

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix-Travail-Patrie

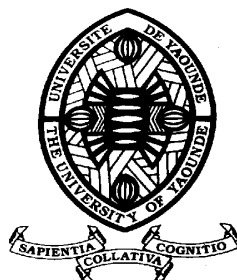
\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET  
DE FORMATION DOCTORALE  
EN SCIENCES, TECHNOLOGIES  
ET GEOSCIENCES

\*\*\*\*\*

LABORATOIRE D'ETUDE  
CHIMIQUE DES ENDOPHYTES  
ET DES PLANTES  
MÉDICINALES  
\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace-Work-Fatherland

\*\*\*\*\*

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*

POST GRADUATE SCHOOL OF  
SCIENCES, TECHNOLOGY AND  
GEOSCIENCES

\*\*\*\*\*

CHEMICAL STUDY OF  
ENDOPHYTES AND MEDICINALES  
PLANTS LABORATORY  
\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION DOCTORALE EN CHIMIE ET  
APPLICATIONS

DOCTORAL RESEARCH UNIT FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

Spécialité : Chimie organique

**ETUDE CHIMIQUE DES ECORCES DU TRONC  
D'UNE PLANTE MEDICINALE CAMEROUNAISE :  
*Citrus grandis* (Rutaceae)**

Mémoire rédigé et présenté publiquement en accomplissement partiel en vue de  
L'obtention du **Master** en chimie organique

Par :

**BOUWE TCHOTCHA Wariène**

Matricule : 17E2526

*Licencié en chimie*

Sous la direction de :

**Dr. FOTSO WABO Ghislain**

*Maître de Conférences, U.Y.1*



Année académique 2021-2022

## Table des matières

### Table des matières

|                                                                              |                             |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| DEDICACE .....                                                               | Erreur ! Signet non défini. |
| REMERCIEMENTS.....                                                           | v                           |
| LISTE DES ABREVIATIONS .....                                                 | x                           |
| RESUME.....                                                                  | xii                         |
| ABSTRACT .....                                                               | xiii                        |
| INTRODUCTION GENERALE .....                                                  | 14                          |
| INTRODUCTION.....                                                            | 1                           |
| CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....                                    | 1                           |
| CHAPITRE I : REVUE DE LA littérature .....                                   | 2                           |
| I. ETUDE BOTANIQUE .....                                                     | 2                           |
| I.1. Généralités sur la famille des Rutaceae .....                           | 2                           |
| I.1.1. Répartition géographique .....                                        | 2                           |
| I.1.2. Usages des Rutaceae .....                                             | 3                           |
| I.2. Généralités sur le genre <i>Citrus</i> .....                            | 4                           |
| I.2.1. Aspect botanique du genre <i>Citrus</i> .....                         | 4                           |
| I.2.2. Quelques usages du genre <i>citrus</i> .....                          | 5                           |
| I.2.3. Répartition géographique du genre <i>Citrus</i> en Afrique .....      | 6                           |
| I.2.4. La répartition géographique du genre <i>Citrus</i> au Cameroun .....  | 6                           |
| I.3. Généralités sur <i>Citrus grandis</i> .....                             | 8                           |
| I.3.1. Quelques usages des plantes du genre <i>Citrus</i> .....              | 9                           |
| I.3.1.1. Sur le plan thérapeutique.....                                      | 9                           |
| I.3.1.2. Sur le plan alimentaire .....                                       | 10                          |
| I.3.1.3. Sur le plan industriel .....                                        | 11                          |
| I.4.2. Travaux chimiques antérieurs sur le genre <i>Citrus</i> .....         | 11                          |
| I.4.2.1. Alcaloïdes.....                                                     | 11                          |
| I.4.2.1.1. Généralités sur les alcaloïdes .....                              | 11                          |
| I.4.2.1.2. Biosynthèse des alcaloïdes de type acridones .....                | 14                          |
| I.4.2.1.3. Quelques données spectrales des alcaloïdes de type acridone ..... | 15                          |

|                                                                             |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| I.4.2.2. Les limonoïdes .....                                               | 16                                 |
| I.4.2.2.1. Généralités sur les limonoïdes .....                             | 16                                 |
| I.4.2.2.2. Biosynthèse des limonoïdes .....                                 | 19                                 |
| I.4.2.2.3. Classification des limonoïdes.....                               | 21                                 |
| I.4.2.2.4. Spectroscopie infrarouge des limonoïdes.....                     | 22                                 |
| I.4.2.2.5. Spectrométrie de masse.....                                      | 23                                 |
| I.4.2.2.6. Spectroscopies de RMN <sup>1</sup> H.....                        | 23                                 |
| I.4.2.2.7. Spectroscopie de RMN <sup>13</sup> C .....                       | 23                                 |
| I.4.2.2.8. RMN 2D.....                                                      | 24                                 |
| I.4.2.3. Les flavonoïdes .....                                              | 24                                 |
| I.4.2.3.1. Généralités sur les flavonoides.....                             | 24                                 |
| I.4.2.3.2. Biosynthèse des flavonoïdes .....                                | 25                                 |
| I.4.2.3.1. Quelques flavonoïdes isolés de <i>Citrus grandis</i> .....       | 27                                 |
| I.4.2.4. Les Coumarines.....                                                | 28                                 |
| I.4.2.4.1. Généralités sur les coumarines .....                             | 28                                 |
| I.4.2.4.2. Biosynthèse des coumarines .....                                 | 29                                 |
| I.4.2.4.3. Quelques coumarines isolées de <i>Citrus</i> .....               | 32                                 |
| I.4.2.5. Les Huiles essentielles .....                                      | 32                                 |
| I.4.2.5.1. Généralités sur les huiles essentielles .....                    | 32                                 |
| I.4.2.5.2. Propriétés et activités biologiques des huiles essentielles..... | 34                                 |
| <b>CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>                           | <b>36</b>                          |
| <b>II. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>                                    | <b>36</b>                          |
| II.1. Extraction et isolement <b>des composés</b> .....                     | 37                                 |
| II.2. Identification des composés isolés.....                               | 39                                 |
| II.2.1. Alcaloïdes acridones .....                                          | 39                                 |
| II.2.1.1. Identification de CGE3 .....                                      | 39                                 |
| II.2.1.2. Identification de CGE1 .....                                      | 47                                 |
| II.2.1.3. Identification de CGE5 .....                                      | 52                                 |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>                                     | <b>56</b>                          |
| <b>CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES .....</b>                           | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| <b>III. APPAREILLAGE ET MATERIEL VEGETAL.....</b>                           | <b>59</b>                          |
| III.1. Appareillage .....                                                   | 59                                 |

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.2. Matériel végétal .....                                      | 59        |
| III.3. Extraction .....                                            | 60        |
| III.4. Isolement et purification.....                              | 60        |
| III.5. Caractéristiques physico-chimiques des composés isolés..... | 64        |
| III.6. Tests caractéristiques des composés isolés.....             | 67        |
| III.6.1. Test d'Erhlich .....                                      | 67        |
| III.6.2. Test de Dragendorff et de Bouchardat.....                 | 67        |
| III.6.3. Test au chlorure ferrique .....                           | 68        |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>                            | <b>69</b> |

DEDICACE

*Je dédie ce travail :*

*A mes parents : TCHOTCHA Lévi & MOUGOUÉ MBOUWE Mariète*

*A ma tante : KOUEKAM Jacqueline et ma cousine : TCHAKOUE  
NGANDEU Virgine*

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux vont à l'endroit de tous ceux qui, de près, ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je pense particulièrement :

A mon Dieu le tout-puissant qui m'a donné la force et le courage nécessaire pour l'accomplissement de ce travail.

Au P<sub>r</sub>. NGADJUI Bonaventure, pour m'avoir accepté dans son Laboratoire.

Au P<sub>r</sub>. FOTSO Ghislain, mon directeur de recherche pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et de m'avoir confié ce sujet. Vous m'avez initié à la recherche, votre rigueur, votre disponibilité et votre façon de travailler m'ont permis d'être plus attentif et plus critique vis-à-vis de mon travail.

Au P<sub>r</sub>. PEGNYEMB Dieudonné, Chef de Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé 1, pour le travail et l'attention à l'endroit des étudiants de son Département.

A tous les enseignants du Département de Chimie Organique pour la formation intellectuelle et morale qu'ils m'ont apporté.

Je tiens à remercier Madame NGOLONG Rosine pour son encadrement et son soutien indéfectible au laboratoire qui a conduit à la réalisation des objectifs fixés.

Je également à remercier M. MOIFO Thomas pour son aide dans l'analyse et l'enregistrement des spectres.

A tous mes aînés de laboratoire notamment KACHE Sorelle, KAMSO Viviane, TCHOFFO Idriss, KAMDOUM Blaise, KOUDJOU Liza, YAKAM Brenda, TOMFEUN Sandrine, NGANGOUE Marcelle, AKUMA Micheal. Merci pour votre soutien, conseils dans les moments difficiles et pour l'esprit de solidarité qui règne au laboratoire.

A tous mes promotions pour les moments agréables inoubliables passés ensemble ;

A mes camarades de laboratoire TINKAM Serge., NOOH Jacques, NJIFACK Sylviane, NOUMI Obeige pour leurs assistances au laboratoire.

A ma tante et ma cousine KOUEKAM Jacqueline et TCHAKOUE Virginie pour leur soutien et conseils durant la réalisation de ce travail.

A mes frères et sœurs TCHAMBOUE Kévine, MBOUWE Arnold., KOUEKAM Belvin., KOUAMOU Junior, HSULEU Audrey, DJIEUGUET Christian, CHEZET Divine, PAGNI Duvalle, pour leur soutien moral et encouragement tout au long de la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1:</b> Distribution géographique des Rutaceae .....                                              | 3  |
| <b>Figure 2:</b> Répartition géographique du genre <i>Citrus</i> en Afrique .....                          | 6  |
| <b>Figure 3:</b> Répartition géographique du genre <i>Citrus</i> au Cameroun. ....                         | 8  |
| <b>Figure 4:</b> Arbres et écorces de <i>Citrus grandis</i> .....                                          | 9  |
| <b>Figure 5:</b> Spectre élargi proton de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE3..... | 40 |
| <b>Figure 6:</b> Spectre proton de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE3.....        | 41 |
| <b>Figure 7:</b> Spectre COSY du composé CGE3 .....                                                        | 42 |
| <b>Figure 8:</b> Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE3.....               | 43 |
| <b>Figure 9:</b> Spectre HSQC du composé CGE3 .....                                                        | 44 |
| <b>Figure 10:</b> Spectre HMBC du composé CGE3 .....                                                       | 45 |
| <b>Figure 11:</b> Quelques corrélations HMBC de CGE3.....                                                  | 45 |
| <b>Figure 12:</b> Spectre proton de RMN $^1\text{H}$ (600 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE1.....       | 48 |
| <b>Figure 13:</b> Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE1 .....             | 49 |
| <b>Figure 14:</b> Spectre HSQC du composé CGE1 .....                                                       | 49 |
| <b>Figure 15:</b> Spectre HMBC du composé CGE1 .....                                                       | 50 |
| <b>Figure 16:</b> Spectre proton de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) du composé CGE5 .....         | 53 |
| <b>Figure 17:</b> Spectre proton de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) du composé CGE5 .....      | 53 |
| <b>Figure 18:</b> Spectre HMBC du composé CGE5 .....                                                       | 54 |

## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1:</b> Quelques espèces du genre <i>Citrus</i> rencontrées au Cameroun.....                                | 7  |
| <b>Tableau 2:</b> Quelques alcaloïdes acridoniques isolés du genre <i>Citrus</i> . ....                               | 12 |
| <b>Tableau 3:</b> Quelques limonoïdes isolés du genre <i>Citrus</i> .....                                             | 16 |
| <b>Tableau 4:</b> Fréquences d'absorption IR des groupements fonctionnels fixés sur le squelette des limonoïdes ..... | 22 |
| <b>Tableau 5:</b> Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Citrus</i> .....                                            | 27 |

## LISTE DES SCHEMAS

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Schéma 1:</b> Biosynthèse des alcaloïdes de type acridone .....                                                      | 15 |
| <b>Schéma 2:</b> biosynthèse de limonoïdes .....                                                                        | 20 |
| <b>Schéma 3:</b> Biosynthèse des flavonoids.....                                                                        | 26 |
| <b>Schéma 4:</b> Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces du tronc de <i>Citrus grandis</i> ..... | 38 |

## LISTE DES ABBREVIATIONS

°c : Degré Celsius

<sup>13</sup>C : Carbone 13

<sup>1</sup>H : Proton

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**AMP** : Adénosine monophosphate

**ATP** : Adénosine triphosphate

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**cm** : Centimètre

**CoA**: Coenzyme A

**COSY**: Correlation Spectroscopy

**DCM**: Dichlorométhane

**DMAPP**: Diméthylallyl-pyrophosphate

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**d<sub>6</sub>**: Hexadétériorée

**d**: doublet

**dd**: doublet de doublet

**FAO** : Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture

**FPP**: Farnesyl diphosphate

**g**: Gramme

**Hex**: Hexane

**HMBC**: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HSQC**: Heteronuclear Single Quantum Correlation

**Hz**: Hertz

**IPP**: IsoPentényl Pyrophosphate

**IR** : Infra-Rouge

**J**: Constante de couplage

**Kg** : Kilogramme

**m** : multiplet

**mg** : milligramme

**MHz** : Méga-Hertz

**NI** : Nombre d'insaturation

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PPi** : Pyrophosphate

**q** : Quadruplet

**RMN <sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13

**RMN <sup>1</sup>H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

**s** : Singulet

**t** : Triplet

**UV** : Ultra-violet

**δ** : Déplacement chimique en ppm

## RESUME

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'isolement et la caractérisation des métabolites secondaires des écorces du tronc de *Citrus grandis*, une plante médicinale camerounaise de la famille des Rutaceae utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour le traitement de la teigne, du paludisme, des maladies de la peau. En effet, le matériel végétal a été récolté, découpé, séché, broyé puis macéré dans un mélange de solvant chlorure de méthylène-méthanol (1 :1) à température ambiante pendant 72 heures. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif et l'extrait brut (50,5 g) a été obtenu. Cet extrait a été soumis à diverses techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur colonne de gel de silice, la chromatographie sur couche mince pour conduire à l'isolement de dix composés purs dont six ont été entièrement caractérisés et regroupés comme suit

- Trois alcaloïdes : la baiyumine-A (CGE1), la 5-hydroxynoracridone (CGE3) et la citracridone I (CGE5);
- Deux stéroïdes : mélange de  $\beta$ -sitostérol et stigmastérol (CGE2) et le glucoside de stigmastérol (CGE9).

L'élucidation structurale a été réalisée grâce aux techniques d'analyses spectroscopiques 1D et 2D impliquant la RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, HSQC, HMBC et COSY. Ces structures ont été confirmées par comparaison avec les données spectrales rapportées dans la littérature.

**Mots clés :** *Citrus grandis*, Rutaceae et alcaloïdes.

## ABSTRACT

This Master dissertation focuses on the isolation and characterization of secondary metabolites from the trunk bark of *Citrus grandis*, a Cameroonian medicinal of the Rutaceae family used in the traditional folk medicine for the treatment of ringworm, malaria and skin diseases. To achieve our goal, the plant material was harvested, cut, dried, crushed and then macerated in a mixture of methylene chloride-methanol (1:1) at room temperature for 72 hours. The filtrate was evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator and the crude extract (50.5 g) was obtained. This extract was subjected to various chromatographic techniques, including silica gel column chromatography, thin layer chromatography that led to the isolation of ten pure compounds. Six of them were fully characterized as follows:

- Three alkaloids: baiyumine-A (CGE1), 5-hydroxyoracridone (CGE3), and citracridone I (CGE5);
- Two steroids: mixture of  $\beta$ -sistosterol/stigmasterol (CGE2) and stigmasterol glucoside (CGE9).

The structural elucidation was done by the means of 1D and 2D spectroscopic analysis techniques involving  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT 135, HSQC, HMBC and COSY. These structures were confirmed by comparison of their spectral data with those reported in the literature.

**Keywords:** *Citrus grandis*, Rutaceae and alkaloids



## INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION

Une infection fongique, encore appelée mycose, est une maladie causée par un champignon. Il existe des millions d'espèces de champignons vivant sur les plantes, sur les surfaces domestiques et même sur l'homme. En ce qui concerne l'homme, ces champignons peuvent causer des infections superficielles ou systémiques. S'agissant des maladies superficielles la plus répandue est la candidose vaginale chez les femmes avec environ 75% de cas enregistrés dans le monde et au Cameroun plus particulièrement 35,52 % au moins une fois au cours de leur vie (**Hubertine et al., 2020**). De nos jours, les maladies fongiques ont été classifiées comme étant des maladies tropicales négligées (**Rodrigues et al., 2019**) ce qui se justifie par une fréquence accrue d'infections causées par les champignons au cours des deux dernières décennies (**Marcio et al., 2005**). Généralement, nous utilisons comme traitement la nystatine, le fluconazole, le ketoconazole et bien d'autres. Malheureusement, nous observons quelques défaillances telles que l'augmentation des problèmes cliniques associés à plusieurs effets secondaires à l'instar de la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité, les troubles gastro-intestinaux, la toxicité oculaire (nécrose rétinienne, néovascularisation, nécrose rétinienne, œdème cornéen). A cet effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2014 recommande l'usage des médicaments de sources naturelles comme les plantes médicinales ce qui est corroboré par les travaux de **Newman et Cragg** en 2016 qui ont démontré que 50% des médicaments approuvés par la FDA étaient soit des produits naturels, soit directement découverts de source naturelle. D'où notre intérêt porté sur la plante médicinale Camerounaise *Citrus grandis* appartenant à la famille des Rutaceae déjà utilisée dans la région du Littoral pour le traitement des infections fongiques.

