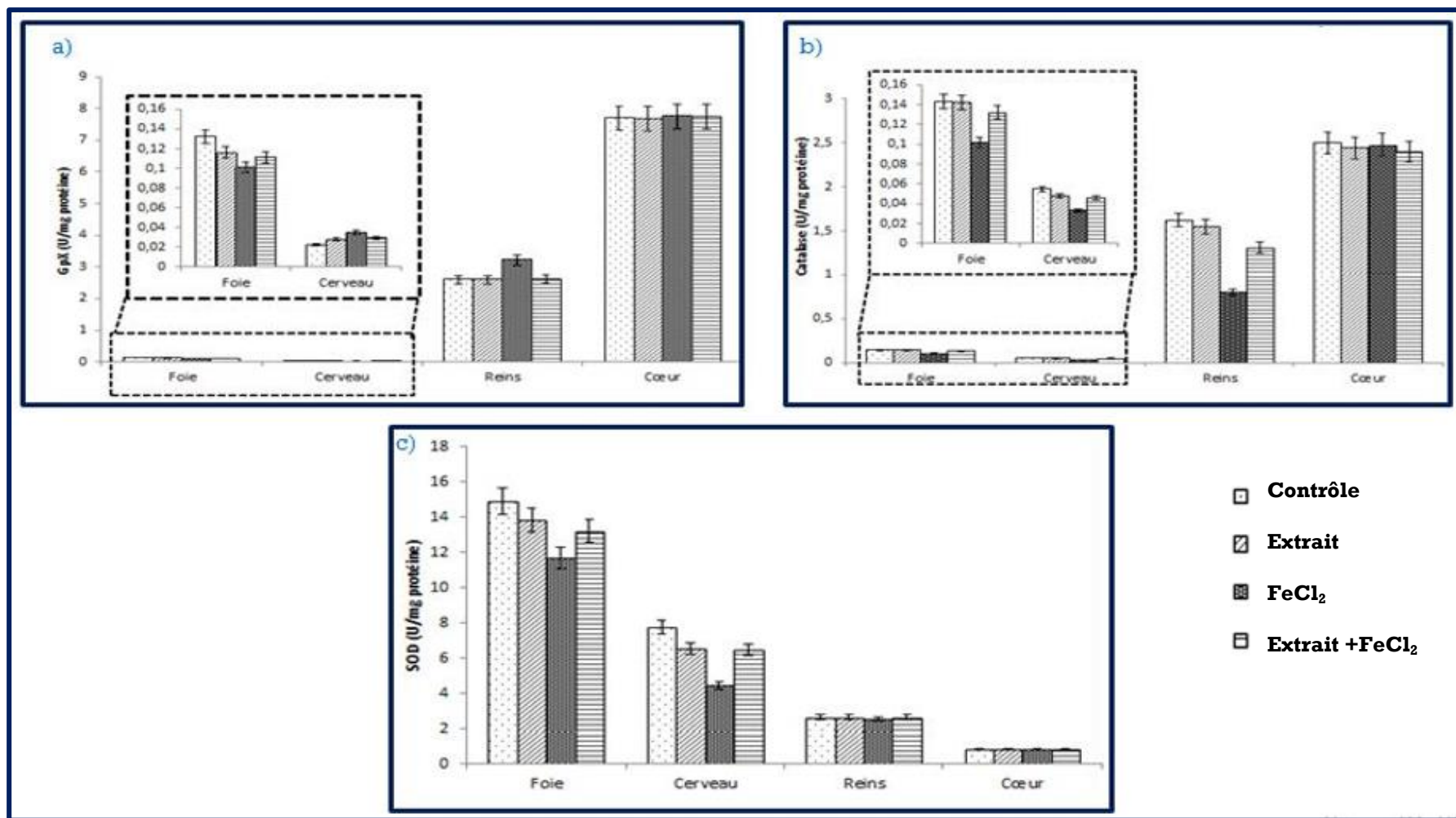


Figure 14 : Effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de *Z.spina christi* contre le stress oxydatif induit par le chlorure de fer ($FeCl_2$) : a) Glutathion peroxydase (GPx), b) Catalase, c) Superoxyde dismutase (SOD).

Les résultats représentent la moyenne \pm SD sur 4 essais différents pour chaque animal du même lot (n=5) UI : unité enzymatique = μ mol de substrat transformé / unité de temps *** : $p \leq 0.05$ (Les valeurs p de Fisher sont calculées par rapport au contrôle)

3. Évaluation de l'effet protecteur d'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* contre la peroxydation lipidique induite par le fer

Les variations de la teneur en MDA induite par le chlorure de fer (FeCl_2) sont indiquées dans la **figure 15**. L'analyse des résultats obtenus montre une augmentation de 40 % la peroxydation de MDA par rapport au contrôle dans le foie et le cerveau. Par contre, dans les autres organes, à savoir le cœur et les reins, le traitement par FeCl_2 n'a provoqué aucune variation dans la teneur de MDA par rapport au contrôle non traité. Ces résultats obtenus montrent que le foie et le cerveau sont très affectés et très sensibles à la peroxydation lipidique en raison de l'augmentation du stress oxydatif induit par le fer. On observe que le traitement par l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* a normalisé le dommage relatif à la production de MDA causé par le fer.

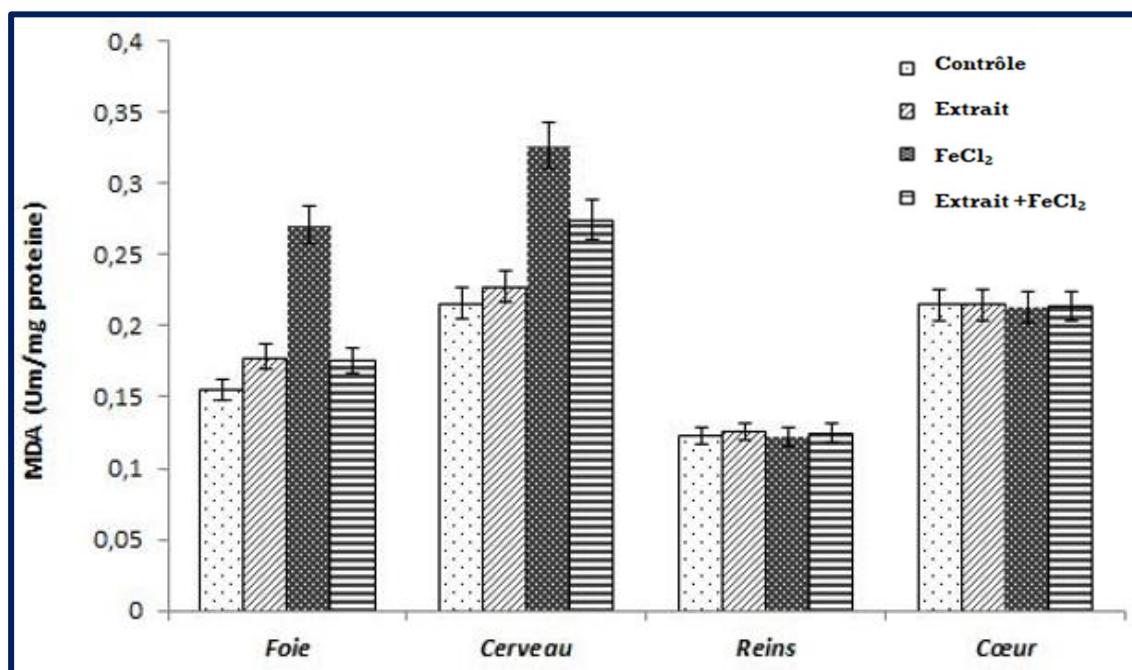


Figure 15 : Niveau de MDA dans les tissus des souris témoins et traitées.

Les résultats représentent la moyenne \pm SD sur 4 essais différents pour chaque animal du même lot ($n=5$). *** : $p \leq 0.05$ (Les valeurs p de Fisher sont calculées par rapport au contrôle)

4. Évaluation de l'effet protecteur de l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* contre la fragmentation de l'ADN induite par le fer

L'analyse de la fragmentation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose a montré une bande unique et nette sans dégradation dans les tissus du foie du contrôle ainsi que des groupes traités uniquement avec l'extrait (**Figure 16 A**). Le traitement des animaux par le

FeCl₂ induit clairement une fragmentation de l'ADN au niveau des foies. La supplémentation de l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* a montré un effet réparateur par atténuation de fragmentation de l'ADN. Par contre, l'analyse des gels électrophorétique pour les reins, le cerveau et le cœur n'ont montré aucune dégradation et donc l'absence de fragmentation de l'ADN (**Figure 16 B, C, D**).

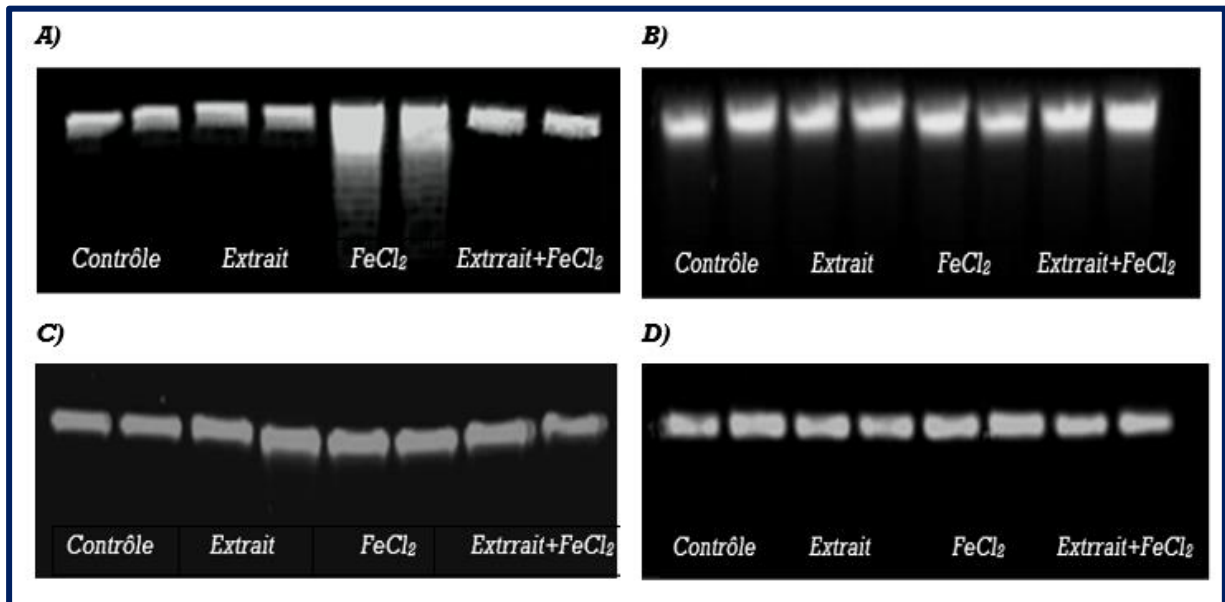


Figure 16: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN provenant des différents organes par analyse du (A) foie (B) cerveau (C) reins (D) cœur.

III. Discussion

Il est bien connu que le métabolisme du fer s'implique dans l'interaction dynamique entre le stress oxydatif et les antioxydants dans de nombreux processus physiopathologiques. Le stress oxydatif est un dénominateur commun dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques (Beaumont, et al., 2000). C'est pourquoi les antioxydants sont souvent utilisés pour protéger les cellules et les tissus et inverser les dommages oxydatifs (Sadrzadeh, et al., 1988). Une surcharge en fer peut affecter l'état d'oxydoréduction, et ces conditions peuvent être rétablies en utilisant un chélateur de fer. De même, l'ajout d'antioxydants à ces régimes de traitement a été suggéré comme une approche thérapeutique viable pour atténuer les dommages tissulaires induits par le stress oxydatif (Beaumont, et al., 2000). Il a notamment été démontré que de nombreux composés bioactifs d'origine végétale régulent à la fois le métabolisme du fer et l'état redox (Bowlus, 2003).