L'objectif général de notre travail est l'isolement, la caractérisation et l'évaluation de l'activité antifongique des métabolites secondaires de *Citrus grandis*. Plus spécifiquement nous envisageons de (d') :

- Isoler les constituants chimiques de l'extrait au chlorure de méthylène /méthanol 1 :1 des écorces du tronc de *Citrus grandis* ;
- Caractériser les composés purs isolés ;
- Evaluer l'activité antifongique des composés isolés.



## **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

## CHAPITRE I : REVUE DE LA littérature

### I. ETUDE BOTANIQUE

#### I.1. Généralités sur la famille des Rutaceae

La famille des Rutaceae est généralement composée des plantes ligneuses et doit son nom étymologique de *Ruta graveolens* en français « la Rue » qui est un arbre aromatique, épiné sur le tronc, sur les branches et parfois sur les racines foliaires qui a été cultivé pendant des siècles comme plante ayant des vertus médicinales (**Moauche et al., 2010**).

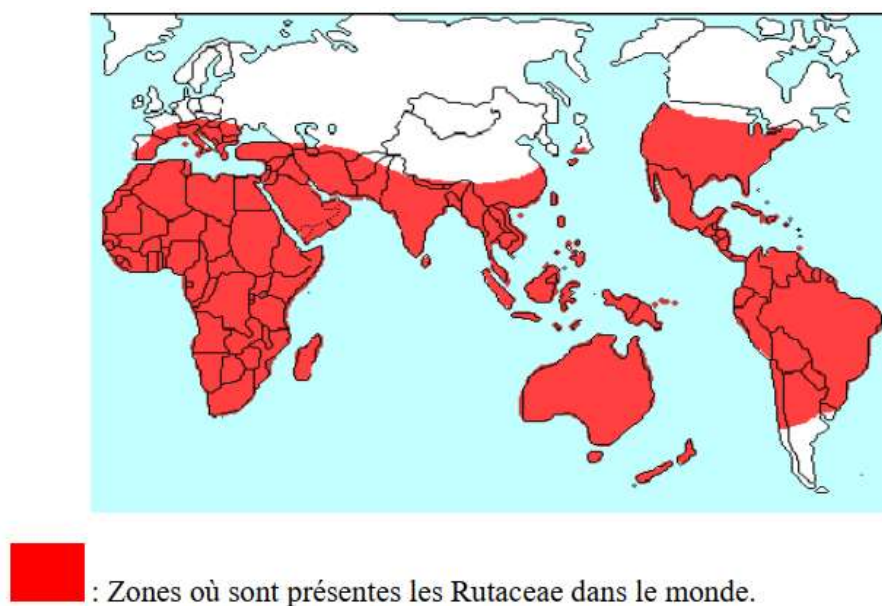
Les fruits de Rutaceae possèdent des baies, des drupes, des samares, des méricarpes, des capsules ou des follicules. Leurs feuilles sont généralement opposées, sans stipule. Les fleurs sont hermaphrodites, unisexuées. Elles possèdent un calice de 4 à 5 sépales libres ou soudés, et une capsule s'ouvrant par des fentes longitudinales et renfermant des graines dépourvues d'endosperme ou peu abondant (**Heywood, 1996**). La classification des Rutaceae a été clarifiée grâce aux données botaniques ainsi qu'à la connaissance de la biogenèse des métabolites secondaires. Sur la base des connaissances actuelles, les Rutaceae appartiennent au règne plantae, l'embranchement des Spermaphytes, sous-embranchement des Angiospermes, de la classe des Eudicotyledonae, la sous classe des Rosidae, de l'ordre des Sapindales, sous famille des Aurantiodeae et de la tribu de Rutene (**Heywood, 1996 et APG, 1998**).

Selon **Watson et Dallwitz**, elle comprend environ 900 espèces répartis en 150 (ou 160) genres parmi lesquelles : *Citrus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Micromelum*, *Murraya*, *Poncirus*, *Ruta*, *Tetraduim*, *Zanthoxylum* et bien d'autres. Selon la classification de **Cronquist** et la classification phylogénétique APG III, la pollinisation a lieu grâce aux fleurs présentes en inflorescences, grâce à des petites mouches ou des abeilles.

##### I.1.1. Répartition géographique

On rencontre les plantes de cette famille dans les régions tropicales et tempérées chaudes du globe et dans la majorité des cas en Afrique du Sud et en Australie. On les retrouve

dans les régions méditerranéennes de l'Indo-Malaisie et la région pacifique. La figure 1 montre la distribution géographique des Rutaceae dans le monde (Heywood, 1996).



**Figure 1:** Distribution géographique des Rutaceae (Heywood, 1996).

### I.1.2. Usages des Rutaceae

Les Rutaceae sont une famille de grande importance tant pour leur utilisation en industrie alimentaire mais également en parfumerie et en thérapie (Heywood, 1996). Les résines caractéristiques des Rutaceae sont inflammables, d'où l'utilisation du bois comme combustion (Judd et al., 2002). Parmi de nombreux espèces de Rutaceae, *Citrus aurantifolia* Christm et Panzer sont connus pour avoir des effets sur les réactions inflammatoires (Ladouni, 2010). Les feuilles d'*Afraegie paniculata* Schum et Thonn sont utilisées en externe comme agents antifilariens dans certaines localités Africaines (Adjangba et al., 2008). Les populations d'Afrique de l'Ouest, d'Afrique du Sud et du Kenya utilisent les tiges de *Clausena anisata* pour le traitement de la dysenterie, des maladies respiratoires et des maux de tête (Lewis et al., 1977). Le bois de *Fagara heitzii* est utilisé dans la fabrication de panneaux de contreplaqué pour la menuiserie (Letouzey, 1963).

## I.2. Généralités sur le genre *Citrus*

### I.2.1. Aspect botanique du genre *Citrus*

Les « *Citrus* » plus communément appelés agrumes sont des groupes de plantes appartenant à la famille des Rutacées, regroupant des arbres et arbustes, dont plusieurs espèces sont cultivées pour leurs fruits. Ils ont presque la même structure qui est la suivante: L'écorce, les racines, les pulpes sont des parties non comestibles. Les fruits, parties comestibles sont constituées de poils ou de vésicules contenant le jus (**Spiegel et al., 1996**). Originaire d'Asie tropicale et des philippines, les *Citrus* sont cultivés dans tout le pourtour méditerranéen et dans de nombreuses zones subtropicales. Le terme agrume désigne les seules espèces utilitaires du genre *Citrus* et de deux genres voisins : *Fortunelle* et *Poncirus*. Il s'applique aussi bien aux arbres qu'à leur fruit (**Pesson et Louveaux., 1984**).

Les agrumes se distinguent par leur feuillage brillant vert foncé, leurs fleurs abondantes et leurs fruits aux couleurs vives. Ils ont des feuilles ovales et vernissées, portées par de courts pétioles. Les agrumes ont presque tous des tiges épineuses et des branches (**Baudoux, 2008**). Parmi les espèces du genre *Citrus*, nous trouvons le citronnier, le lime, l'oranger amer, le mandarinier, le clémentinier, le pamplemoussier. Tous les fruits des *Citrus* cultivés ont presque la même structure. Ils sont composés essentiellement de deux parties morphologiques : le péricarpe et l'endocarpe (pulpe) (**Ollitrault et al., 2010**).

La partie externe constituée du péricarpe et du mésocarpe. Le péricarpe également appelé l'écorce, partie la plus externe de couleur orangée ou jaune, contient de nombreuses poches sécrétrices, riches en huile essentielle (**Chavanne, 2011; Faucon, 2015**). Un mésocarpe (ou albédo) de couleur blanche, de texture souvent cotonneuse ou spongieuse, de nature cellulosique, d'épaisseur variable, est la partie la plus intérieure du péricarpe (**Janati et al., 2012; Faucon, 2015**).

La partie interne, l'endocarpe constituée de la pulpe, est divisé en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et possède une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (**Janati et al., 2012; Faucon, 2015**).

Classification des agrumes faite selon (**Mabberly, 1997**) est la suivante :

|                            |                       |
|----------------------------|-----------------------|
| <b>Règne :</b>             | Plantae               |
| <b>Embranchement:</b>      | Spermaphyte           |
| <b>Sous embranchement:</b> | Angiospermes          |
| <b>Classe:</b>             | Eudicotes             |
| <b>Sous classe:</b>        | Archichlomydeae       |
| <b>Ordre:</b>              | Germinales (Rutales)  |
| <b>Famille:</b>            | Rutaceae              |
| <b>Sous famille:</b>       | Aurantoideae          |
| <b>Tribu:</b>              | Citreae               |
| <b>Sous tribu:</b>         | Citrineae             |
| <b>Genre:</b>              | <i>Citrus</i>         |
| <b>Espèce :</b>            | <i>Citrus grandis</i> |

**Praloran, (1971)** souligne que la classification systématique des agrumes et des genres voisins est un problème que les spécialistes s'accordent à qualifier de complexe. Des divergences se manifestent entre les opinions de **Swingle, Tanaka, Hume, Hodgson** et **Chapot**.

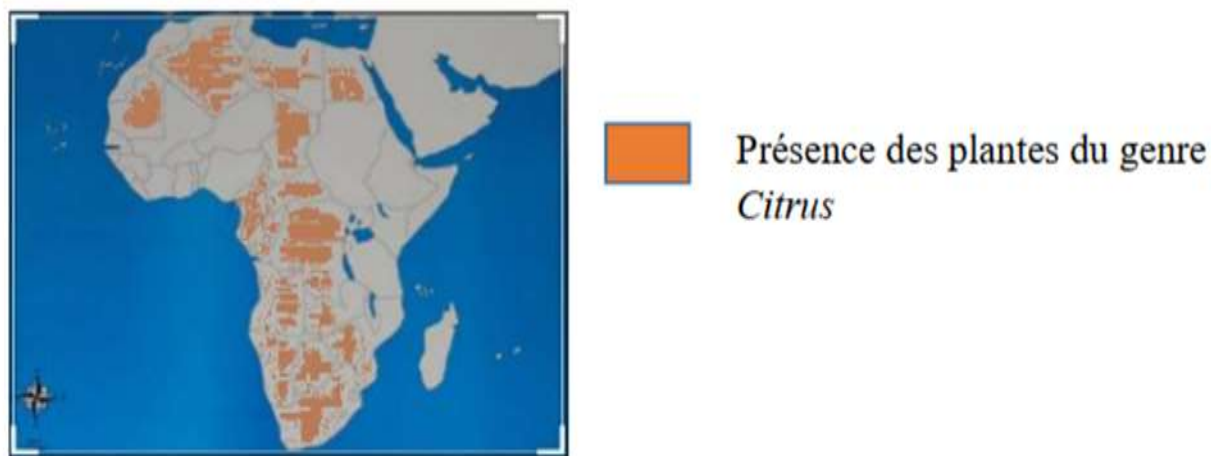
### **I.2.2. Quelques usages du genre *citrus***

Différentes variétés du genre *Citrus* sont commercialisées sur le marché comme le citron, l'orange, le pamplemousse et le pomelo qui sont des fruits très courants. Ils contiennent de nombreux composés naturels bénéfiques pour la santé (**jayaprakasha et al., 2008**). Les plantes d'agrumes sont une riche source de substances physiologiquement actives. Le péricarpe du fruit de *Citrus reticulata* blanco est l'un des phytomédicament traditionnel chinois les plus connus. Les agrumes sont utilisés pour traiter de nombreux symptômes de maladies humaines telles que la toux, l'inflammation cutanée, douleurs musculaires, troubles gastriques et infections parasitaires (**Li et al., 2009**). Les fruits du genre *Citrus*, tels que *Citrus media*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus sinensis* et *Citrus decumana*, constituent la majorité des apports en vitamines, minéraux et fibres de la population (**Economos et clay, 1998**). L'arbre est utilisé comme un élément de restauration des équilibres écologiques après déforestation (**Westphal et al., 1985**).

Les pomelos, mandarines, pamplemousses et les citrons peuvent être utilisés à des fins alimentaires en les pressant pour en extraire le jus et qui entre aussi dans la composition de sorbet, sirop, confiserie ou de l'alcool spiritueux. L'huile essentielle d'agrumes est utilisée principalement en parfumerie et en phytothérapie (Arbonnier, 2000).

### I.2.3. Répartition géographique du genre *Citrus* en Afrique

De nos jours, la culture des *Citrus* occupe une place importante en Afrique. On les rencontre dans les pays comme le Nigéria, Guinée Conakry, Tunisie, Sierra Léone, Kenya, Angola, Cote d'Ivoire, Tanzanie, Cameroun, Maroc et Algérie. La figure 2 nous montre cette répartition du genre *Citrus* en Afrique (Ndo, 2011).



**Figure 2:** Répartition géographique du genre *Citrus* en Afrique

### I.2.4. La répartition géographique du genre *Citrus* au Cameroun

En 2009, la production mondiale des agrumes a été de 124,4 millions de tonnes (Mt). Cette production est au 1<sup>er</sup> rang des productions fruitières devant la banane (95.6 Mt), la pomme (71,7 Mt), et le raisin (66,9 Mt). Cette production est composée à 60% d'oranges, à 22% de petits agrumes (clémentines et mandarines), à 12% de citrons et à 4% de pomelos. Le reste de la production correspond à des cultures marginales comme le cédrat et le kumquat. Plus de la moitié de la production mondiale est destinée à la consommation de fruits frais, le reste étant transformé (Source FAO). Les agrumes sont cultivés en majorité par les petits paysans au Cameroun. Ils représentent l'une des principales sources de diversification de

leurs revenus après la chute des prix du cacao et du café sur les marchés internationaux. A cet effet, on note de plus en plus un engouement des producteurs à planter des agrumes pour garantir l'étalement de leurs revenus tout au long de l'année (**Kuate et al., 2006**).

Au Cameroun, les agrumes peuvent se cultiver sur l'ensemble du pays. Les productions d'agrumes se font dans des niches écologiques bien circonscrites appelées « bassins de production ». Ces bassins sont dispersés à l'intérieur du pays. Leur localisation n'est pas faite avec précision dans la littérature. Toutefois, une étude de quantification des productions et des échanges des fruits et légumes au Cameroun réalisée par **Temple (1999, 2001)** donne certaines indications à partir des circuits de commercialisation.

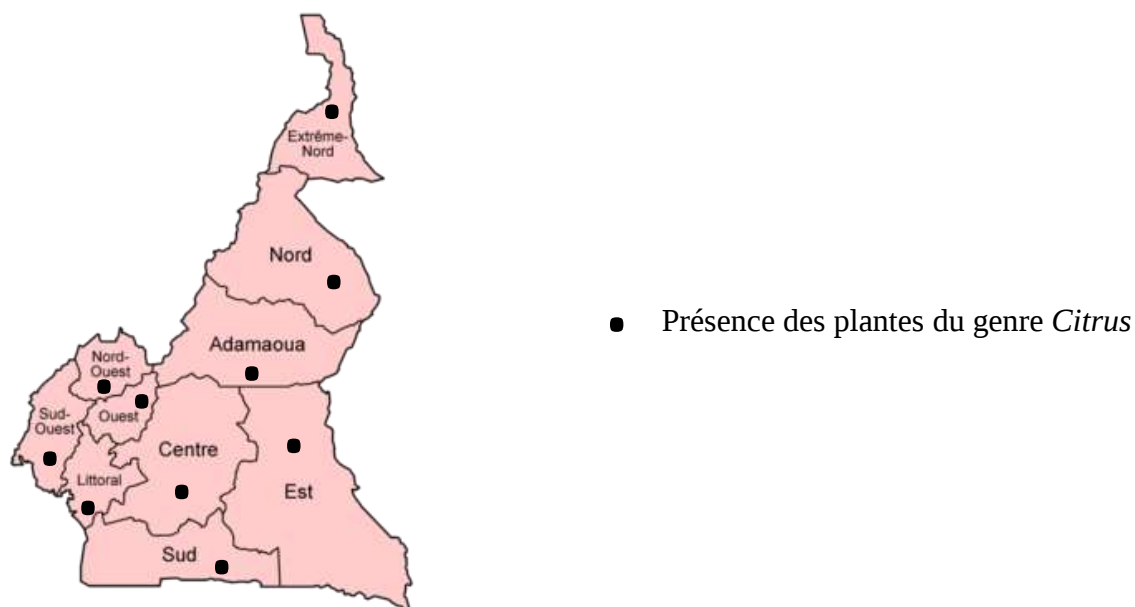
Une caractérisation des principaux bassins de production d'agrumes dans les zones humides du Cameroun (**Ndo, 2007**) a montré qu'au moins 4 des 5 principaux groupes d'agrumes étaient présents dans chacun des bassins. Les orangers étant l'espèce la plus abondante dans la majorité des bassins de production.

**Tableau 1:** Quelques espèces du genre *Citrus* rencontrées au Cameroun

| Espèces                    | Noms communs | Lieux géographiques                                                                                                                                                                                                                  | Auteur                      |
|----------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Citrus sinensis</i> (L) | L'orange     | Centre : Mbam<br>Littoral : Moungo (Njombé, Mbanga), Nkam (Yabassi)<br>Sud-Ouest : Mémé (Tombel)<br>Nord-Ouest : Manyu (Mamfé), Bui (Jakiri)<br>Ouest : Noun (Malentouen)<br>Grand Nord : Doumro, Ngaoundéré et Mbé<br>Est : Batouri | <b>(Kuate et al., 2006)</b> |
| <i>Citrus limon</i> (L)    | Citron       | Centre : Obala, Okola, Sa'a<br>Sud : Akom et Mvie<br>Littoral : Moungo, de la Sanaga Maritime<br>(Pouma) et du Nkam (Yabassi)<br>Sud-Ouest : Edinki, Barombi, Kumba et Bombé                                                         |                             |

|                                                          |              |                                                                                                                                                  |  |
|----------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <i>Citrus microcarpa</i><br>ou <i>Citrus mandurensis</i> | Mandarine    | Centre : Lékié (Obala, Sa'a) et du Mbam (Mbangassina, Ombessa)<br>Littoral : Moungo (Nlohé, Njombé, Mbanga, Dibombari), Sanaga Maritime (Pouma). |  |
| <i>Citrus grandis</i>                                    | Pamplemousse | Centre : dans de nombreux villages situés entre le département de la Lékié et celui du Mbam.                                                     |  |
|                                                          |              | Littoral : Moungo (Njombé, Mbanga, Loum), Nkam (Yabassi)                                                                                         |  |
| <i>Citrus decumana</i>                                   | Pamplemousse | Littoral : Moungo (Njombé, Mbanga, Loum), et Nkam (Yabassi) ;<br>Centre : Lekie et Mbam.                                                         |  |

La distribution géographique du genre *Citrus* au Cameroun est représentée par la figure 3 suivant :



**Figure 3:** Répartition géographique du genre *Citrus* au Cameroun (Ndo, 2011).

### I.3. Généralités sur *Citrus grandis*

Pamplemousse est le nom vernaculaire ambigu qui désigne en français deux types d'agrumes et provient de deux espèces différentes du genre *Citrus*, de la famille des Rutaceae : l'asiatique *Citrus maxima* ou *Citrus grandis* et l'hybride occidental *Citrus paradisi*. Appartenant à la catégorie des agrumes, c'est un arbre fruitier atteignant environ 10 à 12 m de hauteur avec des feuillages persistants, brillants et parfumés. Ayant des formes ovales-lancéolé, ondulé et à pétiole tendre portant à leur aisselle des épines molles et flexibles (**Jardin ! l'Encyclopédie**). La figure 4 nous présente l'arbre (tronc) et les écorces de *Citrus grandis*.



**Figure 4:** Arbres et écorces de *Citrus grandis*. (A : arbre ; B : écorces) (**Bouwe, 2020**).

#### I.3.1. Quelques usages des plantes du genre *Citrus*

##### I.3.1.1. Sur le plan thérapeutique

Les plantes du genre *Citrus* sont utilisées en médecine pour leur effet thérapeutique. De nombreuses études ont montré que les espèces du genre *Citrus* sont riches en principes actifs tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, utilisés à des fins thérapeutiques ou dans les domaines cosmétiques ou alimentaires (**Shohaib et al., 2011**). La consommation des fibres réduit le risque des maladies cardiovasculaires, du cancer du côlon et de l'obésité (**Chau et al., 2004**). L'huile essentielle de citron est employée comme désaltérant et possède des propriétés

antimicrobiennes, stimulantes, stomachiques, diurétiques (**Bardeau, 2009**). La saveur amère et aromatique de la pulpe d'orange amère ravive l'appétit et facilite la digestion.

- La pulpe d'orange fraîche est utilisée pour traiter les maladies de la peau: l'acné, soins de visage (**Valnet, 2001**) ;
- Le citron a été utilisé contre l'insomnie, l'asthme et dissoudre des cristaux rénaux (**Okwn et Emenik, 2006**) ;
- Le zeste partie superficielle du citron est utilisé pour la stimulation de l'appétit (**Santo et al., 2011; Karimi et al., 2012**).
- Les fruits d'orange sont utilisés pour leur activité anti-microbienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse (**Del-Caro et al., 2004**) ;
- Les pulpes des différents variétés de Citrus sont utilisées pour l'abaissement de la pression artérielle, traiter l'obésité (**Ramful et al., 2011**).

#### I.3.1.2. Sur le plan alimentaire

Dans la cuisine algérienne, les écorces fraîches ou sous forme de poudre de *Citrus sinensis* sont utilisées pour aromatiser le thé et pour la préparation de certains plats traditionnels ou gâteaux. Plusieurs études ont porté sur l'extraction des fibres des écorces d'agrumes utilisées dans la formulation des aliments diététiques (**Fernandez-Lopez et al., 2004**). La pectine commerciale est extraite dans la plupart des cas des agrumes (le pamplemousse, le citron et l'orange) et aussi des pommes (**Wang et al., 2014**). La pectine est utilisée en industrie agroalimentaire grâce à son pouvoir épaississant, texturant mais aussi pour son pouvoir gélifiant et stabilisant. La pectine est utilisée dans plusieurs formulations (produits laitiers, préparations à base de fruits, crèmes glacés, produits à base émulsionnée, confiture et gelées) (**Hawthorne et al., 2000**).

Grâce à leur pouvoir absorbant d'eau, les fibres consommées gonflent dans l'estomac et l'intestin et jouent le rôle de coupe-faim en procurant une sensation de satiété. Les fibres insolubles facilitent le transit intestinal, tandis que les fibres solubles favorisent la croissance de la flore intestinale et améliorent par la suite la digestion. Les fibres des écorces d'agrumes acquièrent ainsi toutes les vertus des probiotiques et ont des applications potentielles en alimentation fonctionnelle (**Chau et al., 2004**). En industrie alimentaires comme aromatisants, en aromathérapie, elles sont utilisées pour le traitement de l'insomnie, l'anxiété et aussi pour calmer les palpitations (**Bardeau, 2009**).

### **I.3.1.3. Sur le plan industriel**

Les extraits naturels des écorces sont également l'un des intrants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et autres produits cosmétiques. De plus, les écorces d'agrumes sont riches en limonène, qui est employé dans la formulation de solvants industriels mais aussi comme solvant biologique (Lohrasbi et al., 2019).

Le linalol et le citral extraits des écorces de pamplemousse et d'orange douce ont des effets antibactériens contre *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Le citral est un composé actif aussi contre le *Penicillium digitatum* et *Aspergillus niger*. Pour ces raisons, les huiles essentielles peuvent être utilisées comme une alternative aux fongicides synthétiques (Tian et al., 2001). Les huiles essentielles de *Citrus* sont utilisées pour la préparation des parfums, des savons, désodorisants, des bougies parfumées (Bardeau, 2009).

### **I.4.2. Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Citrus***

Les travaux chimiques antérieurs effectués sur les espèces du genre *Citrus* ont permis d'isoler un certain nombre de métabolites secondaires appartenant à plusieurs classes notamment :

- Les alcaloïdes
- Les limonoïdes
- Les flavonoïdes
- Les coumarines

#### **I.4.2.1. Alcaloïdes**

##### **I.4.2.1.1. Généralités sur les alcaloïdes**

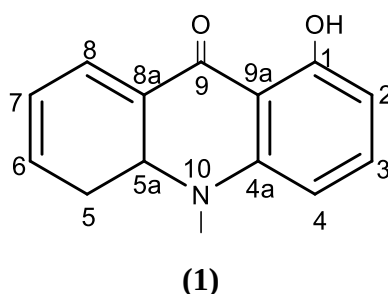
Les alcaloïdes sont des molécules organiques azotées naturelles qui sont le plus souvent pharmacologiquement actives. Les alcaloïdes sont des substances naturelles réagissant comme des bases et doués à faible dose des propriétés pharmacologiques importantes. Ils peuvent être classés suivant trois grandes classes parmi lesquels :

- Les alcaloïdes vrais, pour qui l'azote est inclus dans le système hétérocyclique et qui bio génétiquement dérive des acides aminés.
- Les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique.

- Les pseudo-alcaloïdes qui présentent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais à la seule différence qu'ils ne dérivent pas des acides aminés (**Badiaga, 2012**).

La biosynthèse des alcaloïdes se fait à partir des acides aminés et selon l'acide aminé, nous pouvons avoir plusieurs types d'alcaloïdes parmi lesquels les alcaloïdes acridones dont le précurseur est l'acide anthrannilique. Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leur activité pharmacologique qui s'exerce dans des domaines variés. Au niveau du système nerveux central, ce sont des dépresseurs (morphine) ou des stimulants (caféine). On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'anti-tumoraux (vinblastine), d'antipaludique (quinine) (**Bruneton, 1993**).

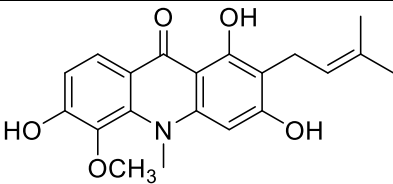
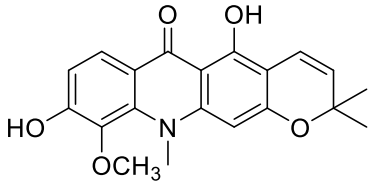
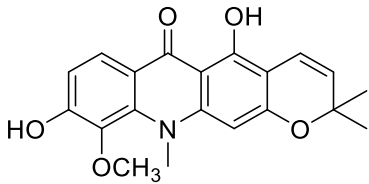
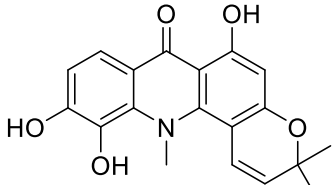
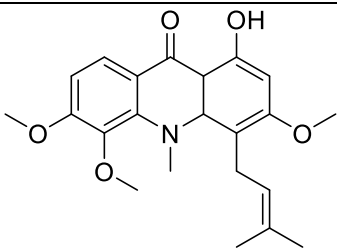
La plupart des alcaloïdes rencontrés jusqu'ici dans le genre *citrus* appartiennent à la classe des alcaloïdes acridones dont la structure de base est représentée comme suit :

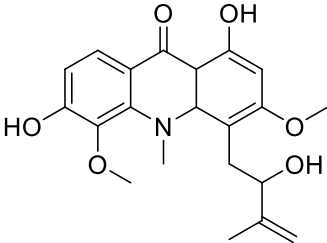
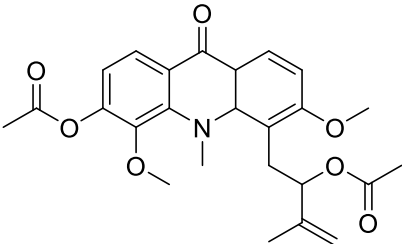


Le tableau 2 ci-dessous présente quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre *Citrus*

**Tableau 2:** Quelques alcaloïdes acridoniques isolés du genre *Citrus*.

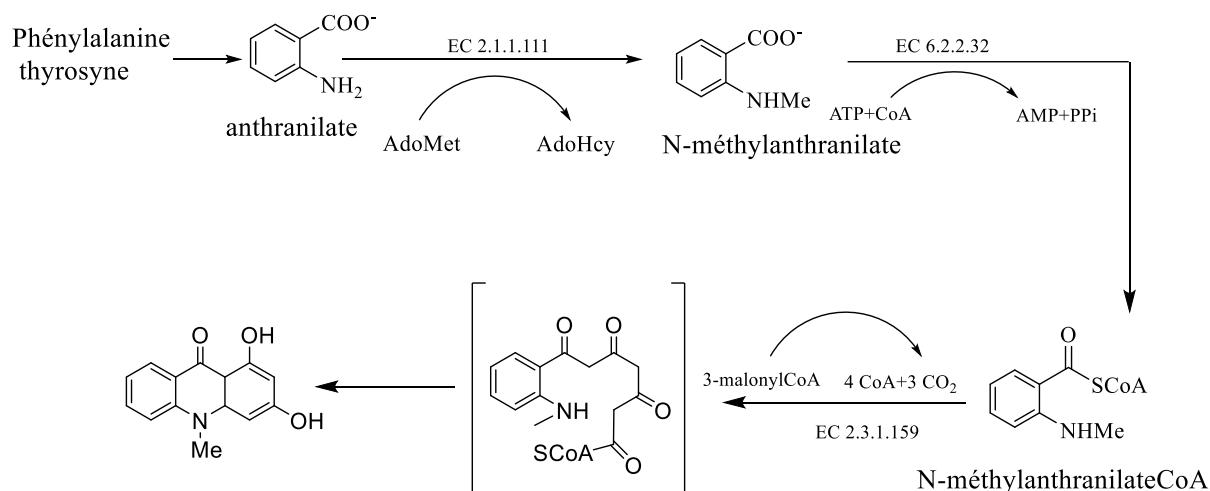
| Structures                                    | Noms                   | Sources                | Références                    |
|-----------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| <p style="text-align: center;"><b>(2)</b></p> | 2-méthoxycitpressine I | <i>Citrus sinensis</i> | ( <b>Bayet et al., 2007</b> ) |

|                                                                                                |                  |                        |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------|-------------------------|
|  <p>(3)</p>   | Buntanine        | <i>Citrus sinensis</i> | (Bayet et al., 2007)    |
|  <p>(4)</p>   | Honuymine        | <i>Citrus sinensis</i> | (Bayet et al., 2007)    |
|  <p>(5)</p>   | Grandisine-I     | <i>Citrus maxima</i>   | (Wen- Yuh et al., 2005) |
|  <p>(6)</p> | Citracridone-III | <i>Citrus maxima</i>   | (Wen- Yuh et al., 2005) |
|  <p>(7)</p> | Baiyumine-B      | <i>Citrus grandis</i>  | (Wu et al., 1986)       |

|                                                                                              |              |                       |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|-------------------|
|  <p>(8)</p> | Buntanmine-A | <i>Citrus grandis</i> | (Wu et al., 1986) |
|  <p>(9)</p> | Buntanmine-B | <i>Citrus grandis</i> | (Wu et al., 1987) |

#### I.4.2.1.2. Biosynthèse des alcaloïdes de type acridones

La biosynthèse des acridones a été réalisée pour la première fois par **Baczynski et Niementowski** en **1905** à partir du chorismate qui se transforme en phénylalanine tyrosine ensuite en anthranilate, puis subit l'action de l'anthranilate-*N*-méthyl transférase pour donner le *N*-méthylantranilate qui à son tour réagit avec l'anthranilate-CoA ligase pour donner le *N*-méthylantraniloylcoenzyme A (**Schéma 1**). Le *N*-méthylantraniloylcoenzyme A réagit avec 3 molécules du malonylcoenzyme A en présence de l'acridone synthase comme catalyseur pour donner le 1,3-dihydroxy-*N*-méthylacridone qui peut subir sous l'influence des différentes enzymes, plusieurs transformations pour donner : les acridones simples, les acridones *C*-prénylées, les furanoacridones, les pyranoacridones et les acridones dimères (**Bruneton, 1999**). Le schéma de biosynthèse est le suivant :



**Schéma 1:** Biosynthèse des alcaloïdes de type acridone

#### I.4.2.1.3. Quelques données spectrales des alcaloïdes de type acridone

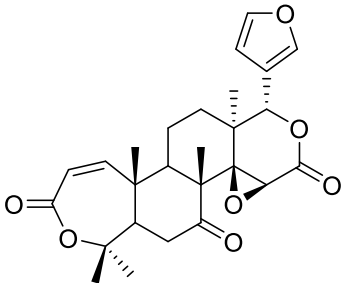
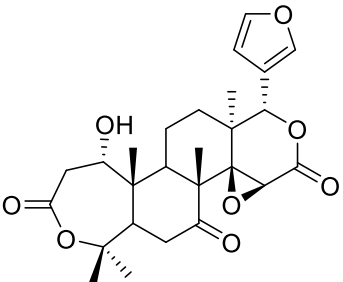
Le spectre de RMN <sup>13</sup>C d'un simple alcaloïde d'acridone avec n'importe quel substituant montre toujours treize résonances de carbones aromatiques dont un C-9 de carbonyle à environ 181 ppm. Selon la voie biosynthétique de l'acridone, les carbones C-1 et C-3 sont généralement substitués par l'oxygène O et apparaissent tous les deux autour de 164 ppm. Par conséquent, il y a deux protons méta-couplés apparaissant tous les deux à un déplacement chimique d'environ 6,15 ppm avec une constante de couplage  $J = 2,2$  Hz attribué à C-2 et C-4. Lorsque C2 ou C4 est substitué (par exemple pyranoacridone), le spectre de RMN <sup>1</sup>H affiche un singulet à environ 6,27 ppm. La caractérisation commune de presque tous les acridones est la présence d'un groupe hydroxyle sur C-1 dont l'hydrogène chélaté par le carbonyle 9 apparaît dans le spectre RMN <sup>1</sup>H (dans le chloroforme) à un déplacement chimique d'environ 14,0 ppm. De plus, le spectre RMN <sup>1</sup>H analysé dans le chloroforme montre le proton de l'amine à  $\delta_H$  8,40. Si l'azote est méthylé, alors les protons de l'unité CH<sub>3</sub>N- apparaissent à près de  $\delta_H$  3,60 avec le carbone correspondant à un déplacement chimique d'environ  $\delta_C$  40,0. Si le composé est 4-prénylé ou pyranoacridone, le déplacement chimique des carbones de -NCH<sub>3</sub> passe à environ  $\delta_C$  40,0. En cas de non-substitution de la molécule, le spectre RMN <sup>1</sup>H présente des signaux supplémentaires de quatre protons aromatiques d'un cycle benzénique substitué en ortho. L'un de ces protons apparaît vers  $\delta_H$  8,00 ppm. Ce déblindage est dû au fait que ce proton est situé dans le cône d'anisotropie du carbonyle et est donc attribué au H-8 de la molécule.