Dans la présente étude, nous avons observé des altérations des activités enzymatiques des enzymes de stress dans les organes (cœur, reins, foie et cerveau) des souris traitées par le FeCl₂. Cependant, les changements sont complexes et représentent un niveau d'enzyme antioxydant varié dans les différents tissus des souris étudiées. Il semble que certains tissus soient plus affectés par les radicaux libres que d'autres. L'augmentation de l'activité antioxydante des enzymes dans le foie et le cerveau pourrait être un mécanisme compensatoire en réponse au stress oxydatif provoqué par le FeCl₂. Le foie est l'un des organes du corps les plus riches en fer ; environ 20 à 30 % du fer de l'organisme est stocké dans les hépatocytes et les macrophages réticulo-endothéliaux, de sorte qu'une accumulation excessive de fer est clairement observée dans le foie (Silva, et al., 2015). De nombreuses études ont indiqué que la surcharge en fer alimentaire renforce la fibrose hépatique et induit même une transformation néoplasique (Silva, et al., 2015). Ces phénomènes peuvent être associés au rôle du fer dans le déclenchement du stress oxydatif.

Cependant, le co-traitement des animaux avec l'extrait aqueux des graines de *Z. spina christi* et le FeCl₂ a augmenté les niveaux des activités des enzymes antioxydantes (catalase, GpX, SOD) de manière proportionnelle à la dose et à des valeurs proches du contrôle. En outre, le traitement des souris avec l'extrait seul n'a pas affecté le niveau de l'activité enzymatique et les valeurs n'ont pas varié par rapport au groupe de contrôle. L'excès du fer provoque la production des ERO en catalysant la réaction de Fenton, générant des radicaux hydroxyles réactifs, qui peuvent briser le squelette phosphodiester de l'ADN, conduisant à la fragmentation des acides nucléiques (Bowlus, 2003). Dans la présente étude nous avons évalué, par électrophorèse sur gel d'agarose, la capacité de l'extrait à protéger l'ADN contre les dommages causés par la FeCl₂. On constate une dégradation de l'ADN dans les foies des souris traitées avec le FeCl₂. En revanche, le prétraitement avec l'extrait a montré un effet réparateur à savoir une bande unique sur le gel d'agarose, similaire à celle obtenue à partir du foie des souris témoins non traitées. Ainsi, l'extrait semble présenter une activité protectrice considérable contre les dommages de l'ADN induits par le FeCl₂. La capacité des extraits des graines de *Z. spina christi* à inhiber la peroxydation des lipides et à neutraliser les radicaux libres peut être attribuée à leurs constituants phénoliques, qui peuvent agir comme des donneurs d'électrons, réagissant avec les radicaux libres et les convertissant en produits plus stables (Saleh, et al., 2015). Cette activité antioxydante de l'extrait a également été confirmée par Othman et al (Othman, et al., 2009). Youssif et ses collaborateurs ont étudié l'effet protecteur des extraits des fruits de *Z. spina christi* contre le stress induit par le tétrachlorure

de carbone dans les foies des rats Wistar (Youssif, et al., 2011). En outre, il a également été signalé que l'huile d'amande de *Ziziphus* présentait une activité antioxydante plus élevée, qui est dix fois supérieure à celle du HBT et de la Quercitine, mais qui reste comparable à celle qui a été mesurée pour l'extrait de la pulpe du fruit sec (Azangueu Mafo, et al., 2013).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Le fer est un élément cofacteur qui joue un rôle important dans de nombreuses procédures biologiques, comme le transport de l'oxygène et des électrons ou la synthèse de l'ADN. Cependant, si les réserves de fer augmentent, il se produit une saturation complète de la transferrine et ensuite de la ferritine. Le fer se lie à d'autres molécules circulantes (non-transferrin-bound iron), ce qui provoque une accumulation de complexes ferriques réactifs à l'intérieur des cellules. Lors du transfert d'électrons entre les molécules de fer de valences différentes (Fe^{3+} et Fe^{2+}), il se forme des radicaux libres (RL) extrêmement réactifs avec des lésions d'organes. Cependant, ce fer est potentiellement toxique pour les membranes cellulaires, qu'il s'agisse de membranes plasmiques ou de membranes des différentes organelles intracytoplasmiques comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique granulaire, la protéine et l'ADN. Cette attaque membranaire peut conduire à la destruction cellulaire puis à l'atteinte tissulaire. Le fer est également capable de provoquer la peroxydation des lipides. Parmi les troubles provoqués par la surcharge en fer, l'hémochromatose héréditaire, la drépanocytose, la bêta-thalassémie majeure, le déficit enzymatique (pyruvate kinase) et les troubles rares des protéines de transport (Atransferinémie, Aceruloplasminémie). Différents chélateurs du fer sont impliqués dans le traitement de la surcharge en fer. La déféroxamine, la déféripone et le déférasirox sont les plus importants chélateurs spécifiques du fer approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) américaine. Des recherches récentes ont prouvé que le traitement comprend l'utilisation de chélateurs du fer, qui, à des concentrations plus élevées, peuvent avoir des effets néfastes importants et nécessitent une surveillance médicale constante. De plus, ces complexes sont fragiles puisque les liaisons entre le métal et le ligand sont non-covalentes. Par conséquent, la recherche d'autres chélateurs du fer uniques ou adjuvants ayant une toxicité réduite pourrait être très utile. C'est pourquoi à ce jour, les études sont orientées vers l'identification des espèces chimiques dans les plantes médicinales.

Les jujubiers sont des arbres ou arbustes du genre *Ziziphus Mill.*, appartenant à la famille des Rhamnaceae. L'enquête approfondie menée sur la composition phytochimique et sur l'activité pharmacologique du jujubier a permis de constater que ces plantes possèdent des composés multi-biologiquement actifs. Ces composés actifs comprennent des alcaloïdes, des stérols, des flavonoïdes, des tri-terpénoïdes, des saponines et d'autres composés. Il a été signalé que ces biomolécules peuvent servir d'antioxydants, d'antimicrobiens,

d'anticancéreux, d'antidiabétiques, d'agents anti-inflammatoires, et peuvent retarder l'agrégation plaquettaire, et la libération d'histamine par les mastocytes

Ziziphus spina-christi et le *Ziziphus lotus* sont utilisés depuis de nombreuses années comme nutriments au Maroc, il existe encore un grand nombre d'informations sur leur composition nutritive et phytochimique à déterminer. La présente étude a montré que le fruit, la pulpe, les graines et les amandes de deux espèces de jujubier (*Z. spina-christi* et *Z. lotus*), sont des sources importantes en phytochimie et en phytonutriments, ce qui justifie leur utilisation en médecine traditionnelle. Compte tenu de leur composition chimique très riche en composés phénoliques et de leur valeur minérale et nutritionnelle élevées, les graines de *Z. spina-christi* pourraient constituer un élément important de l'alimentation. En effet, la teneur en substances biologiquement actives et les niveaux élevés en polyphénols obtenus à partir d'extraits aqueux, pourraient favoriser l'utilisation des graines comme aliments fonctionnels et bénéfiques pour la santé, notamment pour la prévention du diabète et de l'obésité. À cet égard, il convient d'accorder une attention particulière aux graines de *Z. spina-christi*, qui ont jusqu'à présent été utilisées principalement comme aliments pour animaux et qui gagnent actuellement une importance en tant que composants nutraceutiques. L'utilisation des antioxydants pour prévenir le stress oxydatif et les dommages causés à l'ADN par le fer a suscité un intérêt considérable en raison de leurs effets bénéfiques potentiels pour lutter contre les maladies humaines plus particulièrement les maladies neurodégénératives. Dans l'étude actuelle, l'analyse du clivage de l'ADN a démontré l'intense activité protectrice de l'ADN par l'extrait de graine de *Z. spina christi*. En conséquence, il convient de prendre en considération le fait que la capacité de protection de l'ADN est liée aux activités antioxydantes des extraits. Ces activités pourraient être attribuées à la présence de composés bioactifs, qui peuvent stabiliser les dommages causés à l'ADN en neutralisant les radicaux libres. Les extraits étudiés, en particulier l'extrait aqueux, sont riches en flavonoïdes et en acides phénoliques comme les acides rosmarinique, sinapique, syringique et caféique, qui peuvent empêcher la production des ERO en complexant des cations tels que le fer qui participe à la formation de radicaux libres. Les extraits des graines de *Z. spina christi* présentent une bonne activité antioxydante et confèrent une protection contre l'oxydation du fer et les dommages causés à l'ADN. Cet extrait pourrait donc être une source d'antioxydants prometteuse pour la prévention et/ou le traitement des maladies liées au stress oxydatif ou comme additif alimentaire, car il pourrait ralentir la dégradation oxydative des acides nucléiques et des lipides et ainsi améliorer la valeur nutritive des aliments.

Perspectives

Toutefois comme perspective, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour isoler les différents constituants responsables des activités antioxydantes et biologiques et trouver leurs applications dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

- ❖ Identifier les molécules présentes dans les extraits qui ont révélé un effet protecteur, afin de purifier et d'isoler ces molécules pour un bénéfice thérapeutique supplémentaire.
- ❖ Extraire et caractériser les extraits à partir d'autres espèces de jujubier et d'autres parties de la plante.
- ❖ Évaluer l'effet d'une surcharge en Fer sur d'autres modèles cellulaires.
- ❖ Déterminer les sites d'accumulation de Fer dans la cellule qui sont encore à préciser.
- ❖ L'accumulation de chlorure de Fer dans les organites cellulaires (mitochondries, peroxyosome) ne peut être écartée, ce qui pourrait ainsi conduire à un dysfonctionnement mitochondrial et des troubles lipidiques observés.
- ❖ Évaluer la toxicité du Fer et l'effet sur les protéines et les ARN..etc.
- ❖ Évaluer l'effet du Fer, après une longue période de traitement des souris.
- ❖ Choisir une large gamme de concentrations de chlorure de Fer, afin de connaître celle à partir de laquelle commence les dommages d'ADN du foie.

Références bibliographiques

Abdeddaim, M., Lombarkia, O., Bacha, A., & Fahloul, D. (2014). Biochemical characterization and nutritional properties of *Zizyphus lotus L.* fruits in Aures region, Northeastern of Algeria. *Ann. Food Sci. Technol.*, 15, 75–81.

Abu-Raghif, A., Jasim, G., & Hanoon, M. (2017). Anti-proliferative activity of *Zizyphus spina christi* leaves methanol extract against rhabdomyosarcoma (rd) cell line. *Int J Pharm Sci.*, 9, 279–282.

Adzu, B., Haruna, A., Ilyas, M., & Gamaniel, K. (2008). CNS activity of ZS-1A: a phytochemical from *Zizyphus spina-christi* root bark. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 2, 456–461.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105, 121–6.

Agnieszka, K., & Krzysztof, G. (2013). Criteria of determination of safe grain storage time: A Review. In *Tech.*, 10.5772-2235.

Ahmad, R. N., Naqvi, A. A., Cos, P., Maes, L., Apers, S., Hermans, N., & Pieters. (2016). Anti-infective, cytotoxic and antioxidant activity of *Zizyphus oxyphylla* and *Cedrela serrata*. *Asia. Pac. J. Trop. Biomed.*, 6, 671–676.

Akinwumi, A., & Faleye, J. (2017). Phytochemical quantification and in vitro antioxidant activity of the leaves, stem-bark and root of *Nauclea latifolia Smith*. *FUW Trends Sci. Technol. J.*, 2, 960–996.

Ali, R., Shah, H., Ullah, I., Anwar, J., Numan, M., Khan, K., Sohail, S. (2015). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of stem extract of *Zizyphus oxyphylla* edgew. *World J. Zool.*, 10, 107–111.

Amara, M., & Benabdeli, K. (2017). Geobotanical and phenological study of *Zizyphus lotus* in the Naama region (South-Western of Algeria). *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 7, 1–8.

Amara, S. (2007). Effets d'une exposition sub-chronique au champ magnétique statistique sur le métabolisme du zinc et la toxicité du cadmium chez le rat : Rôle du stress oxydant. (Mémoire de master). Université du carthage.

Ames, B. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Radic. Bio, Med.*, 7, 121–128.

Ammar, I., Ennouri, M., Khemakhem, B., Yangui, T., & Attia, H. (2012). Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Ind. Crops Prod.*, 37, 34–40.