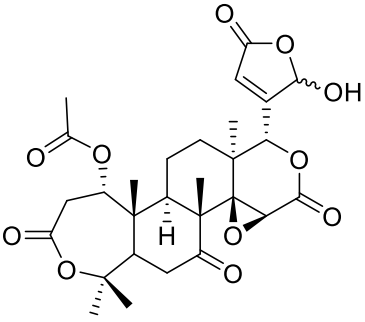
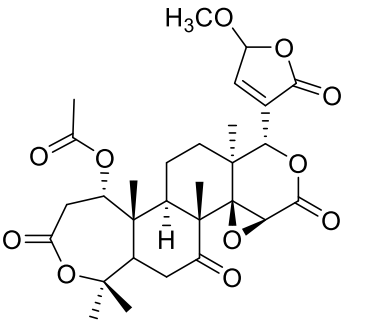
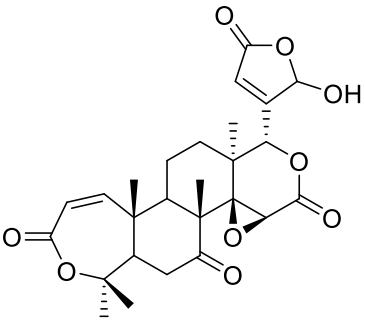
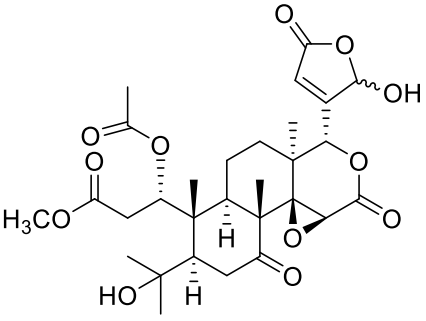
## I.4.2.2. Les limonoïdes

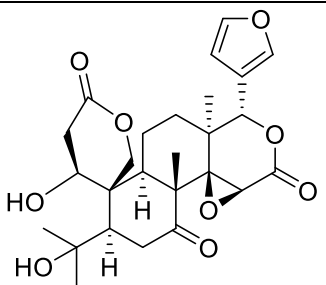
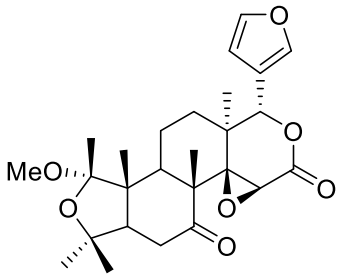
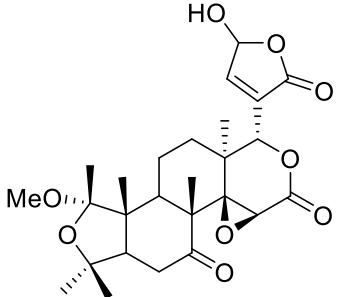
### I.4.2.2.1. Généralités sur les limonoïdes

La biosynthèse des limonoïdes a fait l'objet de plusieurs travaux, parmi lesquels ceux de Siddiqui et collaborateurs (Siddiqui et al., 1988), complétés plus tard par ceux de Champagne et collaborateurs (Champagne et al., 1992). Ils sont principalement retrouvés chez les Rutaceae et les Méliaceae (Ozaki et al., 1991). Les triterpènes sont les molécules à 30 carbones, dont les précurseurs sont deux héli terpènes, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP). Cet IPP et ce DMAPP vont s'associer, et par plusieurs réactions successives, pour former le squalène, une structure à 30 carbones qui, selon son mode de cyclisation, donnera naissance à de nombreuses molécules dont les limonoïdes (Bruneton, 2016). Le tableau ci-contre présente quelques limonoïdes isolés de genre *Citrus*.

**Tableau 3:** Quelques limonoïdes isolés du genre *Citrus*

| Structures                                                                                      | Noms             | Sources                  | Références            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------|-----------------------|
|  <p>(10)</p> | Obacunone        | <i>Citrus reticulata</i> | (Khalil et al., 2003) |
|  <p>(11)</p> | Diacetylnomiline | <i>Citrus reticulata</i> | (Khalil et al., 2003) |

|                                                                                                 |                                                                                 |                                 |                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
|  <p>(12)</p>   | <p>21,23-Dihydro-<br/>21-hydroxy-23-<br/>oxonomiline</p>                        | <p><i>Citrus reticulata</i></p> | <p>(Takashi et<br/><i>al.</i>,2017)</p>   |
|  <p>(13)</p>   | <p>21,23-Dihydro-<br/>23-methoxy-21-<br/>oxonomiline</p>                        | <p><i>Citrus reticulata</i></p> | <p>(Takashi et<br/><i>al.</i>,2017)</p>   |
|  <p>(14)</p> | <p>Sudachinoide C</p>                                                           | <p><i>Citrus sudachi</i></p>    | <p>(Takashi et<br/><i>al.</i>,2017)</p>   |
|  <p>(15)</p> | <p>21,23-dihydro-<br/>21-hydroxy-23-<br/>oxonomilinic<br/>acid methyl ester</p> | <p><i>Citrus reticulata</i></p> | <p>(Nakagawa et<br/><i>al.</i>, 2001)</p> |

|                                                                                                |                      |                          |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|
|  <p>(16)</p>  | Ichangine            | <i>Citrus reticulata</i> | (Takashi et al., 2017)  |
|  <p>(17)</p>  | 1-O-methylchangenine | <i>Citrus sudachi</i>    | (Nakagawa et al., 2001) |
|  <p>(18)</p> | Sudachinoïde A       | <i>Citrus sudachi</i>    | (Nakagawa et al., 2001) |

Les propriétés biologiques de certains limonoïdes examinés au cours de la dernière décennie, avait principalement pour axes de recherche l'étude de l'activité anticancéreuse. Comme les radicaux libres et/ou les espèces réactives de l'oxygène sont connus pour être associés à la tumorigène, l'activité cytotoxique est habituelle étudiée en même temps que leurs propriétés anti oxydantes. Par conséquent, les deux activités sont examinées ensemble tandis que d'autres effets, notamment les activités antimicrobiennes et insecticides sont présentées séparément (Yuny et al., 2020).

#### **I.4.2.2.2. Biosynthèse des limonoïdes**

Les variations structurelles des limonoïdes trouvés dans les rutacées sont moins nombreuses que les méliacées et sont généralement limitées. La plupart des propositions biogénétiques sont provisoires car elles ne sont pas soutenues par des études biosynthétiques valides. **Amit et coll.** ont illustré la biosynthèse des limonoïdes en montrant qu'ils sont synthétisés via la voie de biosynthèse des terpénoides, en commençant par la formation du squalène **(19)**, qui se traduit par un ion tétracyclique : euphane **(20)** et tirucallane **(21)** deux des composés chimiquement similaires peuvent être les précurseurs biogénétiques ultimes. La dégradation oxydative de la chaîne latérale C-17 de l'un ou l'autre côté de ces noyaux entraîne la perte de quatre atomes de carbones et formation du furane  $\beta$ -substitué, d'autres oxydations et réarrangements squelettiques dans un ou plusieurs des quatre cycles, qui sont désignés par A, B, C et D, donnent naissance à différents groupes de limonoïdes et chaque groupe se compose d'un certain nombre de limonoïdes possédant une variété d'activités biologiques dans leur squelette triterpénique.

L'acide diacétylnomilinique **(22)** est décrit comme le précurseur initial le plus probable de tous les limonoïdes connus des agrumes (Rutacées), qui lui-même peut être biosynthétisé à partir d'acétate, de mévalonate et/ou du pyrophosphate de furanesyle tel que le montre le **schéma 2** ci-dessous (**Heasley,2011**).

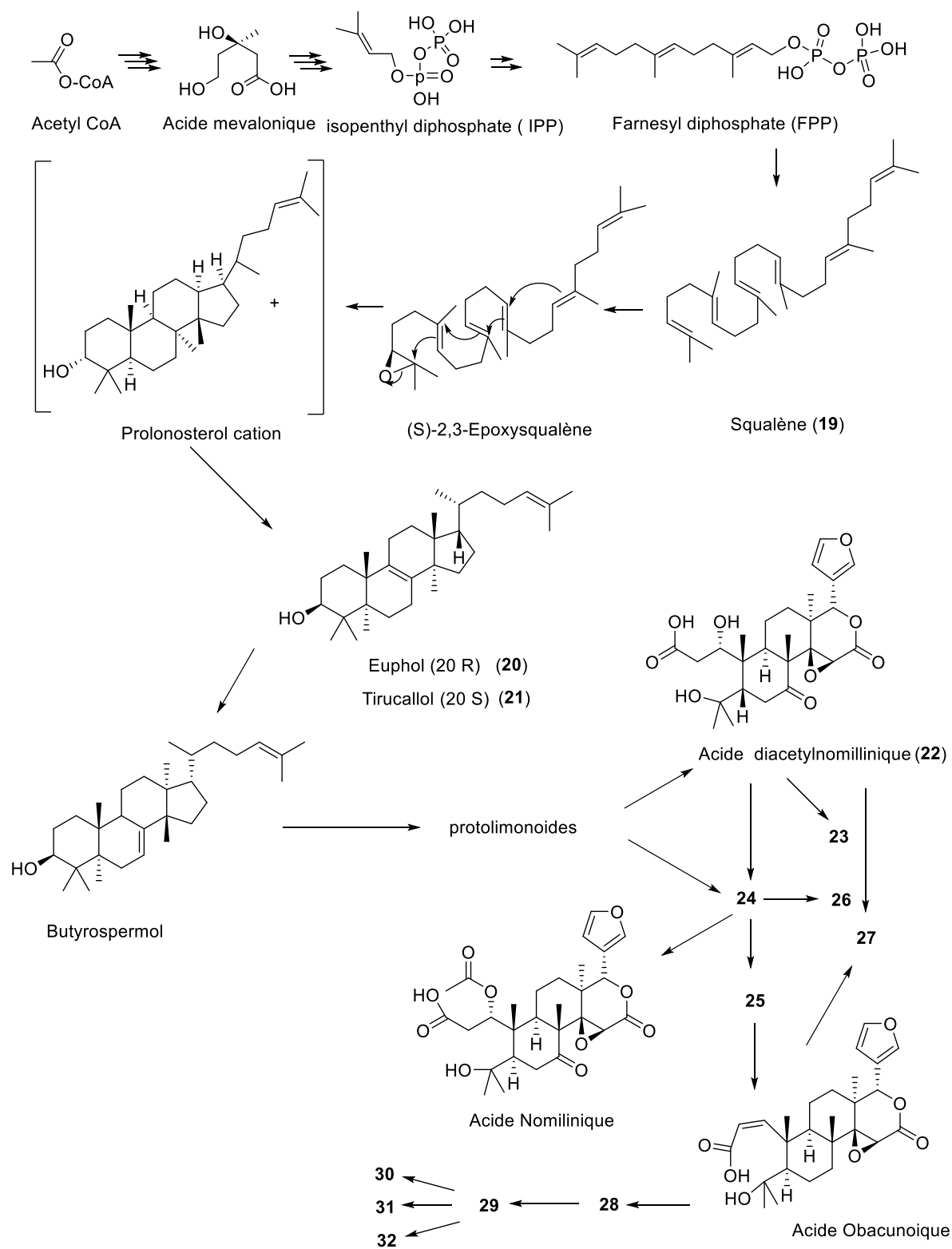
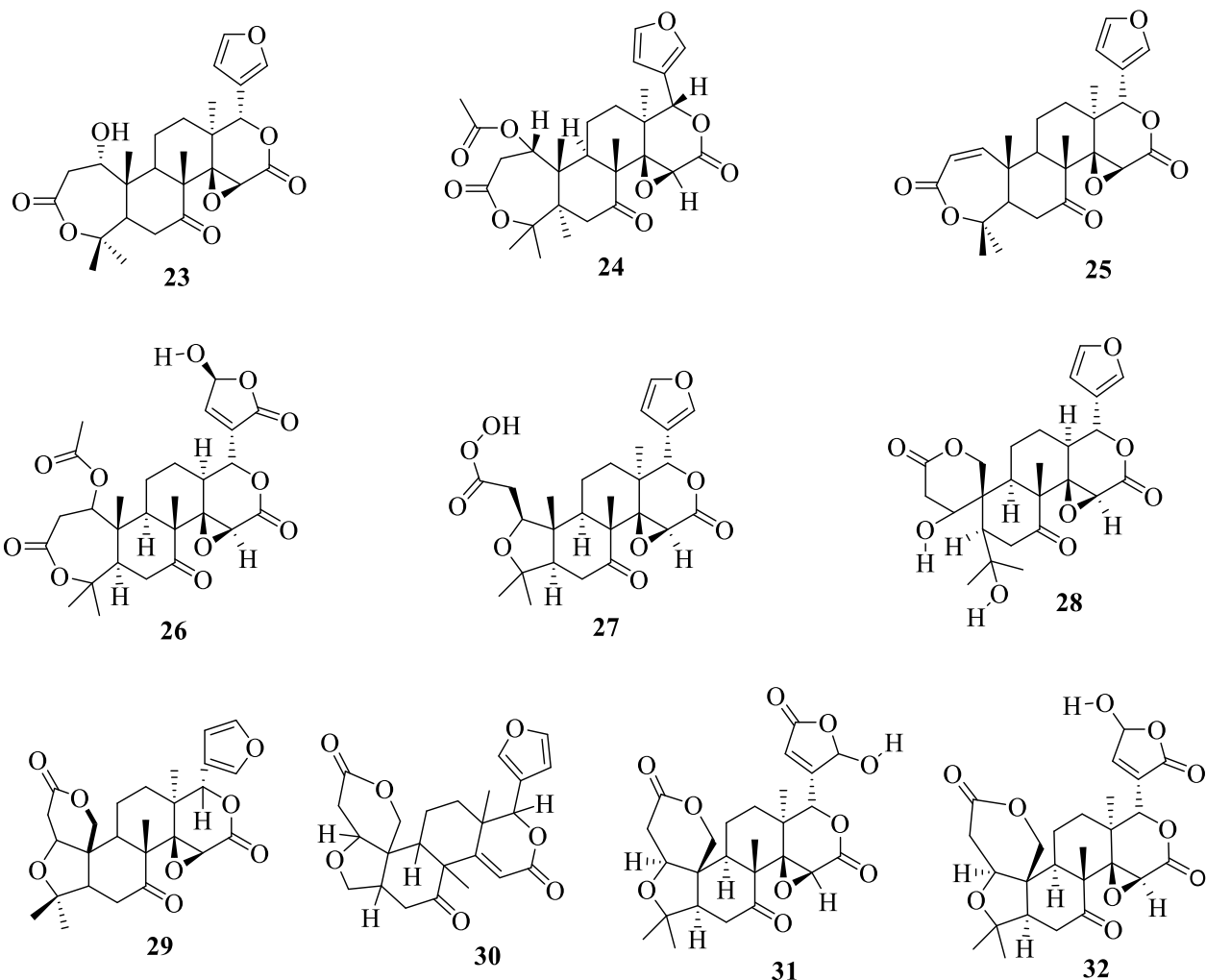


Schéma 2: biosynthèse de limonoïdes

(23) : Diacetylnomiline ; (24) : Nomiline ; (25) : Obacunone; (26) : Citrusine ; (27) : Acide Isoabacunoïque ; (28) : Ichangine ; (29) : Limonine ; (30): Dioxylmonine (31) : Acide Limonexique ; (32) : Acide Isolimonique).



#### I.4.2.2.3. Classification des limonoïdes

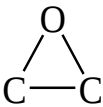
Taylor divise les limonoïdes isolés des plantes en protolimonoides dérivant de la leuphol et de l'apoeuphol avec leur chaîne latérale non cyclisée ou transformée en un autre cycle que le furane et en furanoides qui est subdivisés en deux sous classes : les méliacanes (tétranorterpénoides, avec le cycle D pentatonique non lactonisé et un cycle furane en position C-17) et les méliacolides caractérisés par le cycle D hexatonique lactonisé (Mulholland et al., 2000). L'ouverture d'un cycle A, B, C ou D donnera les limonoïdes de types A-séco, B-séco, C-séco ou D-séco.

#### I.4.2.2.4. Spectroscopie infrarouge des limonoïdes

Les limonoïdes sont des métabolites secondaires à structures complexes dont une grande majorité est fortement oxygénée dans lesquelles ces atomes d'oxygènes sont susceptibles d'être engagés dans divers types de liaisons : alcools, cétones, esters, énones et lactones. De ce fait, l'infra-rouge apparaît comme une méthode spectroscopique de poids susceptible d'apporter des informations d'ordre structural. C'est ainsi qu'on pourra à l'aide de l'IR, distinguer les protolimonoïdes des méliacolidés. En effet, les protolimonoïdes présentent deux bandes de vibration caractéristiques autour de 3400 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  attribuables respectivement aux vibrations des hydroxyles et des liaisons C-O des éthers. Les méliacolidés quant à eux, présentent une bande de vibration entre 1760 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations des carbonyles de lactone (Mulholland et al., 1980 ; Connolly et al., 1979).

Les fréquences caractéristiques d'absorption généralement observées sont consignées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4:** Fréquences d'absorption IR des groupements fonctionnels fixés sur le squelette des limonoïdes

| Groupements Fonctionnels | Liaisons                                                                            | $\nu_{\text{max}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Intensités                    |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| Furanne                  | C-O                                                                                 | 880-870                                 | Fine et forte                 |
|                          | Csp <sup>2</sup> -H                                                                 | 3150-3100                               | Moyenne                       |
|                          | C=C                                                                                 | 1650-1600                               | Fine et faible                |
| Epoxyde                  |  | 1300-1280                               | Fine                          |
| Hydroxyle                | O-H                                                                                 | 3600-3200                               | Variable                      |
| Enone                    | C=O                                                                                 | 1700-1660                               | Fine et forte                 |
|                          | C=C                                                                                 | 1600-1550                               | Fine et faible                |
| Gem-diméthyle            | C-C                                                                                 | 1380-1360                               | Deux bandes fines et moyennes |
| Ester                    | C-O                                                                                 | 1300-1280                               | Large                         |

|                   |     |           |                |
|-------------------|-----|-----------|----------------|
|                   | C=O | 1770-1710 | Fine et forte  |
| Méthyle-méthylène | C-H | 3000-2750 | Large et forte |

#### I.4.2.2.5. Spectrométrie de masse

En dehors du pic de l'ion moléculaire et de l'analyse à haute résolution de cet ion qui permet d'accéder à la formule brute, l'utilisation de la spectrométrie de masse pour la détermination des structures des limonoïdes n'a pas fait l'objet de développement particulier. En effet, contrairement aux autres classes de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes et les triterpènes pour lesquels les modes de fragmentation en impact électronique ont été largement étudiés, on ne dispose que de très peu d'informations concernant les limonoïdes.

#### I.4.2.2.6. Spectroscopies de RMN $^1\text{H}$

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  des limonoïdes sont très caractéristiques à cause de leur distribution régulière des pics entre 0 et 9,00 ppm. Cependant, certaines classes des limonoïdes peuvent être facilement détectées sur leurs spectres de RMN  $^1\text{H}$ . En effet, les méliacanes ont leurs spectres de RMN  $^1\text{H}$  similaires à ceux des triterpènes. Ils portent généralement cinq méthyles angulaires. Le proton H-17 apparaît comme un multiplet entre  $\delta_{\text{H}}$  3,30 et  $\delta_{\text{H}}$  3,50 et le proton H-14 comme un singulet entre  $\delta_{\text{H}}$  2,50 et  $\delta_{\text{H}}$  3,00. Les protons du noyau furane résonnent entre  $\delta_{\text{H}}$  6,50 et  $\delta_{\text{H}}$  8,50. La différence entre le spectre de RMN  $^1\text{H}$  des méliacolidés et celui de des méliacanes est la présence de large singulet entre  $\delta_{\text{H}}$  5,50 et  $\delta_{\text{H}}$  6,00 attribuable au proton H-17 proton des méliacolidés (Ngnokam et al., 1995). Les méthyle cyclo-1,29 des méliacolidés appartenant au groupe phragmalin sont facilement identifiés par le signal du carbométhyle qui apparaît entre  $\delta_{\text{H}}$  3,50 et  $\delta_{\text{H}}$  4,00 et le méthyle de l'orthoester autour de  $\delta_{\text{H}}$  1,80 (Ngnokam et al., 1995).

#### I.4.2.2.7. Spectroscopie de RMN $^{13}\text{C}$

La spectroscopie de RMN  $^{13}\text{C}$  donne les informations supplémentaires à celles obtenues du spectre de RMN  $^1\text{H}$ . La spectroscopie de RMN  $^{13}\text{C}$  peut être utilisée pour différencier certains groupes de limonoïdes. En effet, dans les spectres des phragmalins, le signal du méthylène C-29 résonne entre  $\delta_{\text{C}}$  38 et  $\delta_{\text{C}}$  41, celui du carbométhoxyle entre  $\delta_{\text{C}}$  51 et  $\delta_{\text{C}}$  53 et le signal de l'orthoester entre  $\delta_{\text{C}}$  119 et  $\delta_{\text{C}}$  120. Les pics caractéristiques du cycle furanique peuvent être identifiés sur le

spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  par les signaux autour de  $\delta_{\text{C}}$  110, 120, 140 ppm ; lesquels correspondent aux carbones C-22, C-20 et (C-21, C-23) (Connolly et al., 1979; Mulholland et Taylor, 1980).

#### I.4.2.2.8. RMN 2D

La RMN à deux dimensions est essentielle dans l'élucidation des structures des limonoïdes. Les analyses combinées entre les spectres HMBC et COSY rendent possible la construction des sous-structures avec le squelette carboné de base des substructures et permettent aussi de localiser les substituants. La stéréochimie relative peut être établie à partir des informations obtenues du spectre NOESY.

#### I.4.2.3. Les flavonoïdes

##### I.4.2.3.1. Généralités sur les flavonoides

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments poly phénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune, orange ou en blanc. Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, renforcent les parois des capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins (Ghedira, 2005). On peut classer les flavonoïdes en différents groupes, ce sont des dérivés poly hydroxylés, parfois méthylés ou méthoxylés, de la chromone. On distingue:

- **Les flavones vraies** : ce sont des dérivés de la phenyl-2-chromone ;
- **Les flavonols** : ils disposent un OH alcoolique en position 3. Ce sont les flavonoïdes les plus répandus chez les végétaux.
- **Les flavanones** : ils sont souvent méthoxylés et on les rencontre dans les *Rutaceae*.

On note la présence d'un carbone chiral dans la structure des flavanones, ce qui entraîne l'existence de deux isomères optiques pour chaque composé.

- **Les isoflavones** : ce sont des dérivés de la phényl-3-chromone, isomère des flavones.
- **Les anthocyanes** : Les anthocyanes sont des molécules qui font partie de la famille des flavonoïdes et sont capables d'absorber la lumière visible. Ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, rose ou orange. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques.

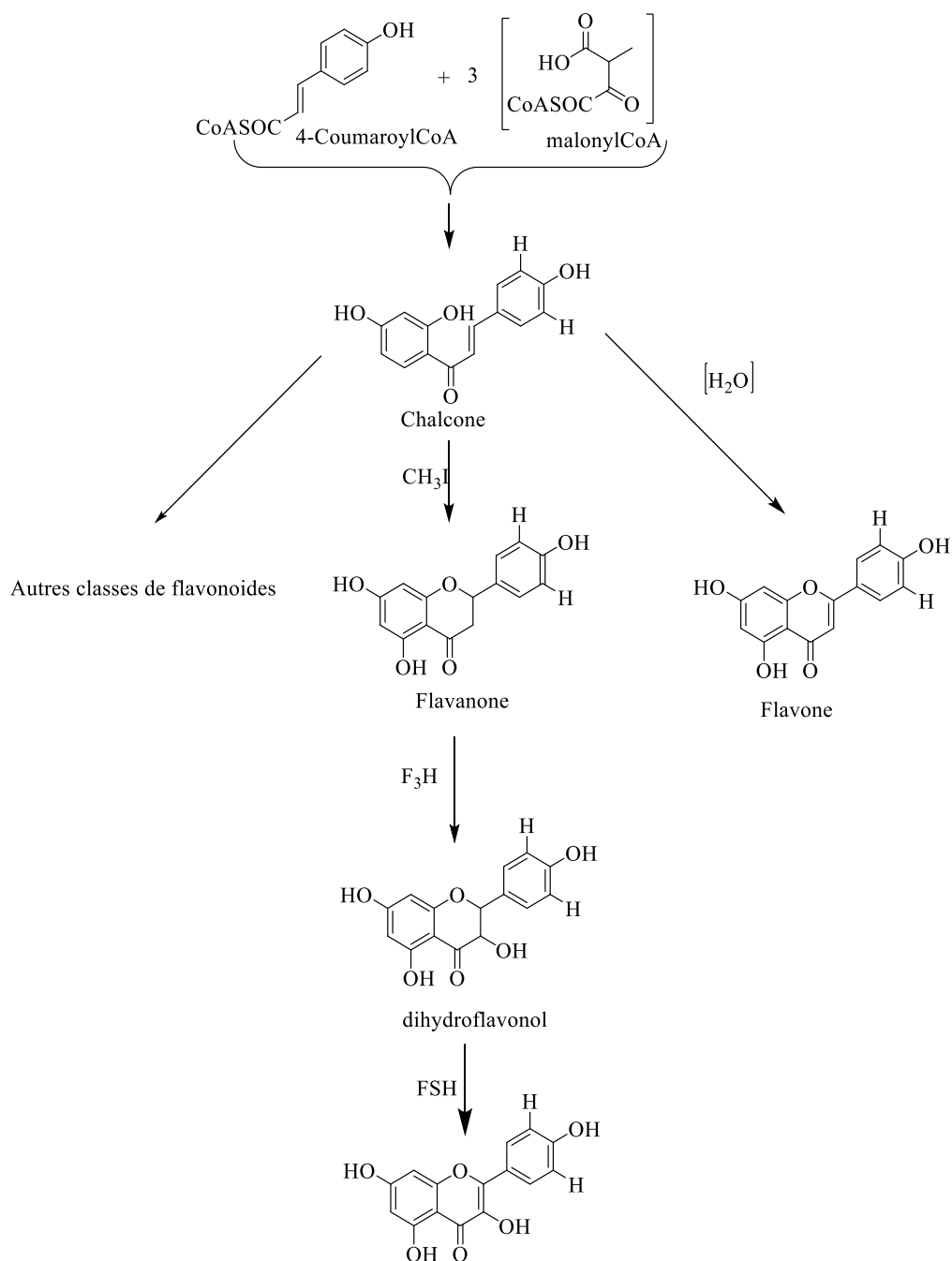
Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines (**Havsteen, 2002 ; Wichtl et al., 2003**).

Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres, ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux.

#### **I.4.2.3.2. Biosynthèse des flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent un grand groupe de composés naturels importants non seulement par le nombre de molécules concernées et par leurs propriétés physiologiques, mais également par leur origine biosynthétique mixte c'est-à-dire à la fois schikimique et acétate polymalonique (**schijlen et al., 2004**). L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalcone synthase de trois molécules de malonyl CoA, précurseur du noyau A et d'un acide hydro cinnamique, en générale le para-coumaryle SCoA, précurseur du noyau B et de la chaîne en C-3. Le produit de la réaction est la chalcone, précurseur de toutes les autres classes de flavonoïdes.

Cette biosynthèse implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, les méthylations, les cyclisations, les oxydations, les réductions, etc... **Le schéma 3** présente la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes (**schijlen et al., 2004**). Les flavonoïdes constituent un groupe chimique relativement homogène. Ils ont une structure de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> à poids moléculaire faible, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs des plantes à côté des chlorophylles et caroténoïdes.

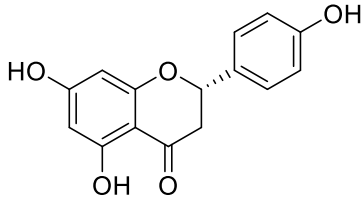
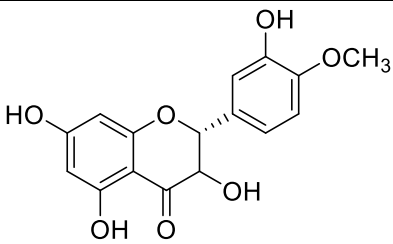
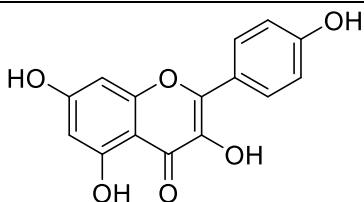
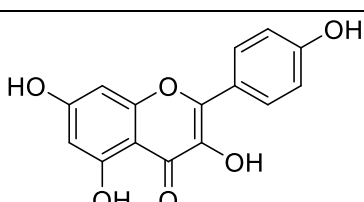


**Schéma 3:** Biosynthèse des flavonoids (CI = Chalcone isomérase; F<sub>3</sub>H = flavanone 3-hydroxylase; FLS = flavonol synthase).

#### I.4.2.3.1. Quelques flavonoïdes isolés de *Citrus grandis*

Le tableau ci-contre présente quelques flavonoïdes isolés du genre *Citrus*.

**Tableau 5:** Quelques flavonoïdes isolés du genre *Citrus* (Xi et al., 2014).

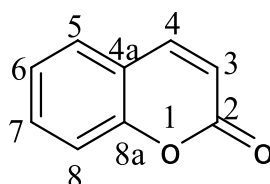
| Structures                                                                                      | Noms        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|  <p>(33)</p>   | Naringinine |
|  <p>(34)</p>   | Hespérétine |
|  <p>(35)</p> | Kaempférol  |
|  <p>(36)</p> | Quercétine  |

Les flavonoïdes isolés du genre *Citrus* présentent des propriétés anticancinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, diurétiques et antioxydantes (Babar, 2007).

#### I.4.2.4. Les Coumarines

##### I.4.2.4.1. Généralités sur les coumarines

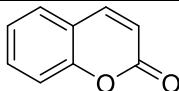
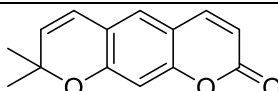
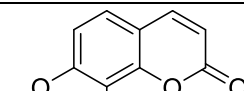
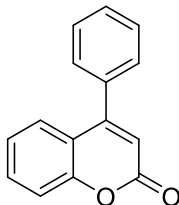
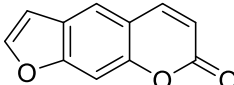
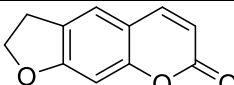
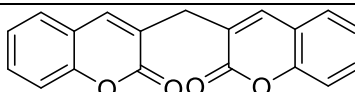
Les coumarines ont pris leur nom de classe en 'Coumarou, le nom vernaculaire de la fève tonka Oryx (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae), à partir de laquelle la coumarine a été isolée en 1820 (**Bruneton,1999**). Les composés coumariniques sont une classe de lactones structurellement construites par un cycle benzénique fixé à un cycle  $\alpha$ -pyrone (benzopyrone) et possèdent essentiellement un système conjugué avec un électron riche et une bonne charge propriétés de transport (**Murray, 1997 : Murray et al., 1982**).



(37)

Plus de 1300 coumarines ont été identifiées comme métabolites secondaires de plantes, bactéries et champignons (**Iranshahi et al., 2009**). Les coumarines sont répandues dans une large gamme de plantes en particulier celles appartenant aux Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, Guttiferae, Caprifoliaceae, Oléacées, Nyctaginacées. Apiacées, Loganiacées, Solanacées, Astéracées et Hippocastanacées. Dans le cas de types structuraux bien diversifiés chez les Apiacées et les Rutacées, les coumarines sont considérées comme des marqueurs chimiotaxonomiques (**Matos et al., 2015**). Il existe deux classes principales de composés coumariniques naturels : Coumarines simples et complexes classées sur la base de la structure chimique. Les coumarines complexes sont subdivisées en cinq classes. Les coumarines simples sont les dérivés hydroxylés, alcoxylés et alkylés du composé parent, la coumarine, ainsi que leurs glycosides. Les furanocoumarines consistent en un cycle furane à cinq chaînons attaché au noyau de la coumarine, divisé en types linéaires ou angulaires avec substitution à l'une ou aux deux positions benzoïques restantes (**Jain et al., 2012**). Les membres pyranocoumarines sont analogues aux furanocoumarines mais contiennent un cycle à six chaînons. Les coumarines substituées dans le cycle pyrone comprennent la 4-hydroxycoumarine (**Keating et O'kenedy. 1997**).