Amoo, I., & Jokotagba, O. (2012). Comparative analysis of proximate, minerals and functional properties of Tamarindus indica pulp and Zizyphus spina-christi fruit and seed. *Greener J. Agric. Sci.*, 1, 21–25.

AOAC international. (1990). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. *Official Method.*, 1, 3–25

Arndt, S., Clifford, S., & Popp, M. (2001). *Ziziphus* - a Multipurpose fruit tree for arid regions breckle et al. (eds.), Sustainable Land Use in Deserts. Berlin; Heidelberg.: Sustainable Land Use in Deserts © Springer-Verlag.1,2-8.

Aruoma, O., Halliwell, B., Gajewski, E., & Dizdaroglu, M. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.*, 264, 9–12.

Azam-Ali, S. A., Bonkougou, E., Bowe, C., deKock, C., Godara, A., & Williams, J. (2006). *Ber. International Centre for Underutilised Crops*. UK: Southampton.

Azangueu, J., Kamga Gueob, D., R., Kamga, R., & Ndjouenkeu, R. (2013). Physico-chemical characterization of the oil of *Ziziphus* kernels from the savannah area of Cameroon. 20th SAAFoST biennial conference Pretoria. Cameroon.

Balaban, R., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.*, 120, 483–495.

Barbusiński, K. (2009). Fenton reaction controversy concerning the chemistry. *Ecol Chem and Eng Sci.*, 16, 309–314.

Beaumont, C., & Girot, R. (2000). Métabolisme du fer physiologie et pathologie. *Encycl.Med. Chir.*, 1, 13-20.

Bedard, K., & Krause, K. (2007). The NOX family of ROS- generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.*, 87: 245–313.

Benammar, A., Hichami, A., Yessoufou, A., Simonin, M., Belarbi, H., & Allali, N. (2010). *Zizyphus lotus* L. (Desf.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation. *BMC Complement. Altern. Med.*, 10, 1–9.

Bhansali, A. K. (1975). *Monographic Study of the family Rhamnaceae of India*. India. University of Jodhpur.

Blake, D., Winyard, P., Lunec, J., Williams, A., Good, P., & Crewes. (1985). Cerebral and ocular toxicity induced by desferrioxamine. *Q. J. Med.*, 56, 345–355.

Botterweck, A. A., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., & Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chem.*, 20, 123-134.

Bowlus, C. (2003). The role of iron in T cell development and autoimmunity. *Autoimmun Rev.*, 2,73-78.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Inter J of Fd Sci & Tech.*, 44, 2394-2401.

- Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. (2010). Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.*, 15, 186–190.
- Chen, C., & Paw, B. (2012). Cellular and mitochondrial iron homeostasis in Vertebrates. *Biochim Biophys Acta.* 80, 20-28.
- Cheng, G., Bai, Y., Zhao, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, M. L., Xu, X. (2000). Flavonoids from *Ziziphus jujube* Mill var. *spinosa*. *Tetrahedron.*, 56, 8915–8920.
- Cheung, A., Pok, L., Vincent, K., & King, M. (2005). Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1731, 654–661.
- Choudhary, M., Adhikari, A., Rasheed, S., Marasini, B., Hussain, N., & Kaleem, W. (2011). Atta-ur-Rahman, Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus oxyphylla* Edgew as novel inhibitors of a-glucosidase enzyme and protein glycation. *Phytochem. Lett.*, 4, 404–406.
- Conner, E., & Grisham, M. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutr.*, 12: 274-281.
- Crichton, R., Wilmet, S., Legssyer, R., & Ward, R. (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. Inorg. Biochem.*, 91, 9–18.
- DAO, M. (1993). Contribution à l'amélioration génétique d'un fruitier sauvage à usages multiples : *Ziziphus mauritiana* Lam. Institut du Développement Rural. (Thésis Report). Université de Ouagadougou. Burkina Faso.
- Darcy, P., Kelly, J.P., Leonard, B.E., Henry, A.B. (2002). The effect of lofepramine and other related agents on the motility of *Tetrahymena pyriformis*. *Toxicol. Lett.*, 128, 207–214.
- Depommier, D. (1988). *Ziziphus mauritiana*: Cultivation and use in Kapsiki country, northern Cameroon. Bois et Forêts des Tropiques. CTFT-CIRAD, ICRAF, Nairobi, Kenya. 218, 57- 62.
- Dickson, D., Braak, H., Duda, J., Duyckaerts, C., Gasser, T., & Halliday, G. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteri. *Lancet Neurol.*, 8, 1150–1157.
- Dinis, T., Madeira, V., & Almeida, L. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315, 161–16.
- Djemai, Z. (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus Lotus L.* (Mémoire de master). Université El HadjLakhdar. Batna. Algerie.
- Drew, B., & Leeuwenburgh, C. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Annals of the New York Academy Sci.*, 959, 66–81.

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Qarah, N., Essamadi, A., Moustaid, K., & Nasser, B. (2020). Genus *Ziziphus*: A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological properties. *J. Ethnopharmacol.*, 317, 29-50.

El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Moustaid, K., Essamadi, A. K., & Nasser, N. (2019). Comparative study of phytochemical profile between *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus* from Morocco. *Food Measure*, 13, 121-130.

EL-Hefnya, M., Abeer, A., Z.M, M., & Mamoun, S. A.-K. (2018). Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial activity against some potato bacterial pathogens of fruit extracts from *Phytolacca dioica* and *Ziziphus spina-christi* grown in Egypt. *Sci Hortic.*, 233, 225–232.

El-Khateeb, A., Elsherbiny, E., Tadros, L., Ali, S., & Hamed, H. (2013). Phytochemical analysis and antifungal activity of fruit leaves extracts on the *mycelial* growth of fungal plant pathogens. *J. Plant Pathol. Microbiol.*, 4, 199.

Emsley, J. (2001). *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. (Thesis Report). Oxford University. Britain.

Evreinoff, V. A. (1964). Notes sur le jujubier (*Ziziphus jujuba Gaertner*). *J. Agr Tro, Bot.*, 11, 177– 187.

Factor, V., Kiss, A., Woitach, J., Wirth, P., & Thorgeirsson, S. (1998). Disruption of redox homeostasis in the transforming growth factor- α /c-myc transgenic mouse model of accelerated hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem.*, 273, 46–53.

Fecka, I., Raj, D., & Krauze, M. (2007). Quantitative determination of four water-soluble compounds in herbal drug from Lamiaceae using different chromatographic techniques. *Chrom.*, 66, 87–93.

Fenicia, L., Anniballi, F., De Medici, D., Delibato, E., Aureli, P. (2007). SYBR Green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2891–2896.

Floyd, R. (1994). Reactive oxygen species in mutagenesis. *Cancer Res.*, 54, 1890–1894.

Francis, L., Sally, J. M., Katerina, E., Omar, M. A., & David, A. (2003). Fe (II)-induced DNA damage in a-synuclein-transfected human dopaminergic BE (2)-M17 neuroblastoma cells: detection by the Comet assay. *J. Neuro Chem.*, 87, 620–630.

Frohlich, D., McCabe, M., Arnold, R., & Day, M. (2008). The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene.*, 27, 4353–4362.

Ghalem, M., Merghache, S., & Belarbi, M. (2014). Study on the antioxidant activities of root extracts of *Ziziphus lotus* from the western region of Algeria. *Pharmacogn. J.*, 6, 32–42.

Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Wiley; New York.: Cur Protocols in Food Analy Chem., 8, 22-33.

Gorinstein, S., Zachwieja, M., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., & Martín-Belloso, O. (2001). Comparative contents of dietary fiber. total phenolics. and minerals in persimmons and apples. J. of Agr and Food Chem., 49, 952-957.

Grochowski, D., Uysal, S., Aktumsek, A., Granica, S., Zengin, G., Ceylan, R., & Tomczyk, M. (2017). In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*. Phytochem. Lett., 20, 365-372.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. Rev. Médicale Liège., 62, 628-38.

Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem., 59,1609-1623.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ion in humain diseases. Mol. Aspects Med., 8, 89-19.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. (Thésis Report). Oxford University Press, Oxford.

Hamedi, S.H., Shams-Ardakani, M.R., Sadeghpour, O., Amin, Gh., Hajighasemali, D., and Orafi, H., 2016. Designing mucoadhesive discs containing stem bark extract of *Ziziphus jujuba* based on Iranian traditional documents. Iranian J of Basic Med Sci., 19, 330-336.

Harza, B., Santana, B., & Nripendranath, M. (2008). Antioxidant and free radicals scavenging activity of *Spondias Pinnata*. J. BMC., 8. 63.

Hassan, M., Oyewale, A., Amupitan, J., Abdullahi, M., & Okonkwo, E. (2004). Preliminary phytochemical and antibacterial investigation of crude extracts of the root bark of *Detarium microcarpum*. J. Chem. Soc. Nigeria., 26-29.

Herz, J., & Strickland, D. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J. Clin. Invest., 108, 779-784.

Himesh, S. S., Sharan, P., & Singhai, A. (2011). Preliminary phytochemical screening and HPLC analysis of flavonoid from methanolic extract of leaves of *Annona squamosa*. Int. Res. J. Pharm., 2, 242-246.

Hossain, M. (2019). A phytopharmacological review on the Omani medicinal plant: *Ziziphus jujube*. Ann., 31, 1352-1357.

https://www.hcp.ma/downloads/Maroc-en-chiffres_t13053.html

Islam, M., Siddiqui, A., & Rajesh, R. (2008). Synthesis, antitubercular, antifungal and antibacterial activities of 6-substituted phenyl-2-(3'-substituted phenyl pyridazin-6'-yl)-

2,3,4,5-tetrahydropyridazin-3-one. Islam M, Siddiqui AA, Rajesh R (2008) Synthesis, antitubercular, antifungal and antibacterial activities of 6-substituted phenyl-2-(3'-subs). *Acta Pol Pharm.*, 65, 353–362.

Jassabi, S., & Abdullah, M. (2013). Extraction, purification and characterization of antioxidant fractions from *Zizyphus spina-christi* fruits. *Am.-Eur. J. Toxicol. Sci.*, 5, 66–71.

Jiang, J., Huang, X., Chen, J., & Lin, Q. (2007). Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen *Zizyphus jujube*. *Nat. Prod. Res.*, 21, 310–320.

Jokotagba, A., Azim, F., Nour, A., & A-Halim, R. (1987). A chemical study of *Zizyphus spina-christi* (Nabag) fruit grown in Sudan. *Trop. Sci.*, 27, 271–273.

Jollow, D., Thorgeirsson, S., Potter, W., Hashimoto, M., & Mitchell, J. (1974). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. *Pharmacology.*, 12, 251-271.

Kadioglu, K., Onat, J., Stefan, B., Stefan, N., Janine, S., Mohamed, K., & Tanja, E. (2016). Evaluating ancient Egyptian prescriptions today: anti-inflammatory activity of *Zizyphus spina-christi*. *Phytomedicine.*, 1, 22-28.

Kaleem, W., Nisar, M., Qayum, M., Zia-Ul-Haq, A., & Adhikari, V. (2012). New 14-membered cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus oxyphylla* edgew. *Int. J. Mol. Sc.*, 13, 11520–11529.

Katarina, V., Todorovića, M., Varljenb, T., Slovića, Z., & Maticć, S. (2018). Effect of formalin fixation on PCR amplification of DNA isolated from healthy autopsy tissues. *J. Acthis.*, 1, 323-344.

Kehrer, J. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicol.*, 149, 43-50.

Khali, S., Holy, M., Grado, S., Fleming, R., Kurita, R., & Nakamura, Y. (2017). A specialized pathway for erythroid iron delivery through lysosomal trafficking of transferrin receptor. *Rapp.*, 2, 1181–1194.

Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Meth.*, 13, 8-17.

Koppenol, W., Butler, J., & Leeuwen, J. v. (1978). The Haber-Weiss Cycle. *Photochem Photobiol.*, 28, 655–658.

Laličić, P.J., Komes, D., Gorjanović, S., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Pastor, F., & Sužnjević, D. (2016). Content of total phenolics, flavan-3-ols and proanthocyanidins, oxidative stability and antioxidant capacity of chocolate during storage. *F. Tech and Biot.*, 54, 13-20.