**Tableau 6 :** Différentes classes de coumarine

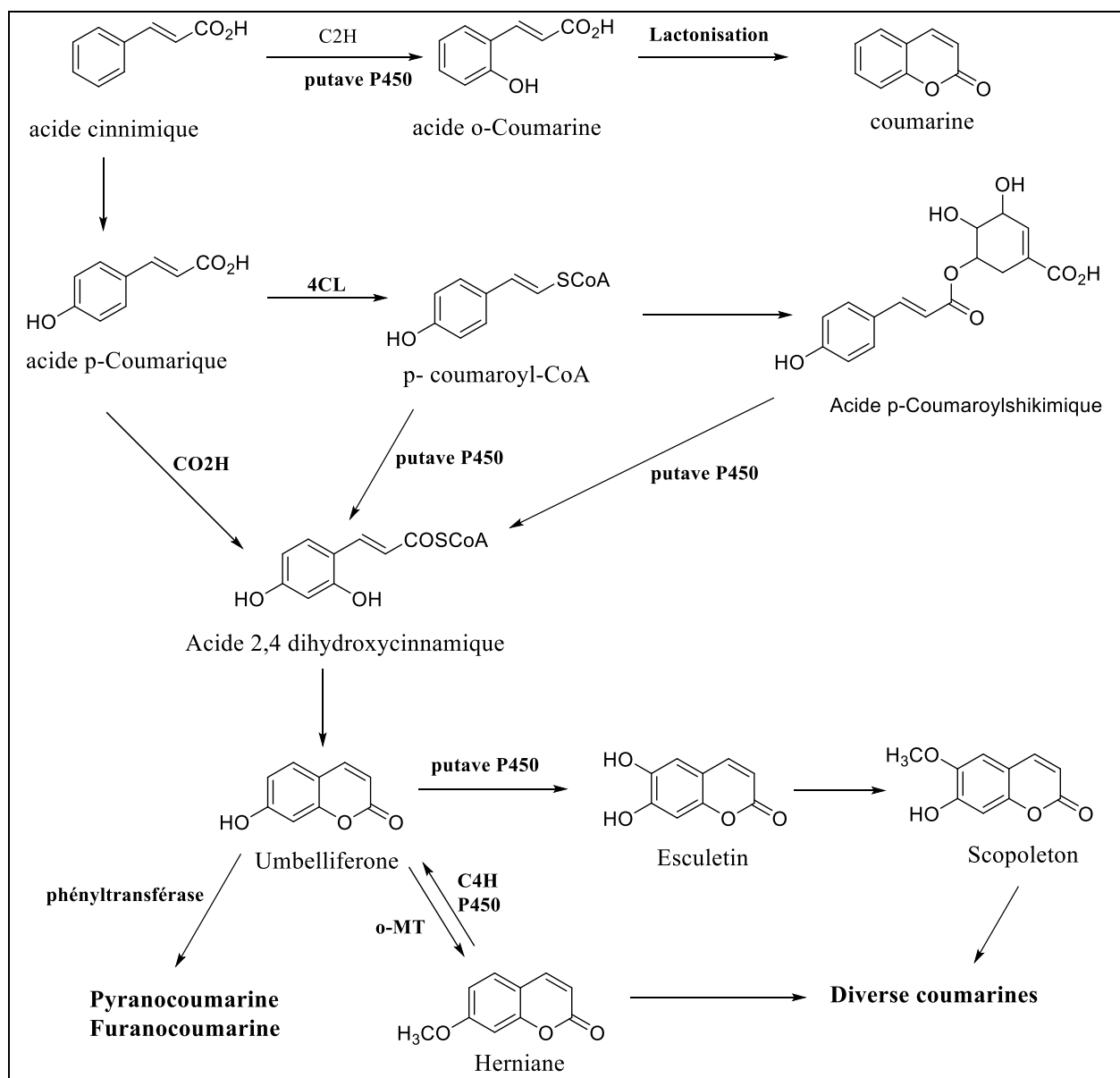
| Classes de coumarines | Sous types         |           | Structure générale                                                                            |                                                                                             |
|-----------------------|--------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Coumarines simples    |                    |           | <br>(38)   |                                                                                             |
| Coumarine complexes   | Pyrano coumarines  |           |                                                                                               |                                                                                             |
|                       | Linéaire           | Angulaire | <br>(39)    | <br>(40) |
|                       | Phenyl coumarines  |           | <br>(41)  |                                                                                             |
|                       | Furano coumarines  |           | <br>(42) |                                                                                             |
|                       | Dihydro coumarines |           | <br>(43) |                                                                                             |
|                       | Bicoumarines       |           | <br>(44)  |                                                                                             |

#### I.4.2.4.2. Biosynthèse des coumarines

De manière générale, les coumarines sont synthétisées dans les feuilles et s'accumulent dans plusieurs cas dans les racines et les fruits. La structure de la coumarine est dérivée de l'acide

cinnamique par ortho-hydroxylation, isomérisation *trans-cis* de la double liaison de la chaîne latérale et lactonisation. La forme Trans est stable et ne peut pas se cycliser ; par conséquent, il devrait y avoir une sorte d'isomérisation l'impliquant différentes enzymes (**Jain et al., 2012**). Les coumarines simples sont biosynthétisées à partir de la voie des phénylpropanoïdes via l'ortho-hydroxylation du cinnamate, du *p*-coumarate, du caféate et du férulate. La spécificité du processus est l'hydroxylation C-2, produisant une cassure ( $\beta$ -oxydation) de la chaîne latérale ou une isomérisation de la chaîne et une lactonisation ultérieure, générant l'umbelliféron ou la coumarine (**Matos et al., 2015**).

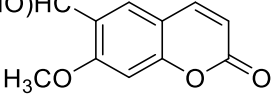
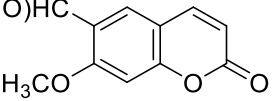
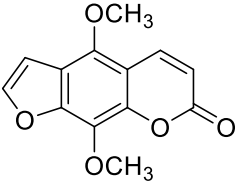
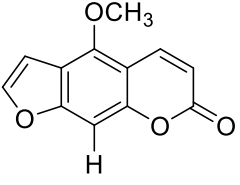
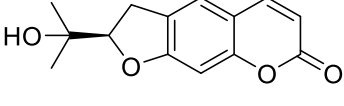
Umbelliféron ainsi que la coumarine sont des composés parents de certaines coumarines complexes comme les furanocoumarines. Ainsi, la biosynthèse de ces coumarines pourrait provenir de la cyclisation d'une simple coumarine préalablement prénylée (**Bruneton, 1993**). De plus, les pyrano et furanocoumarines (schéma 4) sont également biogénétiquement dérivés de l'acide shikimique. Ces coumarines pourraient être divisées en deux groupes linéaires et angulaires en fonction de la position où le pyrophosphate d'isopentényle est condensé pour se cycliser davantage et former l'hétérocycle (**Matos et al., 2015**).



**Schéma 4** : Biosynthèse des coumarines via la voie des phénylpropanoïdes (Bourgaud et al.,2006)

#### I.4.2.4.3. Quelques coumarines isolées de *Citrus*

**Tableau 7:** Quelques coumarines isolées du genre *Citrus*

| Structures                                                                                                                                                                           | Noms                   | Sources                  | Références                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| $\text{H}_3\text{COCH}_2\text{C}(\text{HO})\text{HC}$ - <br><b>(45)</b>                             | Buntansine B           | <i>Citrus grandis</i>    | (Tian-Shung et al., 1994) |
| $\text{HO}(\text{H}_3\text{C})_2\text{C}(\text{HO})\text{HC}(\text{HO})\text{HC}$ - <br><b>(46)</b> | Buntansine C           |                          |                           |
| <br><b>(47)</b>                                                                                    | 5,8-dimethoxypsoralène | <i>Citrus sinensis</i>   | (Bayet et al. en 2007)    |
| <br><b>(48)</b>                                                                                   | la Bergaptène          |                          |                           |
| <br><b>(49)</b>                                                                                   | la Marmésine           | <i>Citrus reticulata</i> | (Chan et al. en 2010)     |

#### I.4.2.5. Les Huiles essentielles

##### I.4.2.5.1. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent.

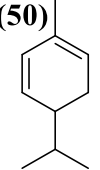
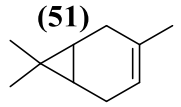
Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie qui est l'aromathérapie (**Benayad, 2008**).

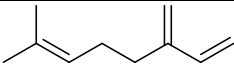
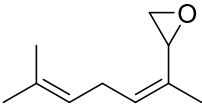
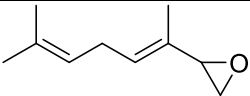
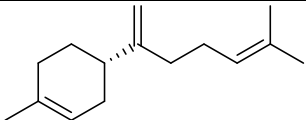
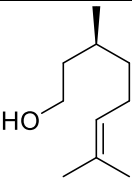
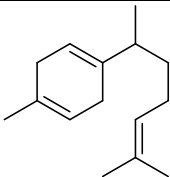
Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants appartenant de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiquement distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. Dans le cas des huiles essentielles, seuls sont rencontrés les terpènes les plus volatils c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono et sesquiterpènes (**Bruneton, 1993**).

Les HE doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) des lipides et, à l'inverse des glycérides, dans l'alcool (**Benayad, 2008**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organe fleur (origan), feuillés (citronnelle), écorce (cannelier), bois (bios de rose), rhizomes (acore), fruits (badiane), ou grain carvi (**Boudjemaa et al., 2010**).

**Tableau 8 :** Quelques huiles essentielles isolées du genre *Citrus*

| Structures                                                                                  | Noms                  | Sources                  | Références           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|
| (50)<br> | $\alpha$ -phelladrène | <i>Citrus microcarpa</i> | (Hosni et al., 2010) |
| (51)<br> | $\delta$ -3-Carène    | <i>Citrus sinensis</i>   |                      |

|                                                                                                    |                        |                          |                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <br><b>(52)</b>   | $\beta$ -myrcène       | <i>Citrus microcarpa</i> | (Jabalpurwala et al.,2009) |
| <br><b>(53)</b>   | (Z)-Ocimène            | <i>Citrus sinensis</i>   | (Jabalpurwala et al.,2009) |
| <br><b>(54)</b>   | (E)-Ocimène            |                          |                            |
| <br><b>(55)</b>   | (E)-Ocimène            | <i>Citrus microcarpa</i> | (Lota et al., 2002)        |
| <br><b>(56)</b>  | $\alpha$ -citronellole |                          |                            |
| <br><b>(57)</b> | Curcumène              |                          |                            |

#### I.4.2.5.2. Propriétés et activités biologiques des huiles essentielles

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie: l'aromathérapie. Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents

antimicrobiens à large spectre (**Hammoudi, 2008; Ferhat et al., 2009**). Elles ont des propriétés pharmacologiques très importantes :

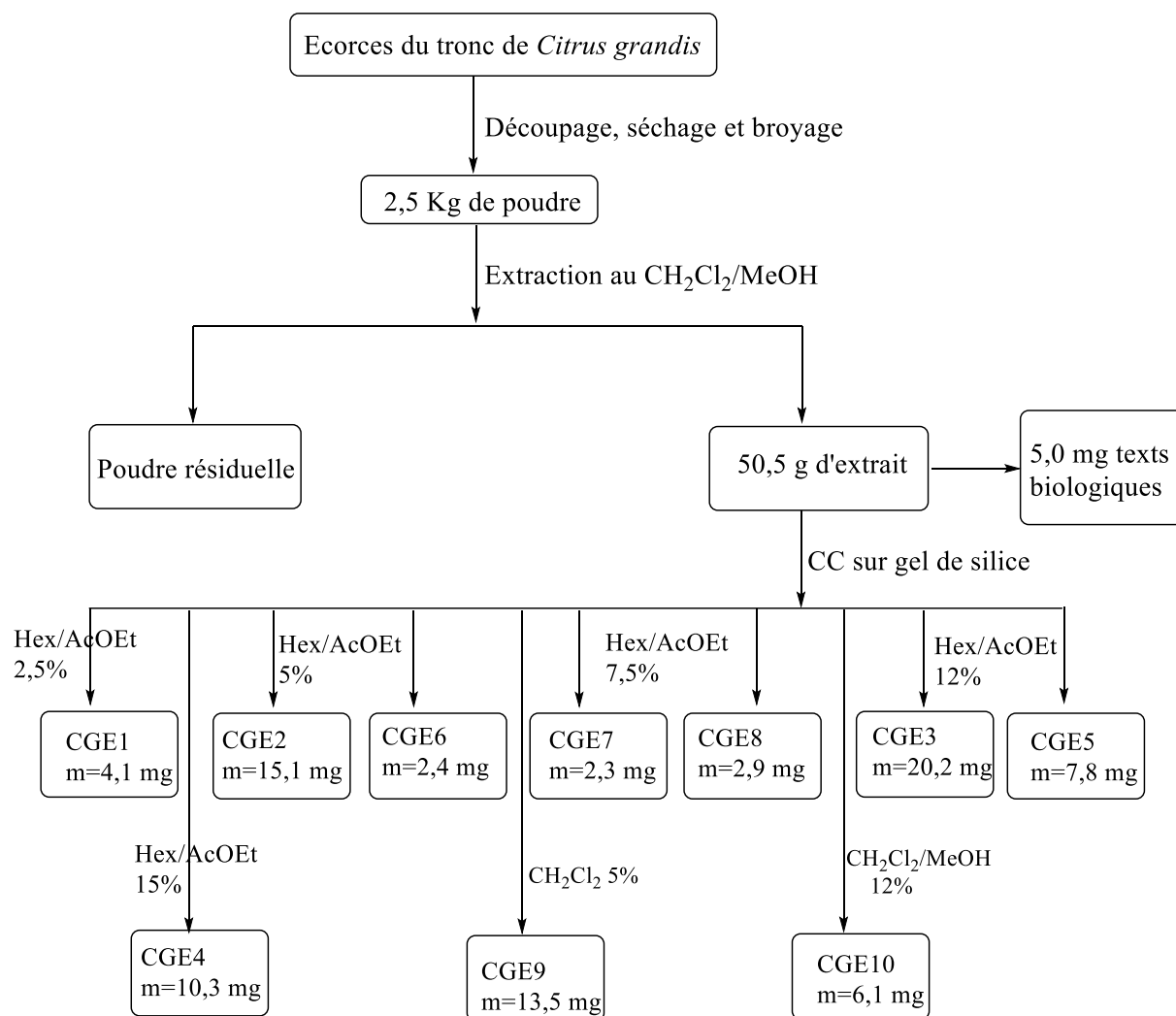
- Antiseptique : Ce pouvoir antiseptique s'exerce à l'encontre des bactéries pathogènes variées y compris les souches habituellement antibiorésistantes. Elles sont également actives sur les champignons et les levures.
- Spasmolytiques et sédatives
- Irritantes qui justifient leur utilisation dans plusieurs pommades (**Bruneton, 1993**).

## **CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION**

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

### II.1. Extraction et isolement des composés

Les écorces du tronc de *Citrus grandis* ont été récoltées en Mars 2020 à Ndobong, localité de Douala, région du Littoral. Les échantillons ont été identifiés par le botaniste Mr NANA Victor puis authentifiés par comparaison avec l'échantillon référencié au N° : 25860/HNC conservé à l'herbier national du Cameroun. Le matériel végétal a ensuite été découpé, séché, broyé, puis extrait par macération au chlorure de méthylène/méthanol (1:1) à température ambiante pendant 48h pour la première macération et 24h pour la deuxième macération. Après filtration, la solution résultante a été concentrée sous un évaporateur rotatif pour conduire à un extrait brut de 50,5 g. qui a été soumis à une chromatographie dans une colonne de gel de silice éluée au mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante jusqu'à 30% puis de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH à CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5% et enfin méthanol pur. Toutes ces opérations ont permis d'obtenir dix (10) composés purs, indexés de CGE1 à CGE10 comme l'indique le schéma 4 ci-dessous.



**Schéma 4:** Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces du tronc de *Citrus grandis*

## II.2. Identification des composés isolés

L'étude phytochimique des écorces du tronc de *Citrus grandis* nous a permis d'isoler dix (10) composés indexés CGE1 à CGE10. Trois de ces composés (CGE1, CGE3 et CGE5) ont été identifiés sur la base de leurs données spectrales et physiques. Les composés CGE2 et CGE9 étant respectivement le stérol et son glucoside ont été identifiés sur la base de leur CCM comparative avec des échantillons déjà disponibles au laboratoire.

### II.2.1. Alcaloïdes acridones

#### II.2.1.1. Identification de CGE3

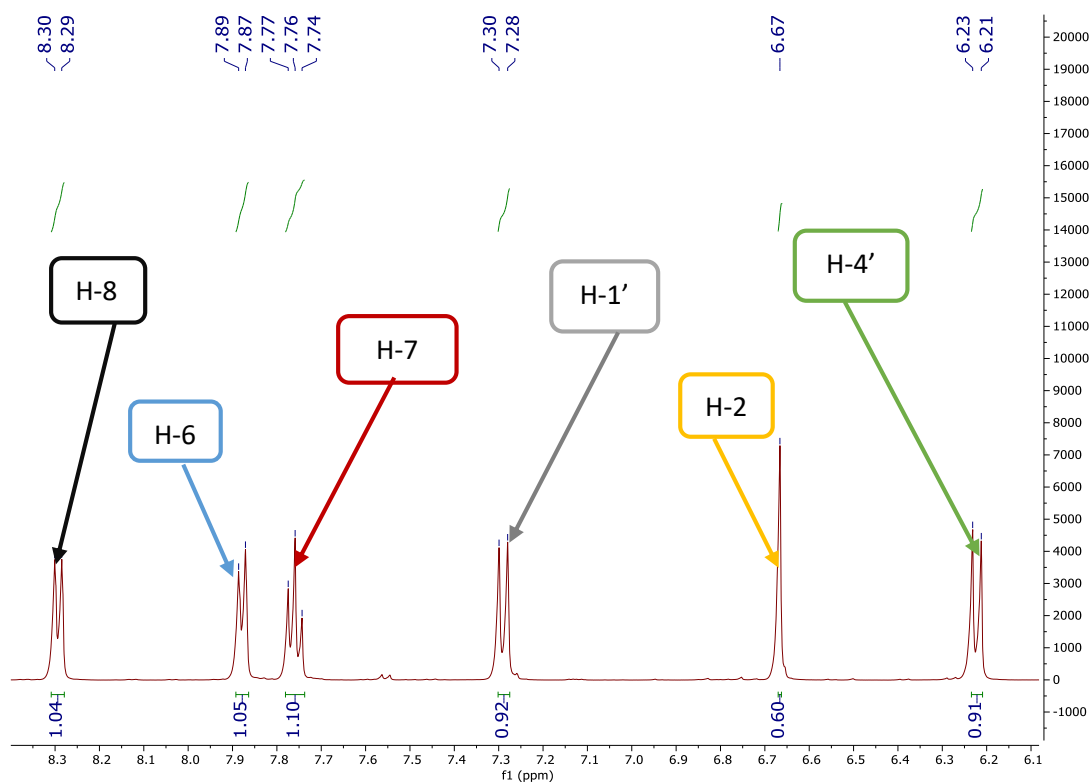
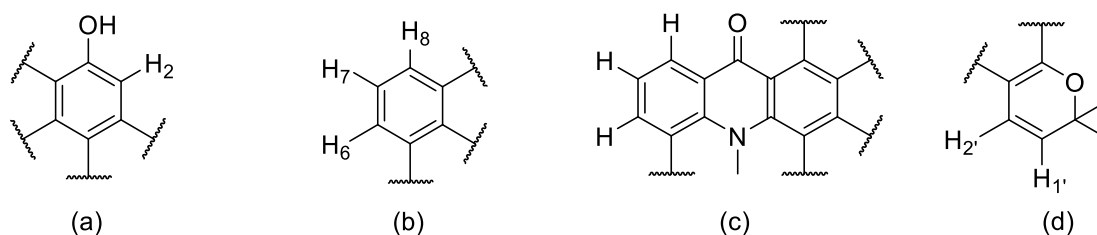
Le composé CGE3 a été isolé des écorces du tronc de *Citrus grandis* au système Hex/AcOEt 12%, sous forme de poudre orange soluble à l'acétone. La formule brute  $C_{19}H_{17}O_4N$  qui renferme 11 insaturations lui a été attribuée sur la base de l'analyse combinée des spectres de RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , DEPT135 et HSQC. Il réagit positivement d'une part au test du chlorure ferrique en donnant une coloration violette caractéristique des composés phénoliques et d'autre part au test de Dragendorff avec une coloration orangée, caractéristique des alcaloïdes.

L'analyse du spectre de RMN  $^1H$  (500 MHz, acétone- $d_6$ , figure 5) de CGE3 permet d'identifier :

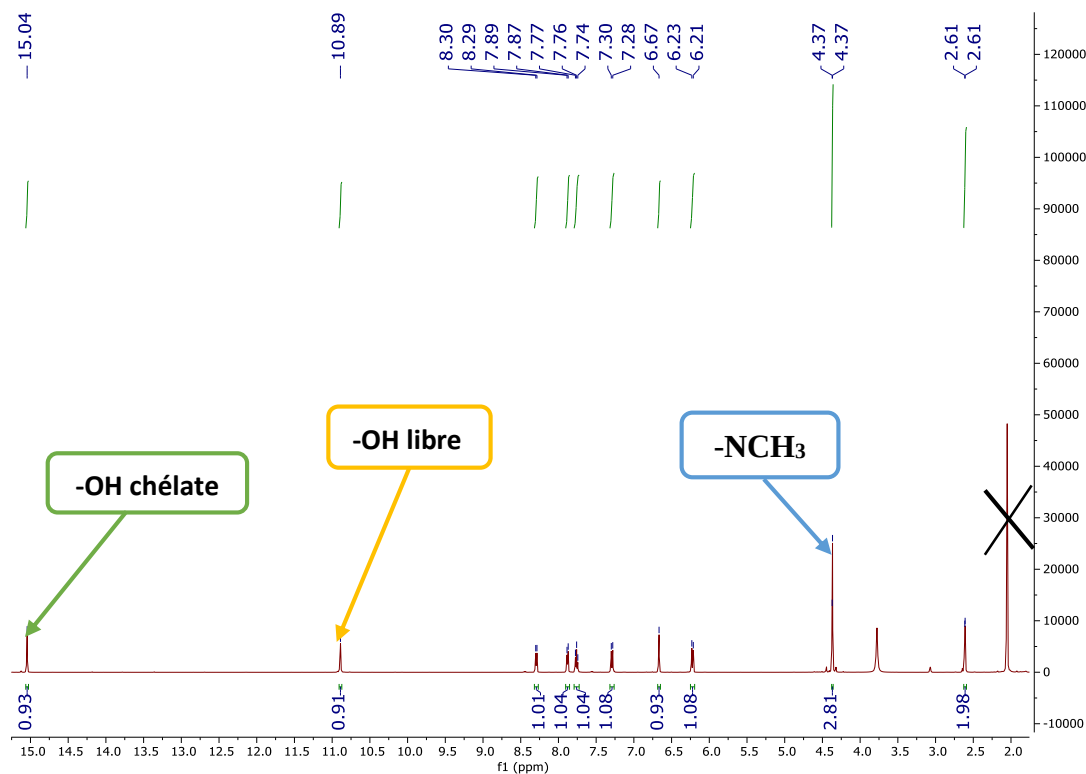
- Un signal apparaissant sous forme de singulet et intégrant un proton à  $\delta_H$  15,04 attribuable au proton de la fonction hydroxyle chélaté (a) ;
- Un système ABC de trois protons dans la zone des champs faibles dont les signaux apparaissent à  $\delta_H$  8,29 (1H, d,  $J = 7,9$ , H-8) ; 7,76 (1H, t,  $J = 7,8$ , H-7) et 7,88 (1H, d,  $J = 7,7$ , H-6) attribuables aux protons d'un noyau benzénique 1,2,3-trisubstitué (b). L'un des protons de par son déplacement chimique très élevé ( $\delta_H$  8,30) se trouverait dans le cône d'anisotropie positive du carbonyle ; caractéristiques des acridones (**Atangana et al., 2017**) ;
- Un proton apparaissant à  $\delta_H$  6,67 sous forme de singulet attribuable à un proton aromatique d'un noyau benzénique pentasubstitué (c) ;
- Un singulet large de trois protons résonant à  $\delta_H$  4,38 (H-10) et attribuable à un N-méthyle.

L'ensemble de ces informations permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle nous sommes en présence d'un squelette acridonique (c).

Par ailleurs, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  présente un ensemble de signaux caractéristique du noyau 2,2-diméthylpyrane (d), notamment un système AB apparaissant à  $\delta_{\text{H}}$  7,29 (1H, d,  $J = 9,7$ , H-1') et  $\delta_{\text{H}}$  6,22 (1H, d,  $J = 9,7$ , H-2'); puis un singulet intense de six protons à  $\delta_{\text{H}}$  2,61 (H-4') attribuable à un gem-diméthyle. Ceci est caractéristique d'un cycle chromène. On observe également la présence d'un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  10,89 (-OH<sub>6</sub>) attribuable au proton d'un hydroxyle libre.

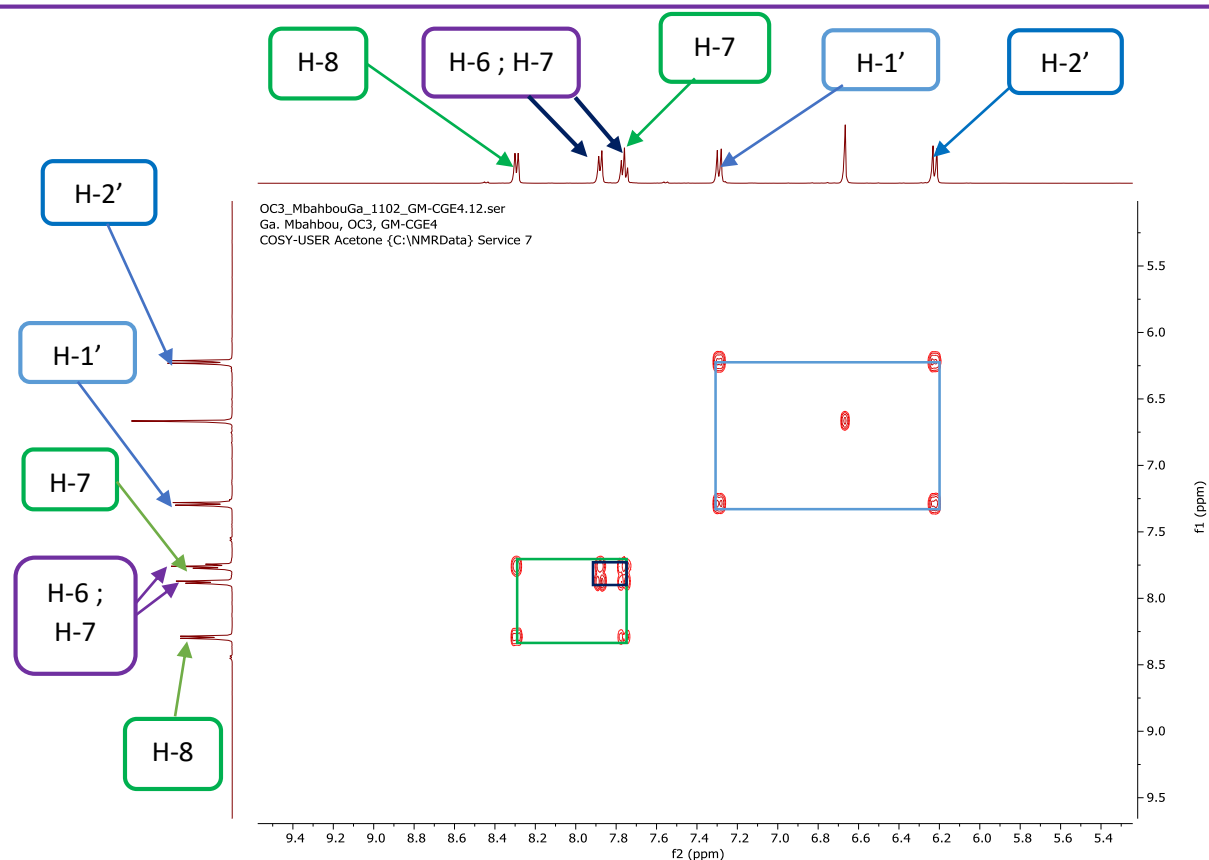


**Figure 5:** Spectre élargi proton de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE3



**Figure 6:** Spectre proton de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE3

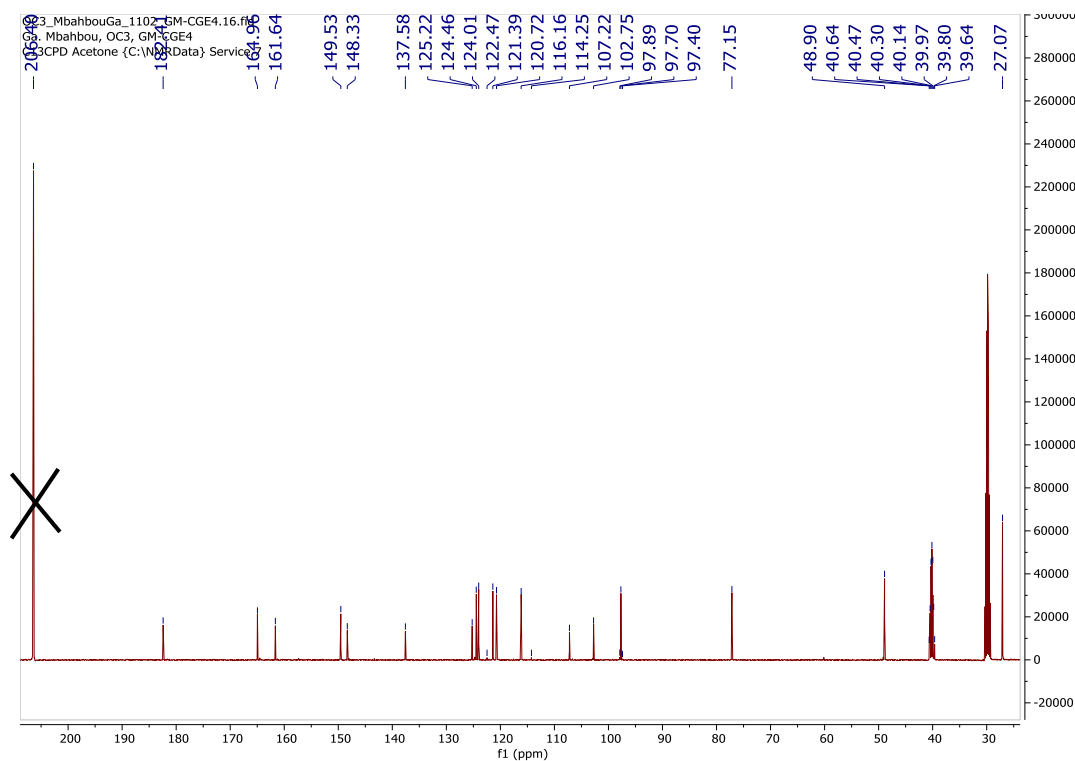
Le spectre COSY (500 MHz ; acétone- $d_6$ , figure 7) de CGE3 confirme la présence des systèmes ABC d'une part et AB d'autre part, de par les corrélations homonucléaires en  $^3J$  entre les protons H-8, H-7 et H-6 ; H-1' et H-2'.



**Figure 7:** Spectre COSY du composé CGE3

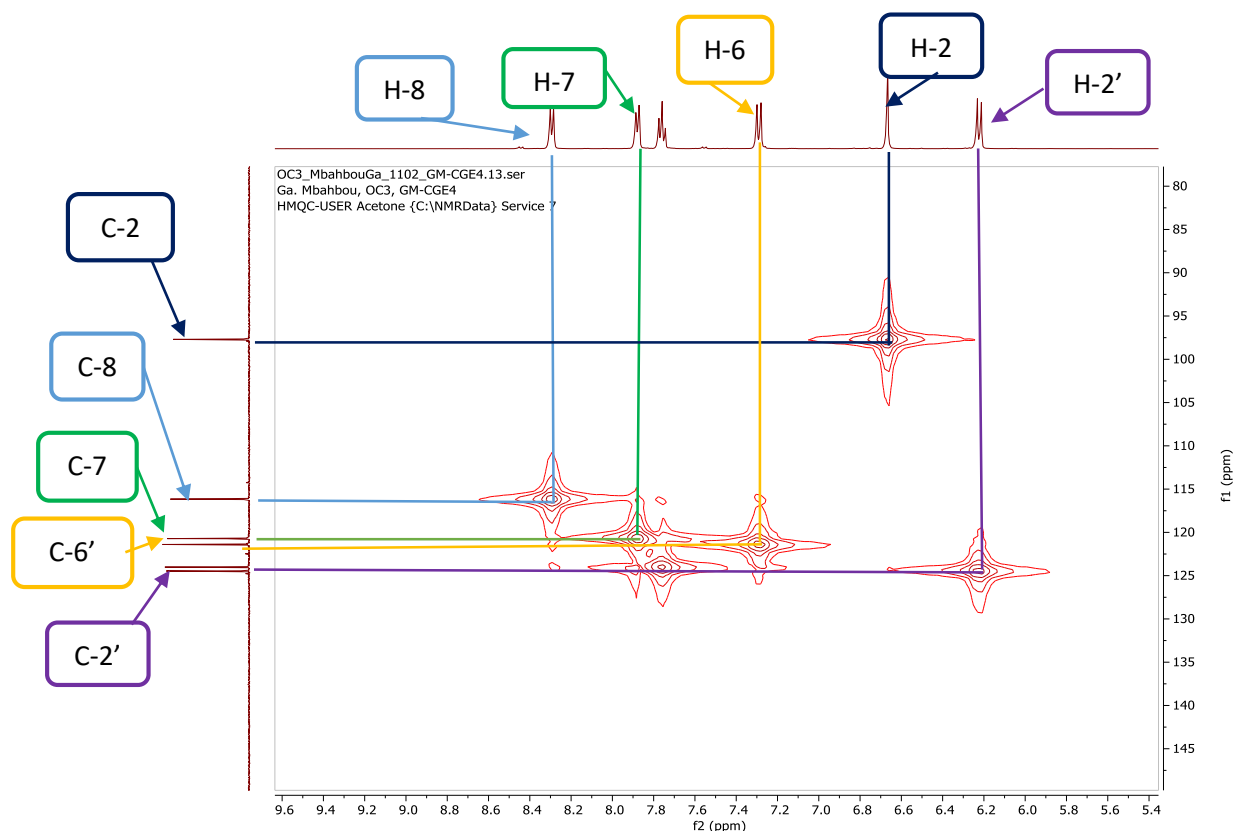
L'analyse du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  découplé large bande (125 MHz, acétone- $d_6$ ) permet de dénombrer 18 signaux répartis comme suit:

- Six signaux de méthynes aromatiques et oléfiniques à  $\delta_{\text{C}}$  116,1 (C-8); 124,0 (C-7) ; 120,7 (C-6) ; 121,3 (C-1) ; 124,4 (C-2') et 97,7 (C-2) ;
- Deux signaux de méthyles dont le premier à  $\delta_{\text{C}}$  27,0 (C-4'et 5') attribuable au signal du gem-diméthyle et le second à  $\delta_{\text{C}}$  48,9 (C-10) attribuable au N-méthyle ;
- Dix carbones quaternaires dont celui du carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  182,4 (C-9) caractéristique d'une cétone  $\alpha, \beta$ -insaturée (Wansi et al., 2006).