- Leick, V., Bog-Hansen, T.C., Christensen, S.T., Kaufman, S.J. (1996). Concanavalin A Receptors and the Chemosensory Behaviour of *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Biol. Online*, 1, 1–12.
- Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., & Londoño, A. M. (2006). Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *F. Chem.*, 95, 644–652.
- Li, h., Wong, c., Cheng, k., & Chen, f. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT – F. Sci and Tech.*, 41, 385–390.
- Li, Wong, C., Cheng, K., & & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Leb Wis Tech.*, 41, 385–390.
- Lim, k. t., Hu, c., & Kitts, d. d. (2001). Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* stokes ethanol extract. *F and Chem Tox.*, 39, 229–237.
- Lin, S., Traver, D., Zhu, H., Dooley, K., Paw, B., & Zon, R. (2005). Analysis of Thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood.*, 106, 3803–3810.
- Liochev, I., & Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle 70 years later: An alternative view. *Redox Rep.*, 7, 55–57.
- Liu, J., & Henkel, T. (2002). Traditional Chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities. *Curr Med Chem.*, 9, 1483–1485.
- Liu, J., M., & Qi, Y. F. (2004). Embryo rescue of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Acta Hor.*, 663, 479–482.
- Liu, M. J., & Cheng, C. Y. (1995). A taxonomic study of the genus *Ziziphus*. *Acta Hor.*, 390, 161–165.
- Low, M., Speedy, J., & Styles, C. (2016). Daily iron supplementation for improving anemia, iron status and health in menstruating women. *J Food.*, 4, 9747.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., & others, a. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193, 265–275.
- Madhusudhan, K. S., & Oberoi, R. (2011). Renal iron deposition in aplastic anemia: magnetic resonance imaging appearance. *Indian J Nephrol*, 21, 134–135.
- Mahboba, B., Rabia, O., Abil, A., & Asma, Y. (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.*, 3, 79–84.

- Malesev, D., & Kuntic, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72, 921–939.
- Mariod, A., Ibrahim, R., Ismail, M., & N, I. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chem.*, 118, 120- 127.
- May, P., & Bulman, R. (1983). The present status of chelating agents in medicine. *Prog. Med. Chem.*, 20, 225–336.
- May, P., & Bulman, R. (1983). The present status of chelating agents in medicine. *Prog. Med. Chem.*, 20, 225–336.
- McBride, T., Preston, B., & Loeb, L. (1991). Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Bioch.*, 30, 207–213.
- McGaw, L., Elgorashi, E., & Eloff, E. (2014). Cytotoxicity of African medicinal plants against normal animal and human cells. *Toxicol Surv Afr Med Plants*. 181–133.
- Mehansho, H., Butler, L., & Carlson, D. (1987). Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 7, 423–440.
- Merlot, A., Kalinowski, D., & D.R., R. (2013). Novel chelators for cancer treatment: where are we now?. *Cancer.*, 18, 973.
- Montiel, M., Campista, S., Camacho, L., Rios, A., & Delgado, F. (2005). Physicochemical and nutritional characteristics of fruits of *Ziziphus Sonorensis* Wats (Rhamnaceae). *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 56, 587–596.
- Moroney, M., Alcaraz, M., Forder, R., Carey, F., & Hault, J. (1988). Selectivity of neutrophil5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J. Pharm Pharmacol.*, 40, 787–792.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, 65, 55–63.
- Mpiana, P., Mudogo, V., Tshibangu, D., Kitwa, E., Kanangila, A., Lumbu, M, K. (2008). Antisickling activity of anthocyanins from *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* and *Ziziphus mucronata*: photodegradation effect. *J. Ethnopharmacol.*, 120, 413–418.
- Musbah, O. M., Tanira, A. M., Ageel, M., Tariq, A., & Mohsin and Shah, A. H. (1988). Evaluation of some Pharmacological, Microbiological and Physical Properties of *Zizyphus spina-christi*. *Int. J. Crude Drug Res.*, 26, 56–60.
- Nesseem, D., Miche, I. C., Saleem, A., & El-Alfy, T. (2008). Formulation and evaluation of antihyperglycemic leaf extracts of *Ziziphus spina cristii* (L.) wild. *Pharmazie.*, 64, 104–109.

- Nisar, M. B., Adzu, K., Inamullah, A., & Bashir, A. (2007). Antinociceptive and antipyretic activities of the activities of the *Ziziphus oxyphylla* edgew leaves. *Phytother. Res.*, 21, 693–695.
- Nisar, M., Kaleem, W., Qayum, M., Marwat, I., Zia-ul-Haq, M., Ali, I., & Choudhary, M. (2011). Biological screening of *Ziziphus oxyphylla* Edgew stem. *Pak. J. Bot.*, 43, 311–317.
- Nishikimi, M., Appaji, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun.*, 46, 849–854.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 95, 351–8.
- Olivieri, N., & Brittenham, G. (1997). Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood.*, 89, 739–761.
- Osorio-Esquivel, O., Alicia-Ortiz-Moreno, Álvarez, V., Dorantes-Álvarez, L., & Giusti, M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Res. Int.*, 44, 2160–2168.
- Othman, A., Amer, M., Abdel-Mogib, M., & RF, S. (2009). Effects of the methanolic extracts of *Zizyphus spina christi*, *Olea europaea* and *Morus alba* leaves in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Egypt J Hosp Med.*, 37, 759–771.
- Paglia, D., & Valentine, W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.*, 70(1), 158–69.
- Panseeta, P., Lomchoey, K., Prabpai, S., Kongsaree, P., Suksamrarn, A., Ruchirawat, S., & Suksamrarn, S. (2011). Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of *Ziziphus mauritiana*. *Phytochemistry.*, 72, 909–915.
- Pari, L., Asaithambi, K., Paramasivam, K., & Ayyasam, R. (2015). Protective effects of *hesperidin* on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. *Toxicol Rep.*, 2, 46–55.
- Perls, D. (1867). Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Blood.*, 133, 17.
- Pietrangel, A. (2016). Mechanisms of iron hepatotoxicity. *Rep.*, 65, 226–227.
- Prior, R., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 51, 3273–3279.
- Saadoudi, M., Hambaba, L., Abdeddaim, M., Lekbir, A., Bacha, A., Boudraa, A., & Zidani, S. (2017). Nutritional composition, physical properties and sensory evaluation of biscuit produced from jujubes (fruits of *Zizyphus lotus* L.). *Ann. Food Sci. Technol.*, 18, 3.

- Sadrzadeh, S., & Eaton, J. (1988). Hemoglobin-mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. *J. Clin. Invest.*, 82, 1510–1515.
- Sakna, S., Mocan, A., Sultani, H., El-fiky, N., Wessjohann, L., & Farag, M. (2019). Metabolites profiling of *Ziziphus* leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their biological activities. *Food Chem.*, 2, 1-20.
- Saleh, M., Hasan, M., & Adam, A. (2015). Phenolic compound and antioxidant levels of *Prismatomeris rajnglabra*. *J Pharmacogn Phytochem.*, 3,5–11.
- Sarikurkcü, c., Arisoy, k., Tepe, b., Cakir, a., Abali, g., & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. Fruits from Turkey. *Food and Chem Toxi.*, 47, 2479–2483.
- Saw, S., Nieto, F., Katz, J., & Chew, S. (1998). Family risk scores and the relationship with myopia progression in Singapore children. VII International Myopia Conference. Taiwan. 57.
- Schubert, A., Pereira, D., Zanin, F., Alves, S., Beck, R., & Athayde, M. (2007). Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharm. Sci.*, 62, 876–880.
- Shahat, A., Pieters, L., Apers, S., Nazeif, N., Abdel-Azim, N., & Bergh, D. (2001). Chemical and biological investigations on *Zizyphus spina-christi* L. *Phytother. Res.*, 15, 593–597.
- Silva, B., & Faustino, P. (2015). An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Patho.*, 1852,1347–1359.
- Singh, S., Pandey, M., & Singh, J. (2006). Peptide alkaloids from *Zizyphus sativa* bark. *J. Asian Nat Prod Res.*, 8, 733–737.
- Sobhani, Z., Nikoofal-Sahlabadi, S., Amiri, M., Ramezani, M., Emami, S., & Sahebkar, A. (2019). Therapeutic Effects of *Zizyphus Jujuba* Mill. Fruit in Traditional and Modern Medicine: A Review. *Medicinal Chemistry. United Arab Emirates.* 22, 2.
- Soussen, B., Leila, H., Sara, Z., & Houda, B. (2010). Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous exploitées en Algérie : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Zizyphus lotus* L. *Fruits. Paris.*
- Taati, M., Alirezaei, M., Meshkatalasadat, M., Rasoulilian, H., Kheradmand, B., & Ar, a. N. (2011). Antioxidant effects of aqueous fruit extract of *Zizyphus jujuba* on ethanol-induced oxidative stress in the rat testes. *Iranian Jof Veterinary Res.*, 12, 134.
- Tanaka, M., Kuie, C., Nagashima, Y., & Taguchi, T. (1998). Applications of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakaishi*, 54, 1409–1414.

Thannickal, V., & Fanburg, B. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Ame J. of Phy Lung Celland Mol Phys.*, 279,1005–1028.

The Plant lists. (2013). Published on the Internet. (<http://www.theplantlist.org/>), Version 1.1.

Tolosano, E., & Altruda, F. (2002). Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. *DNA Cell Biol.*, 21, 297–306.

Toyokuni, S., Mori, T., & Dizdaroglu, M. (1994). DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int. J. Cancer.*, 57, 123–128.

Tsao, R., & Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real 431 polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid 432 chromatography. *J. Chroma.*, 1018, 29-40.

U.S.Department of Agriculture. (2016). A.R.S., Show Nutrients List.

Vandita, S., Guizani, N., Musthafa, M., Rahman, M., & Subash, S. (2012). In vitro antioxidant activities of *Ziziphus spina-christi* fruits (red date) grown in Oman. *Biotechnol.*, 11, 209–216.

Verma, R., Pandey, M., Indoria, M., Singh, R., & Suthar, S. (2018). Phytochemical investigation and pharmacological evaluation of leaves of *Ziziphus mauritiana* for wound healing activity in albino rats. *Rapp.*, 5,08-18.

Vujić, M. (2014). Molecular basis of HFE-hemochromatosis. *Front. Pharmacol.*, 5, 42.

Wassell, J. (2000). Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin. Lab.*, 46, 547–552.

Wilson, M., & Reeder, B. (2008). Oxygen-binding haem proteins. *Exp. Physiol.*, 93, 128–132.

Xiong, W., Wang, L., & Yu, F. (2014). Regulation of cellular iron metabolism and its implications in lung cancer progression. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.*, 31, 28.

Yasser, D., Ayub, M., Ali, M., & Asad, A. (2010). Physicochemical response of apple pulp to chemical preservatives and antioxidant during storage. *Internet J of Food Safety.*, 12, 20-28.

Youssif, H., Khedr, A., & Mahran, M. (2011). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Zizyphus spina-christi* fruits on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Nat Sci.*, 9, 1–7.

Yves, N. (2008). Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. (Thésis Report). Université Joseph

Tableau 6 : Activité totale de piégeage des radicaux dans différents extraits des diverses parties de *Z. spina christi* et *Z. lotus*

	<i>Ziziphus spina christi</i>					<i>Ziziphus lotus</i>				
	SU	Fruit	Pulpe	Graine	Amande	Fruit	Pulpe	Graine	Amande	
DPPH%	PE	10,830 ± 0,510 ^{ab}	2,520 ± 0,360 ^a	25,790 ± 0,300 ^a	16,10 ± 0,560 ^{abc}	18,35 ± 0,940 ^{ab}	6,662 ± 0,780 ^a	28,866 ± 0,610 ^a	23,997 ± 0,510 ^{abc}	
	CL	18,847 ± 0,363 ^{abc}	14,914 ± 0,260 ^a	29,206 ± 0,623 ^{ab}	26,168 ± 0,545	28,193 ± 0,571 ^{abc}	17,368 ± 0,493 ^a	33,606 ± 0,597 ^{ab}	26,636 ± 3,115	
	AC	30,724 ± 0,312 ^{abc}	19,276 ± 0,779 ^{abc}	46,067 ± 0,337 ^{abc}	37,967 ± 0,701 ^{ab}	40,070 ± 0,467 ^{abc}	28,076 ± 0,961 ^{abc}	51,713 ± 0,493 ^{abc}	42,796 ± 0,571 ^{ab}	
	AE	28,427 ± 0,831 ^{ab}	17,913 ± 1,142 ^a	41,706 ± 0,935 ^a	38,006 ± 1,064 ^a	34,657 ± 0,441 ^{ab}	22,508 ± 0,337 ^a	45,366 ± 0,909 ^a	42,368 ± 0,987 ^a	
	ME	39,291 ± 0,727 ^{abc}	28,154 ± 0,545 ^{abc}	55,257 ± 0,389 ^{abc}	44,743 ± 0,389 ^{abc}	52,882 ± 0,597 ^{abc}	35,514 ± 0,467 ^{abc}	62,773 ± 0,649 ^{abc}	52,687 ± 0,467 ^{abc}	
	AQ	51,986 ± 0,312 ^{ab}	35,748 ± 0,701 ^{abc}	64,875 ± 1,428 ^{abc}	55,88 ± 0,727 ^{abc}	61,916 ± 0,857 ^{ab}	48,287 ± 0,415 ^{abc}	75,857 ± 0,363 ^{abc}	65,849 ± 0,909 ^{abc}	
βCB%	PE	4,430 ± 0,380 ^a	2,560 ± 0,360	6,560 ± 0,420 ^a	3,430 ± 0,490	2,300 ± 0,130 ^a	1,630 ± 0,240	4,130 ± 0,640 ^a	2,460 ± 0,240	
	CL	9,730 ± 0,580 ^a	3,730 ± 0,360 ^a	17,200 ± 0,730 ^{ab}	12,600 ± 0,330 ^{abc}	8,100 ± 0,400 ^a	5,100 ± 0,400 ^a	10,630 ± 0,220 ^{abc}	7,300 ± 0,130 ^{abc}	
	AC	6,430 ± 0,620 ^{ab}	1,160 ± 0,420 ^{ab}	12,760 ± 0,290	6,730 ± 0,290 ^a	0,560 ± 0,380 ^{ab}	4,500 ± 0,470 ^{ab}	13,200 ± 0,400	4,900 ± 0,400 ^a	
	AE	12,230 ± 0,180 ^{ab}	11,430 ± 0,440 ^a	20,030 ± 0,420 ^{abc}	17,130 ± 0,580 ^{ab}	9,030 ± 0,420 ^{ab}	10,000 ± 0,400 ^a	14,930 ± 0,310 ^{abc}	11,660 ± 0,440 ^{abc}	
	ME	19,030 ± 0,420 ^a	15,230 ± 0,510 ^{ab}	43,930 ± 0,440 ^{ab}	39,000 ± 0,200	16,730 ± 0,560 ^{abc}	11,100 ± 0,200 ^{ab}	40,230 ± 0,440 ^{ab}	38,560 ± 0,360	
	AQ	20,700 ± 0,270 ^{ab}	18,200 ± 0,130 ^{abc}	52,360 ± 0,290 ^{abc}	43,130 ± 0,560 ^a	14,400 ± 0,470 ^{abc}	12,000 ± 0,330 ^{abc}	48,260 ± 0,360 ^{abc}	40,160 ± 0,240 ^{abc}	
MCA%	PE	5,750 ± 0,830	3,043 ± 0,300	15,920 ± 1,280	9,950 ± 1,310 ^a	12,490 ± 3,440	3,210 ± 1,260	20,130 ± 1,590	4,750 ± 1,250 ^{abc}	
	CL	16,670 ± 0,740 ^a	19,540 ± 1,320 ^a	26,820 ± 1,990 ^a	22,080 ± 1,400	22,300 ± 1,400 ^{abc}	15,120 ± 0,590 ^a	34,110 ± 2,430 ^a	24,390 ± 1,180	
	AC	37,750 ± 2,210	38,630 ± 1,180	51,100 ± 2,060	41,830 ± 1,470	41,500 ± 2,500	41,170 ± 1,910	54,190 ± 0,810	42,940 ± 1,400	
	AE	31,790 ± 1,550	28,150 ± 1,320	40,180 ± 1,620 ^a	31,900 ± 2,500	33,660 ± 0,810	30,350 ± 0,740	46,910 ± 1,250 ^a	34,770 ± 1,990	
	ME	42,940 ± 2,280 ^a	45,920 ± 3,460	59,050 ± 0,960 ^a	50,880 ± 1,620	49,010 ± 1,320 ^{abc}	50,660 ± 2,430	63,250 ± 0,440 ^a	55,850 ± 2,940	
	AQ	60,820 ± 0,740 ^a	61,370 ± 1,030	81,190 ± 0,880	72,360 ± 1,180	65,670 ± 1,180 ^{abc}	63,580 ± 3,970	73,510 ± 0,660	66,670 ± 1,620	
H₂O₂%	PE	24,060 ± 0,760	9,180 ± 0,500 ^a	37,390 ± 0,720 ^{ab}	23,740 ± 1,230	24,450 ± 1,390	14,280 ± 1,140 ^a	44,080 ± 0,250 ^{ab}	27,210 ± 0,470	
	CL	32,130 ± 0,190 ^a	22,650 ± 0,680 ^a	45,050 ± 0,470 ^{abc}	37,690 ± 0,420 ^{abc}	37,440 ± 0,830 ^{abc}	25,340 ± 0,540 ^a	51,590 ± 0,640 ^{abc}	42,320 ± 0,330 ^{abc}	
	AE	24,910 ± 0,380 ^a	29,020 ± 0,540 ^{ab}	34,610 ± 0,850 ^{abc}	25,120 ± 0,520 ^a	26,790 ± 0,170 ^a	33,930 ± 0,520 ^{ab}	42,290 ± 0,610 ^{abc}	27,950 ± 0,750 ^{abc}	
	AC	46,780 ± 0,870 ^{abc}	26,430 ± 1,130 ^a	64,080 ± 0,400 ^{abc}	52,120 ± 0,280 ^{abc}	53,430 ± 1,040 ^{abc}	30,330 ± 0,450 ^a	73,990 ± 0,280 ^{abc}	61,680 ± 0,140 ^{abc}	
	ME	46,530 ± 1,040 ^a	35,880 ± 0,500 ^{abc}	58,700 ± 0,850 ^{ab}	46,250 ± 0,520 ^a	49,820 ± 0,450 ^a	45,400 ± 0,260 ^{abc}	67,980 ± 0,400 ^{ab}	48,660 ± 0,520 ^{abc}	
	AQ	55,590 ± 0,590	45,860 ± 0,640 ^a	70,240 ± 0,330 ^{abc}	56,940 ± 0,470	57,150 ± 0,520	49,220 ± 0,680 ^a	78,270 ± 0,260 ^{abc}	61,250 ± 2,620	
Les résultats de l'activité de piégeage de la DPPH, de la βCB, du MCA et de l'H ₂ O ₂ ont été exprimés en % d'inhibition. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3). Des lettres différentes sur la même ligne signifient une différence significative (p<0,05 : ^a et p<0,005 : ^{ab}) par le test Student-Newman Keuls entre les mêmes parties botaniques pour chaque espèce.										
SU:	Solvant utilisé (PE=éther de pétrole ; CL=chloroforme ; EA= acétate d'éthyle ; AC=acétone ; ME=méthanol ; DW= eau bidistillée)									
DPPH%:	Activité de piégeage des radicaux DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (%)									
βCB%:	β-Carotène Inhibition du blanchiment (%)									
MCA%:	Activité de chélation des métaux (%)									
H₂O₂%:	Activité de piégeage des radicaux du peroxyde d'hydrogène (%)									

<i>Ziziphus spina christi</i>						<i>Ziziphus lotus</i>			
	SU	Fruit	Pulpe	Graine	Amande	Fruit	Pulpe	graine	amande
ABTS (mg TE/g DW)	PE	2.880 ± 0.030 ^{ab}	2.350 ± 0.050 ^a	7.190 ± 0.040 ^{abc}	3.150 ± 0.030 ^{abc}	2.460 ± 0.050 ^{ab}	2.150 ± 0.030 ^a	5.580 ± 0.050 ^{abc}	2.360 ± 0.050 ^{abc}
	CL	5.670 ± 0.040 ^{abc}	3.160 ± 0.030	10.600 ± 0.040 ^{abc}	6.300 ± 0.050 ^{abc}	3.730 ± 0.040 ^{abc}	3.160 ± 0.050	9.770 ± 0.080 ^{abc}	5.290 ± 0.060 ^{abc}
	AC	9.730 ± 0.080 ^{abc}	7.590 ± 0.110	15.210 ± 0.060 ^{abc}	10.250 ± 0.040 ^{abc}	6.740 ± 0.090 ^{abc}	7.780 ± 0.090	12.820 ± 0.070 ^{abc}	13.310 ± 0.100 ^{abc}
	AE	23.860 ± 0.140 ^{ab}	14.000 ± 0.060 ^{abc}	36.610 ± 0.100 ^{abc}	28.640 ± 0.140 ^{ab}	22.040 ± 0.250 ^{ab}	21.960 ± 0.190 ^{abc}	34.500 ± 0.330 ^{ab}	27.040 ± 0.180 ^{ab}
	ME	20.610 ± 0.060 ^{abc}	19.390 ± 0.140 ^{abc}	38.040 ± 0.080 ^{abc}	26.230 ± 0.200 ^{abc}	18.850 ± 0.080 ^{abc}	16.100 ± 0.100 ^{abc}	33.460 ± 0.060 ^{abc}	21.970 ± 0.110 ^{abc}
	AQ	23.560 ± 0.280 ^{abc}	24.780 ± 0.210 ^{abc}	43.610 ± 0.170 ^{abc}	30.160 ± 0.250 ^{abc}	18.380 ± 0.200 ^{abc}	19.620 ± 0.170 ^{abc}	33.650 ± 0.210 ^{abc}	26.360 ± 0.280 ^{abc}
FRAP (mg QE/g DW)	PE	2.060 ± 0.040 ^a	1.770 ± 0.040 ^{abc}	5.770 ± 0.040 ^a	0.210 ± 0.090 ^{ab}	2.580 ± 0.110 ^a	2.540 ± 0.120 ^{abc}	5.600 ± 0.040 ^a	1.940 ± 0.060 ^{ab}
	CL	4.010 ± 0.030	3.110 ± 0.030 ^{abc}	6.990 ± 0.950	1.030 ± 0.470 ^{ab}	3.440 ± 0.640	4.220 ± 0.060 ^{abc}	7.680 ± 0.020	4.130 ± 0.120 ^{ab}
	AC	6.960 ± 0.080 ^{ab}	6.940 ± 0.160 ^a	11.080 ± 0.070 ^{abc}	3.050 ± 0.150 ^{abc}	7.470 ± 0.100 ^{ab}	7.690 ± 0.160 ^a	13.150 ± 0.030 ^{abc}	6.910 ± 0.120 ^{abc}
	AE	11.890 ± 0.270 ^{ab}	12.850 ± 1.350	23.060 ± 0.310 ^{abc}	8.890 ± 0.180 ^{abc}	13.750 ± 0.150 ^{ab}	13.910 ± 0.110	28.270 ± 0.070 ^{abc}	15.070 ± 0.330 ^{abc}
	ME	23.120 ± 0.230	22.950 ± 0.210 ^{abc}	35.020 ± 0.150 ^a	25.560 ± 0.150 ^{abc}	23.930 ± 1.840	24.620 ± 0.180 ^{abc}	36.130 ± 0.250 ^a	22.500 ± 0.180 ^{abc}
	AQ	22.240 ± 0.150	23.690 ± 0.260 ^{abc}	43.140 ± 1.400 ^a	64.890 ± 0.270 ^{ab}	22.640 ± 0.320	26.330 ± 0.250 ^{abc}	39.080 ± 0.090 ^a	52.200 ± 0.360 ^{ab}
ORAC (mg TE/g DW)	PE	3.470 ± 0.070 ^{ab}	2.010 ± 0.080 ^a	3.630 ± 0.030 ^{abc}	2.710 ± 0.040 ^{abc}	2.520 ± 0.100 ^{ab}	1.760 ± 0.040 ^a	2.690 ± 0.020 ^{abc}	2.200 ± 0.050 ^{abc}
	CL	3.660 ± 0.100 ^{ab}	1.750 ± 0.060 ^{ab}	4.310 ± 0.080 ^{ab}	4.040 ± 0.090 ^{abc}	3.190 ± 0.060 ^{abc}	2.120 ± 0.040 ^{abc}	3.600 ± 0.080 ^{ab}	2.860 ± 0.090 ^{abc}
	AC	6.270 ± 0.180 ^a	2.940 ± 0.110 ^a	7.350 ± 0.070 ^{abc}	6.370 ± 0.080 ^{abc}	5.710 ± 0.070 ^a	2.490 ± 0.050 ^a	4.900 ± 0.040 ^{abc}	4.410 ± 0.120 ^{abc}
	AE	11.420 ± 0.120 ^{ab}	6.660 ± 0.220	14.780 ± 0.140 ^{abc}	12.330 ± 0.160	10.190 ± 0.150 ^{abc}	6.270 ± 0.150	9.970 ± 0.260 ^{abc}	9.250 ± 1.110
	ME	13.420 ± 0.110 ^a	9.450 ± 0.080 ^a	19.310 ± 0.260 ^{abc}	15.720 ± 0.400 ^{ab}	12.710 ± 0.170 ^a	11.140 ± 0.340 ^a	14.440 ± 0.310 ^{abc}	13.250 ± 0.170 ^{ab}
	AQ	13.880 ± 0.230 ^a	10.530 ± 0.240 ^{ab}	20.940 ± 0.460 ^{abc}	15.910 ± 0.270 ^a	13.060 ± 0.050 ^a	12.190 ± 0.350 ^{ab}	17.170 ± 0.150 ^{ab}	14.760 ± 0.120 ^a
CUPRAC (mg QE/g DW)	PE	2.390 ± 0.040 ^{abc}	2.490 ± 0.030 ^{abc}	5.030 ± 0.020 ^{abc}	3.410 ± 0.030 ^{abc}	1.940 ± 0.040 ^{abc}	2.040 ± 0.020 ^{abc}	4.290 ± 0.030 ^{abc}	2.640 ± 0.030 ^{abc}
	CL	3.220 ± 0.030 ^{abc}	1.440 ± 0.010 ^{ab}	6.060 ± 0.030 ^{abc}	2.920 ± 0.030	1.270 ± 0.010 ^{abc}	1.080 ± 0.050 ^{ab}	4.020 ± 0.010 ^{abc}	2.930 ± 0.020
	AC	5.620 ± 0.030 ^{abc}	3.560 ± 0.040 ^{abc}	10.310 ± 0.050 ^{abc}	4.770 ± 0.100 ^{ab}	2.270 ± 0.030 ^{abc}	2.170 ± 0.030 ^{abc}	7.970 ± 0.050 ^{abc}	5.350 ± 0.100 ^{ab}
	AE	18.610 ± 0.090 ^{abc}	8.750 ± 0.090 ^{abc}	23.830 ± 0.170 ^{abc}	17.710 ± 0.130 ^{abc}	13.850 ± 0.080 ^{abc}	10.970 ± 0.210 ^{ab}	18.590 ± 0.090 ^{abc}	14.760 ± 0.190 ^{abc}
	ME	18.110 ± 0.130 ^{abc}	11.190 ± 0.120 ^{abc}	24.070 ± 0.100 ^{abc}	16.580 ± 0.160 ^{abc}	14.450 ± 0.070 ^{abc}	12.690 ± 0.050 ^{abc}	25.500 ± 0.130 ^{abc}	12.940 ± 0.150 ^{abc}
	AQ	14.260 ± 0.130 ^{abc}	24.780 ± 0.160 ^{abc}	43.630 ± 0.090 ^{abc}	34.380 ± 0.550 ^{abc}	11.090 ± 0.140 ^{abc}	11.780 ± 0.100 ^{abc}	27.540 ± 0.060 ^{abc}	13.720 ± 0.070 ^{abc}

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3). Des lettres différentes dans la même ligne signifient une différence significative (p<0,05 : ^a et p<0,005 : ^{ab}) par le test Student-Newman Keuls entre les mêmes parties botaniques pour chaque espèce.

SU: Solvant utilisé (PE=éther de pétrole ; CL=chloroforme ; EA= acétate d'éthyle ; AC=acétone ; ME=méthanol ; DW= eau bidistillée)

ABTS-+: ABTS-+(2, 2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique) activité de piégeage des radicaux, exprimée en mg d'équivalent Trolox par gramme de poids sec (mg TE/g DW)

FRAP: Activité de piégeage des radicaux FRAP, exprimée en mg d'équivalent quercétine par gramme de poids sec (mg QE/g DW).

ORAC ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) activité de piégeage des radicaux, exprimée en mg d'équivalent Trolox par gramme de poids sec (mg TE/g DW)

CUPRAC: Activité antioxydante de réduction cuivrique exprimée en mg d'équivalent quercétine gallique par gramme de poids sec (mg d'EAG/g de poids sec).

Tableau 7 : Analyse par HPLC-DAD-QTOF-MS de la teneur en composés phénoliques

Compound ($\mu\text{g/g DW}$)	Rt (min)	Z. lotus			Z.spina christi			
		Pulpe	Amande	Almonds	Pulpe	Graine	Almande	
1	Acide gallique	2,49	nd	15,33 ^a ± 1,55	nd	5,09 ^b ± 1,23	13,38 ^a ± 1,66	3,00 ^c ± 0,84
2	Procyanidine B1	3,88	6,52 ^b ± 2,83	17,72 ^a ± 1	1,30 ^c ± 0,22	2,89 ^a ± 1,00	nd	nd
3	Unkonum	5,01	1,19 ^b ± 0,08	16,92 ^a ± 1,77	nd	nd	13,77 ^a ± 3,22	nd
4	Catechin	5,48	1,11 ^b ± 0,23	12,56 ^a ± 1,06	nd	1,28 ^b ± 1,66	10,98 ^a ± 2,78	nd
5	Procyanidine B2	6,89	8,56 ^b ± 1,33	112,66 ^a ± 10,89	nd	63,22 ^b ± 10,21	425,44 ^a ± 11,35	nd
6	Acide chlorogénique	7,11	385,60 ^a ± 21,66	258,55 ^b ± 15,78	103 ^c ± 13,78	33,80 ^a ± 2,66	15,00 ^b ± 4,88	8,00 ^c ± 1,77
7	Unkonum	7,23	55,20 ^b ± 11,88	79,09 ^a ± 11,45	nd	40,00 ^b ± 5,17	15,19 ^c ± 2,17	42,98 ^a ± 12,56
8	Cyanidin-3-galactosidase	8,25	nd	10,16 ^a ± 1,33	nd	36,77 ^a ± 4,12	131,78 ^{ab} ± 12,78	22,85 ^a ± 2,60
9	Acide caféique	9,82	6,5 ^b ± 1,23	13,29 ^a ± 2,97	nd	52,19 ^b ± 17,02	576,33 ^a ± 23,19	2,78 ^c ± 0,92
10	Anthocyanine	10,64	9,02 ^b ± 1,56	319 ^a ± 17,16	nd	1,27 ^b ± 0,78	586,09 ^a ± 34,77	nd
11	Epicatechin	12,20	8,38 ^b ± 0,89	10,67 ^a ± 1,78	nd	11,33 ^b ± 1,56	73,66 ^a ± 12,66	nd
12	Cyanidin-3-rutinoside	12,88	7,48 ^b ± 1,32	8,55 ^a ± 2,05	nd	10,27 ^b ± 0,80	43,88 ^a ± 15,03 d	nd
13	Acide p-coumarique	14,90	nd	14,01 ^a ± 1,65	nd	nd	nd	nd
14	Inconnu	16,56	nd	11,68 ^a ± 1,00	nd	nd	nd	nd
15	3-hydroxyphlorétin e 2'-xyloglucoside	20,12	nd	10,99 ^a ± 2,71	nd	nd	nd	nd
16	Rutin	22	nd	1,95 ^a ± 0,11	nd	nd	nd	nd
17	Inconnu	23	12,22 ^b ± 6,93	48,13 ^a ± 9,01	nd	nd	101,68 ^{ab} ± 4,88	nd
18	Acide p-hydroxybenzoïque	24,59	38,13 ^b ± 11,21	69,33 ^a ± 8,22	nd	nd	113,45 ^b ± 11,30	nd
19	Unkonum	25,87	22,78 ^b ± 2,96	55,89 ^b ± 6,90	1,73 ^c ± 0,24	69,68 ^a ± 14,22	nd	66,09 ^b ± 11,22
20	Acide vanillique	28	nd	61,29 ^a ± 11,32	0,88 ^b ± 0,21	nd	13,79 ^a ± 1,09	nd
21	Acide syringique	23,09	0,70 ^b ± 0,14	31,0 ^a ± 6,65	nd	269,55 ^a ± 22,89	210,04 ^b ± 28,66	nd
22	Acide férulique	31,07	19,98 ^b ± 13,30	115,84 ^a ± 24,26	1,55 ^c ± 0,88	125,22 ^a ± 11,67	nd	nd
23	Acide sinapique	31,79	21,81 ^a ± 2,08	23,31 ^c ± 8,11	0,85 ^{ab} ± 0,66	171,88 ^b ± 31,02	119,78 ^c ± 10,55	185,67 ^a ± 12,67
24	Naringin	33,58	5,2 ^b ± 0,27	12,59 ^a ± 1,07	0,59 ^c ± 0,54	1,23 ^b ± 0,12	2,78 ^a ± 0,78	nd
25	Acide salicylique	34,01	3,96 ^a ± 1,09	10,12 ^a ± 1,38	1,55 ^c ± 0,91	nd	nd	nd
26	Acide rosmarinique	35,31	63,69 ^b ± 7,89	464,55 ^a ± 32,06	2,77 ^c ± 0,60	222,18 ^a ± 34,89	560,08 ^c ± 35,28	nd
27	Hyperin	35,67	nd	nd	nd	1,18 ^b ± 0,19	2,11 ^a ± 0,73	nd
28	Avicularoside	35,90	nd	nd	nd	nd	19,23 ^a ± 1,37	nd
29	Resveratrol	36,15	10,46 ^b ± 3,11	11,88 ^a ± 2,10	nd	19,33 ^b ± 4,86	22,60 ^a ± 2,82	nd
30	Quercetin	36,38	11,59 ^b ± 1,98	13,67 ^a ± 4,19	nd	25,08 ^b ± 1,83	31,78 ^a ± 6,88	nd

Les lettres de a à c dans la même ligne pour la même espèce diffèrent significativement à $p < 0,05$.

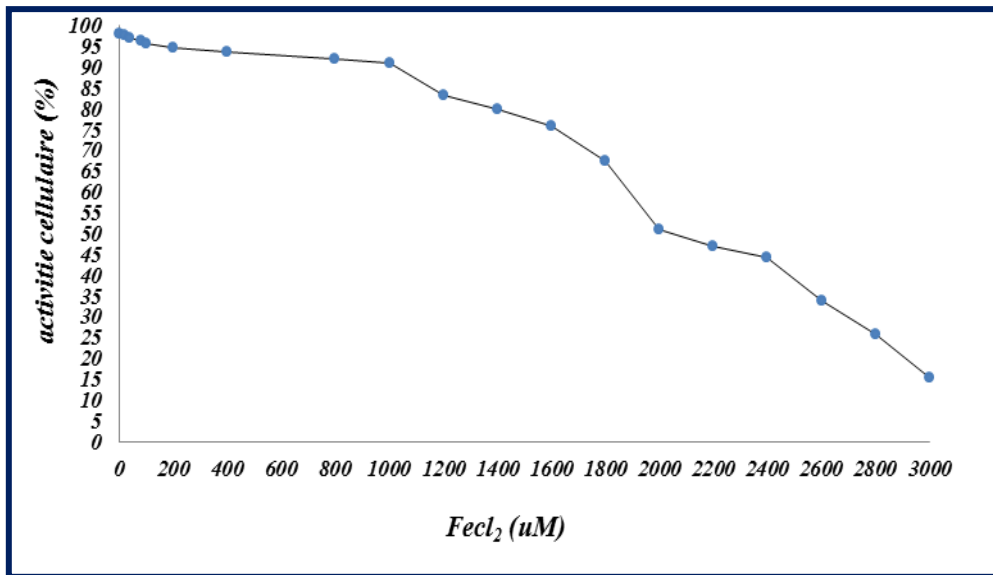


Figure 17 : L'activité cellulaire est évaluée par le test MTT.

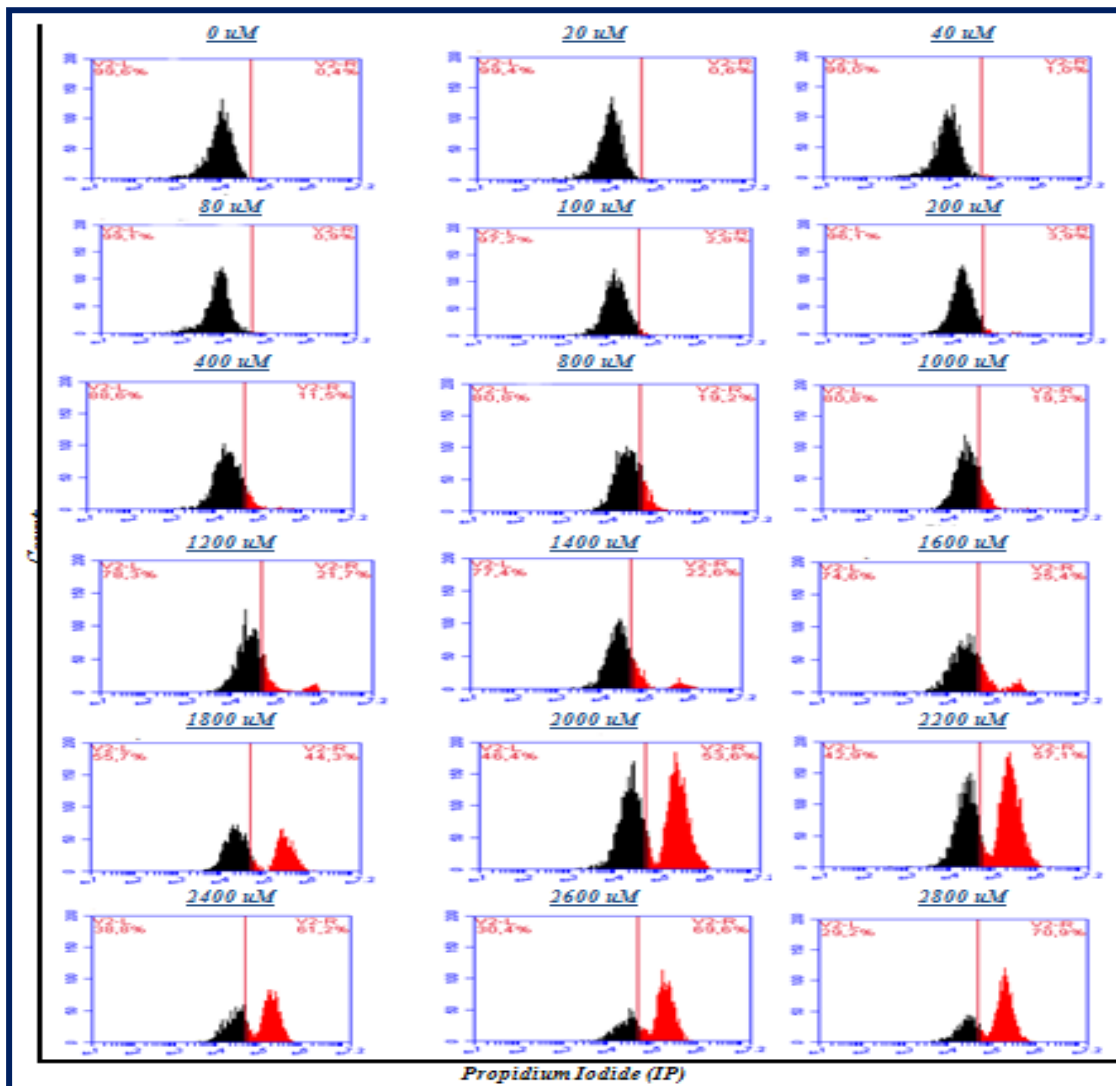


Figure 18 : Histogrammes de cytométrie en flux dérivés de diagrammes de dispersion montrant la fluorescence de *Tetrahymena pyriformis* vivant ou mort colorée par iodure Propidium (PI) après 24 h d'incubation avec du chlorure de fer (II) (0-3mM).

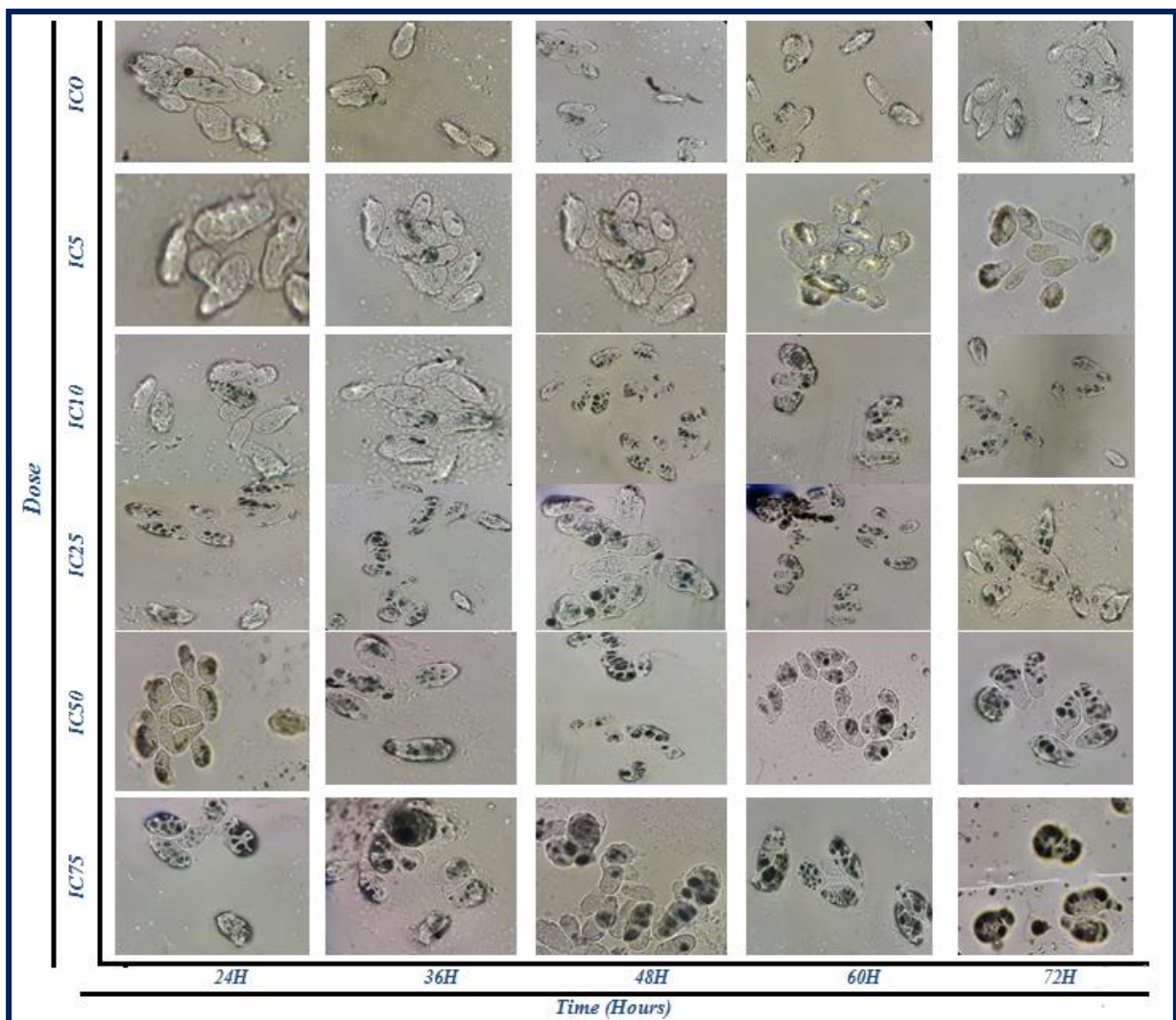
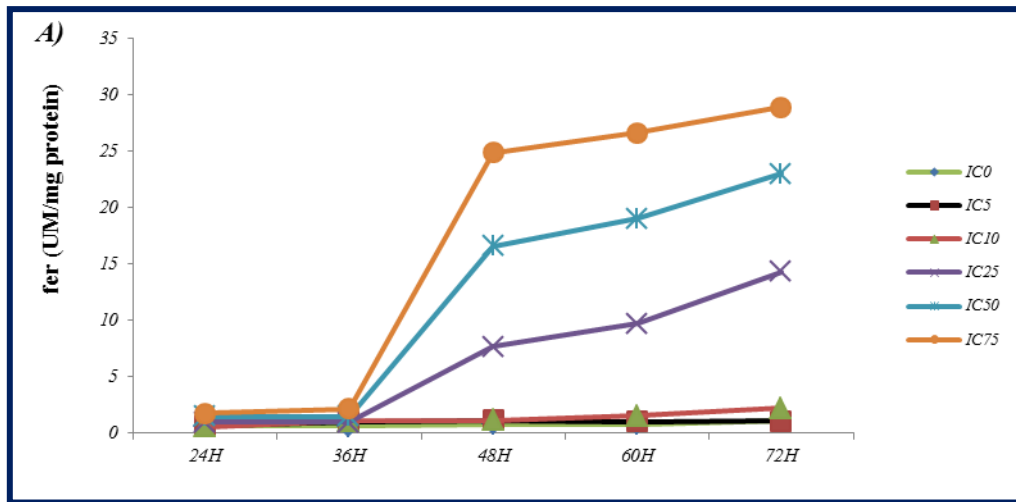


Figure 19 : Teneur en fer intracellulaire évaluée par le dosage colorimétrique à base de ferrozine (A) et la coloration au bleu de Prusse de Perl (B).

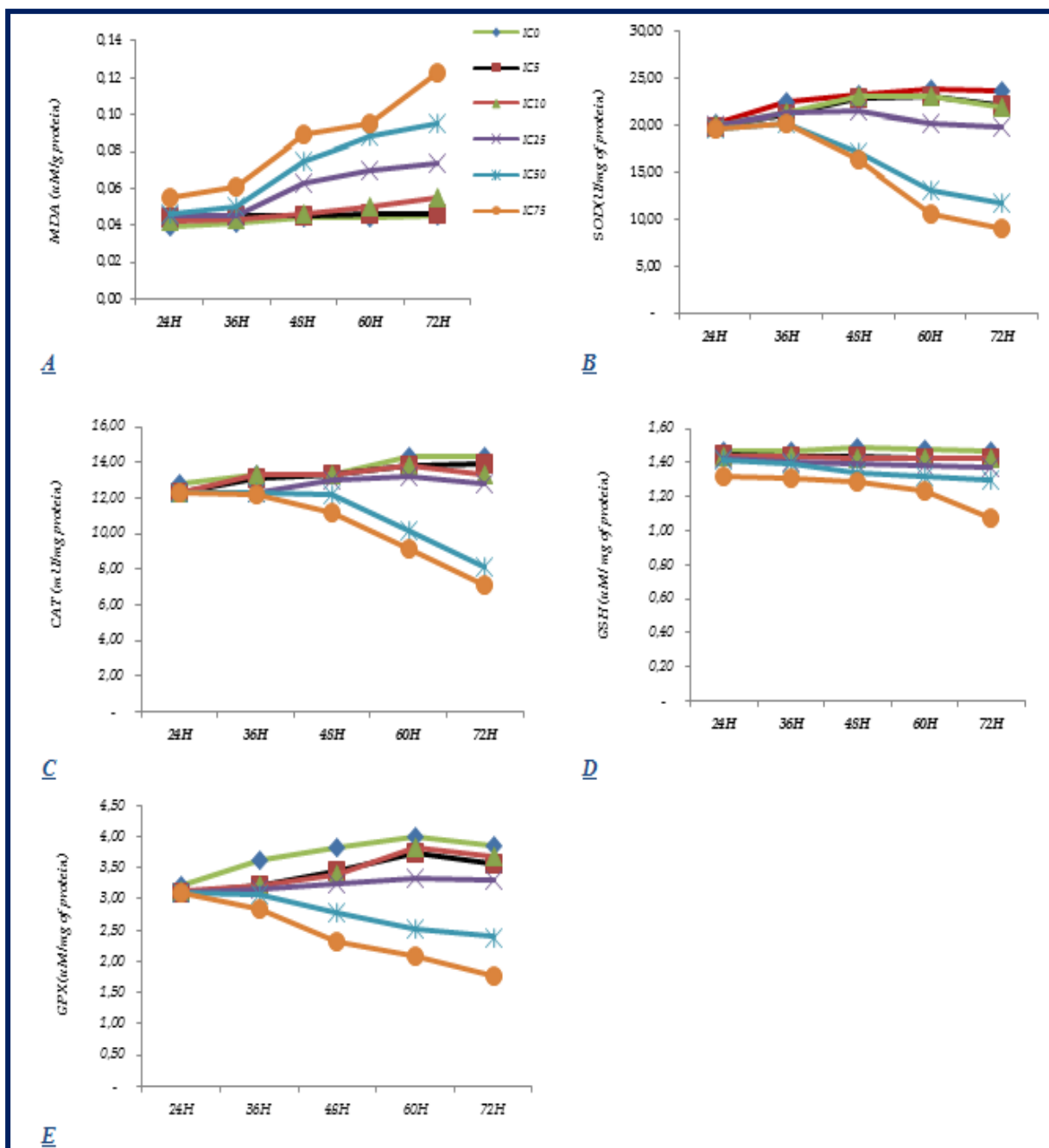


Figure 20 : Changements dans les activités des enzymes de stress oxydative après 24 h d'incubation avec du chlorure de fer (II) (0-3mM) pendant des intervalles de temps variables

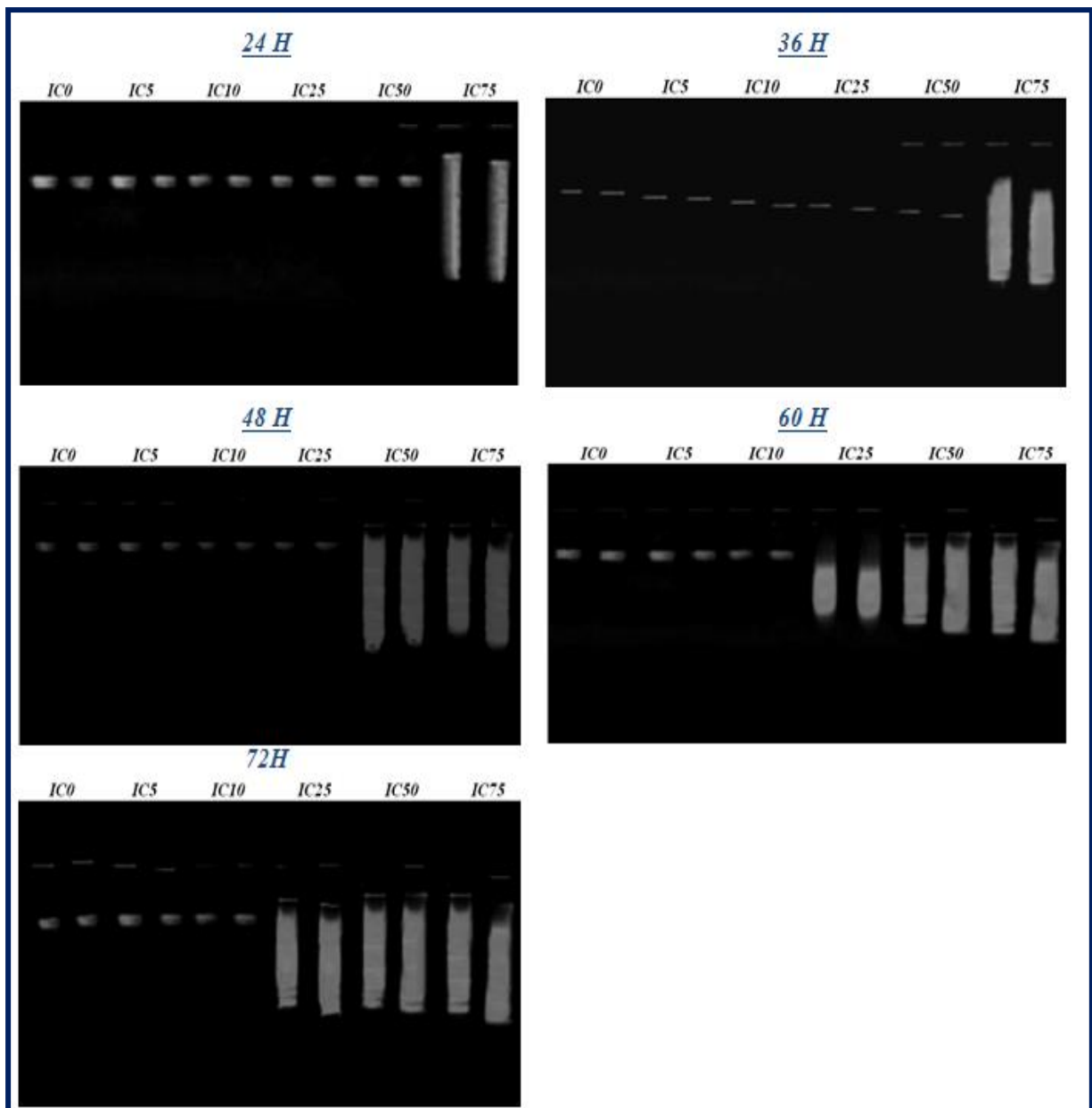


Figure 21 : Électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait de *Tetrahymena pyriformis* exposé à différentes concentrations de chlorure de fer (II) pendant des intervalles de temps variables

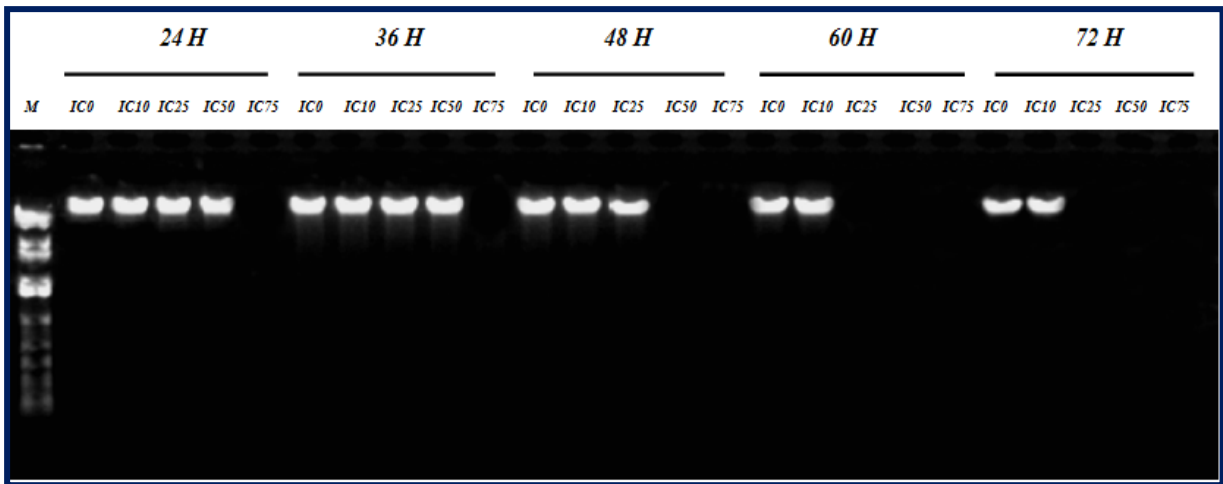


Figure 22 : Analyse par électrophorèse pour l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase du gène de la métallothionéine (MT).

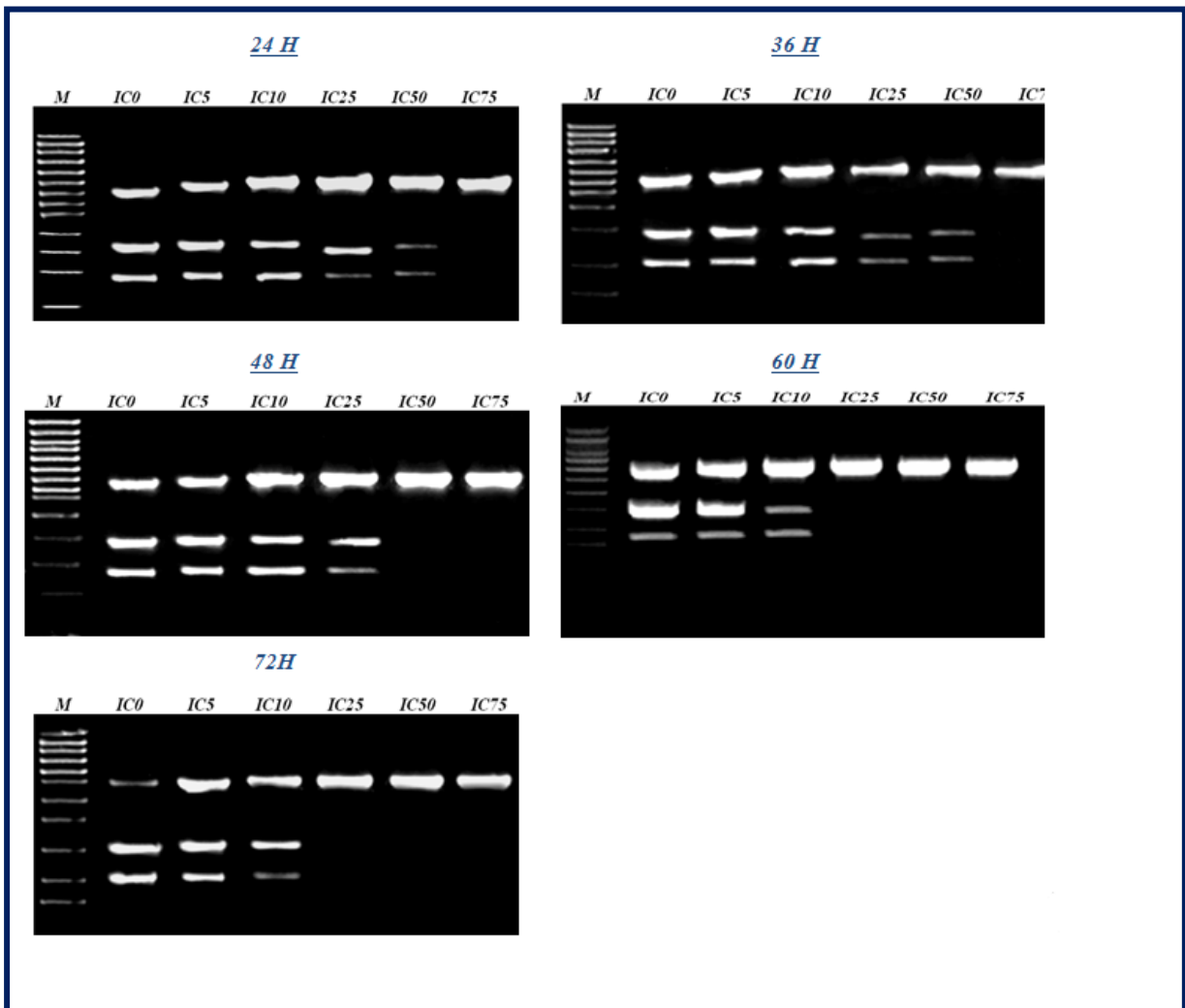


Figure 23 : Analyse par électrophorèse du produit de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) après digestion avec l'enzyme de restriction *HindIII* Digestion.