**Figure 8:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE3

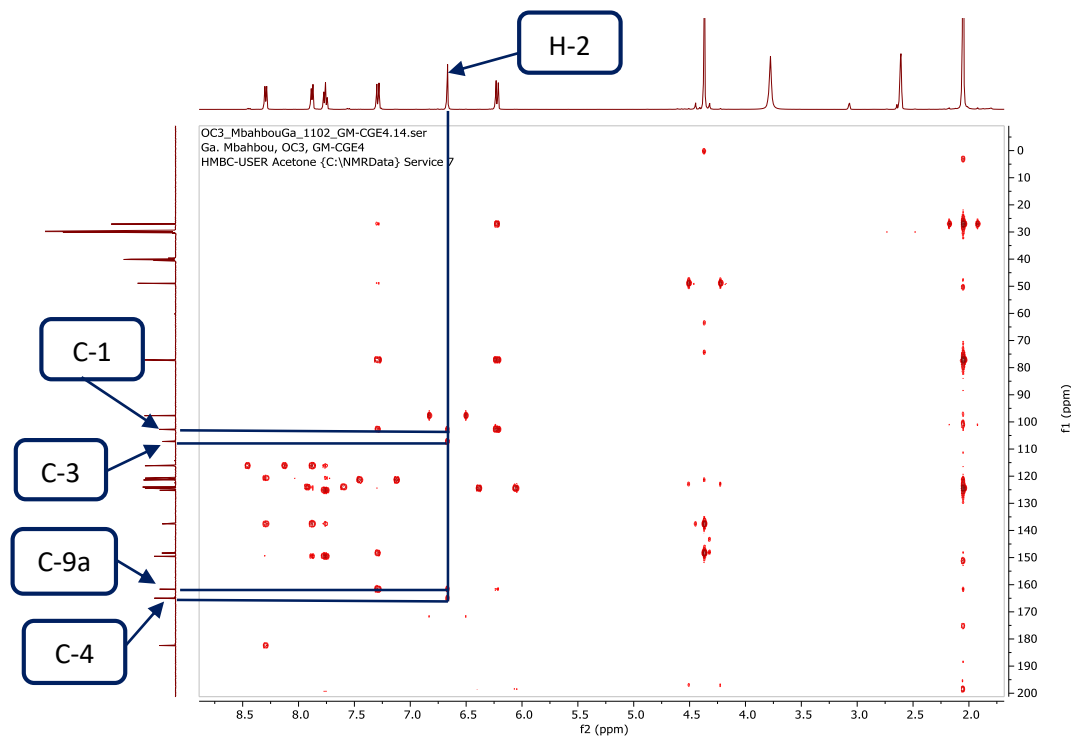
L'analyse du spectre HSQC Figure 9 CGE3 nous a permis d'attribuer sans ambiguïté les déplacements chimiques des carbones hydrogénés de par les différentes corrélations hétéronucléaires  $^1J$ .



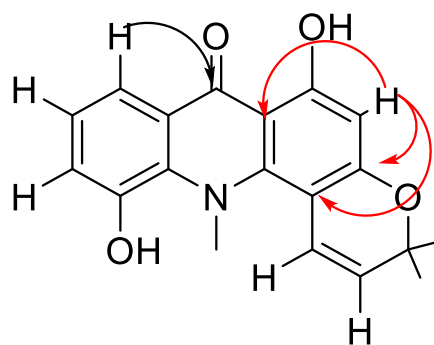
**Figure 9:** Spectre HSQC du composé CGE3

L'analyse du spectre HMBC nous a permis de lier le cycle chromène au squelette de base des acridones. En effet :

On observe les corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  entre le proton à  $\delta_H$  6,67 (H-2) et les carbones  $\delta_C$  164,9 (C-1) ;  $\delta_C$  161,6 (C-3) ;  $\delta_C$  102,7 (C-4) et  $\delta_C$  107,2 (C-9a) confirmant la position de ce proton en C-2 d'où la fixation angulaire du chromène sur les carbones C-3 et C-4. On observe également des corrélations  $^2J$  et  $^3J$  entre le proton à 7,29 (H-1') et les carbones  $\delta_C$  27,0 (C-4'et 5') ; 77,1 (C-3') ; 97,7 (C-2) ; 102,7 (C-4) ; 161,6 (C-3) qui confirme la position du cycle.

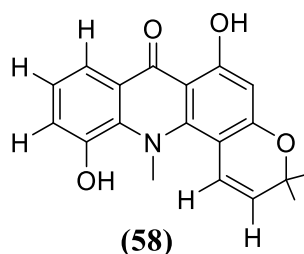


**Figure 10:** Spectre HMBC du composé CGE3



**Figure 11:** Quelques corrélations HMBC de CGE3

L'ensemble de toutes ces données spectrales et physicochimiques en accord avec celles décrites dans la littérature nous a permis d'attribuer au composé CGE3 la structure **37** qui est celle de la 5- hydroxynoracronycine ou 1,5-dihydroxy-10, 3',3'-triméthyl-10 ,3'-dihydro-3H-pyrano [2,3- c] acridin-9-one, un alcaloïde de type acridone isolé pour la première fois de *Citrus depressa* (Wu et al., 1983).



**Tableau 9** : Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de CGE3 comparées à celles de la 5-hydroxynoracronycine (Wu et al., 1983).

| Position | Types de C     | CGE3 (acétone- $d_6$ ) |                                  | 5-hydroxynoracronycine ( $\text{CDCl}_3$ ) |                                  |
|----------|----------------|------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
|          |                | $\delta_{\text{C}}$    | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) | $\delta_{\text{C}}$                        | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
| 1        | C              | 164,9                  | 15,04 ; (s)                      | 165,5                                      | 14,30 (s)                        |
| 2        | CH             | 97,7                   | 6,67 ; (s)                       | 98,2                                       | 6,27 (s)                         |
| 3        | C              | 161,6                  | -                                | 162,2                                      | -                                |
| 4        | C              | 102,7                  | -                                | 103,3                                      | -                                |
| 4a       | C              | 148,3                  | -                                | 148,8                                      | -                                |
| 5        | C              | 149,5                  | 10,8                             | 148,4                                      |                                  |
| 5a       | C              | 137,5                  | -                                | 138,1                                      | -                                |
| 6        | CH             | 120,7                  | 7,29 ; (d, 9,7)                  | 120,9                                      | 7,33 (d, 7,9)                    |
| 7        | CH             | 124,0                  | 7,76 ; (t, 7,8)                  | 124,2                                      | 7,19 (t, 7,9)                    |
| 8        | CH             | 116,1                  | 8,29 ; (d, 7,9)                  | 123,2                                      | 7,94 (dd, 7,9 ; 1,2)             |
| 8a       | C              | 125,2                  | -                                | 125,8                                      | -                                |
| 9        | C              | 182,4                  | -                                | 182,9                                      | -                                |
| 9a       | C              | 107,2                  | -                                | 107,6                                      | -                                |
| 10       | $\text{NCH}_3$ | 48,9                   | 4,37 ; (s)                       | 48,9                                       | 3,73 ; s                         |
| 1'       | CH             | 121,3                  | 7,88 ; (d, 7,7)                  | 121,9                                      | 6,70 (d, 9,7)                    |
| 2'       | CH             | 124,4                  | 6,22 ; (d, 9,7)                  | 123,2                                      | 5,56 (d, 9,7)                    |

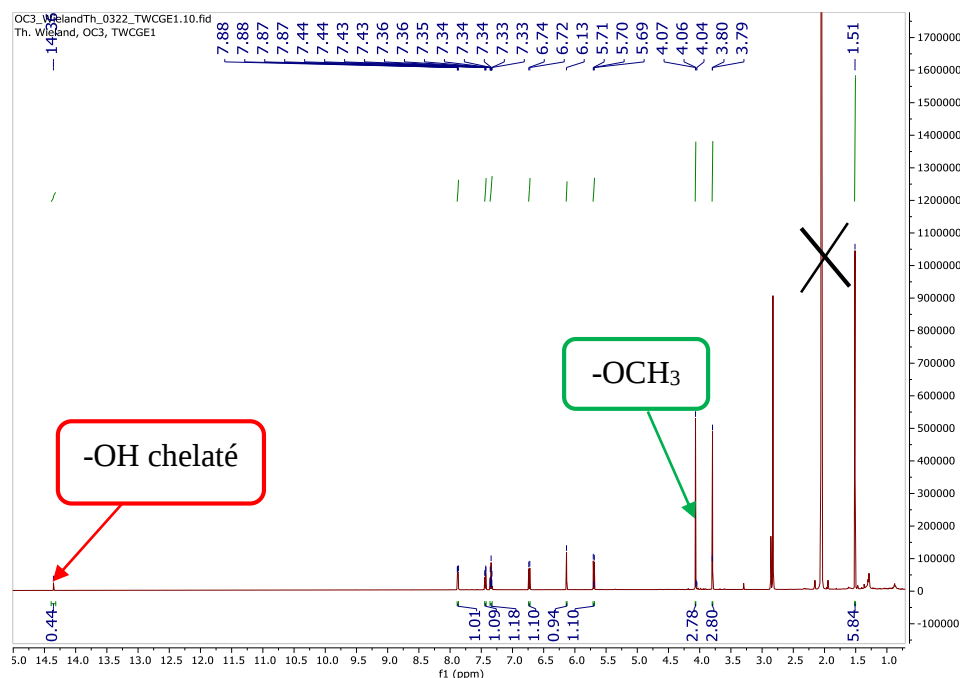
|    |                 |      |            |      |          |
|----|-----------------|------|------------|------|----------|
| 3' | C               | 77,1 | -          | 77,4 | -        |
| 4' | CH <sub>3</sub> | 29,8 | 2,61 ; (s) | 27,2 | 1,53 (s) |
| 5' | CH <sub>3</sub> | 29,8 | 2,61 ; (s) | 27,2 | 1,53 (s) |

### II.2.1.2. Identification de CGE1

Le composé CGE1 a été isolé au système hexane/acétate d'éthyle 2,5% sous forme de poudre jaune soluble à l'acétone. Il donne un test positif au chlorure ferrique. La formule brute C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N qui renferme 12 insaturations lui a été attribuée sur la base des spectres de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT135 et HSQC.

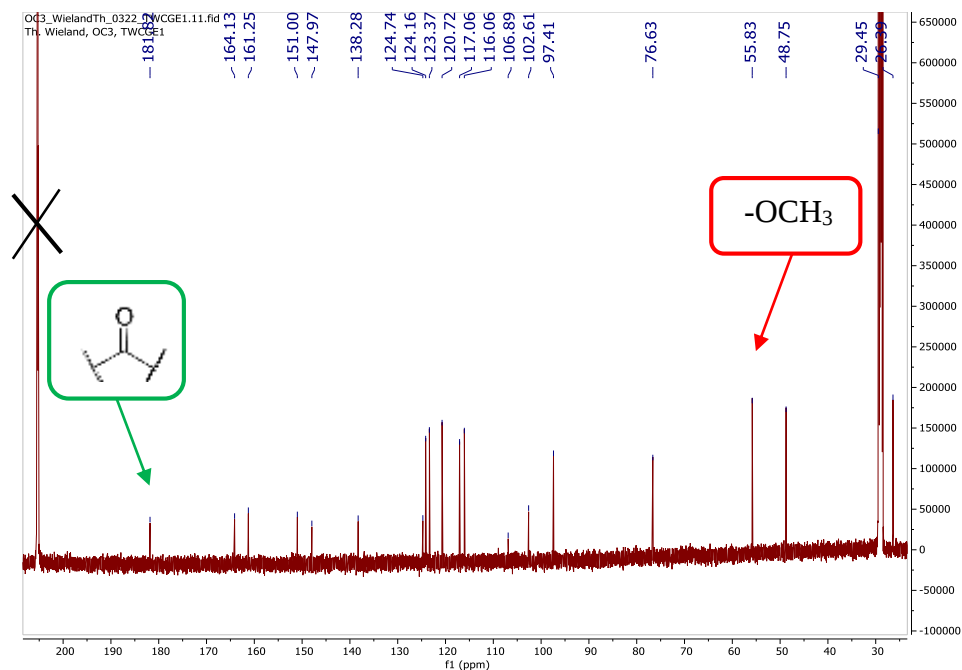
L'analyse de son spectre de RMN <sup>1</sup>H (600MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>, figure 11) révèle que ce dernier est presque superposable à celui du composé CGE3. Cependant l'on observe :

- Un signal apparaissant sous forme de singulet et intégrant un proton  $\delta_H$  14,36 (OH<sub>1</sub>) ;
- Un système ABC de trois protons dans la zone des champs faibles dont les signaux apparaissent à  $\delta_H$  7,88 (t, 8,0, 1H); 7,34 (d, 8,0, 1H) et 7,43 (d, 8,0, 1H) attribuables aux protons du noyau benzénique 1,2,3-trisubstitué (**Atangana et al., 2017**) ;
- Un signal de trois protons apparaissant sous forme de singulet à  $\delta_H$  4,07 attribuable au méthyl d'un groupement méthoxy (**Wu et al., 1987**).
- Un système AB apparaissant à  $\delta_H$  6,73 (d, 9,7, 1H) et  $\delta_H$  5,70 (d, 9 ;7, 1H) ; puis un singulet intense de six protons à  $\delta_H$  1,51 (s, 3H ; H-4'et 5') attribuable à un gem-diméthyle.

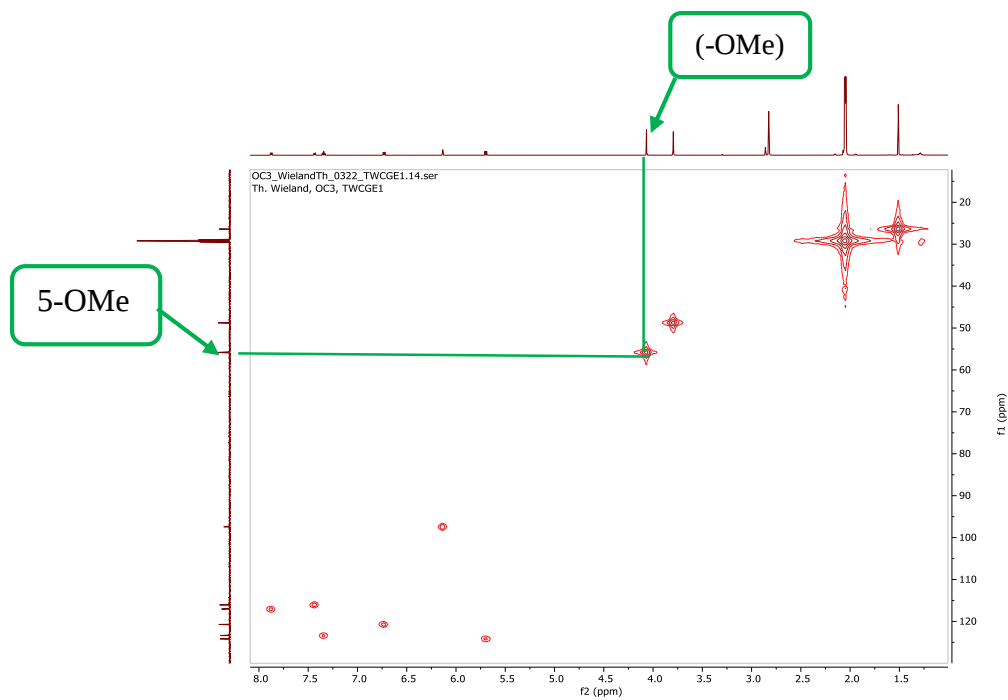


**Figure 12:** Spectre proton de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE1

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, acétone- $d_6$ ) de CGE1 présente 19 pics attribuables à 20 atomes de carbones dont un carbone de plus que celui de CGE3 qui apparaît à  $\delta_{\text{C}}$  55,8 caractéristique du groupement méthoxy (-OMe). On confirme cette hypothèse sur le spectre HSQC avec la présence d'une corrélation hétéronucléaire  $^1J$  entre le proton à  $\delta_{\text{H}}$  4,07 (O-Me) et le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  55,8.

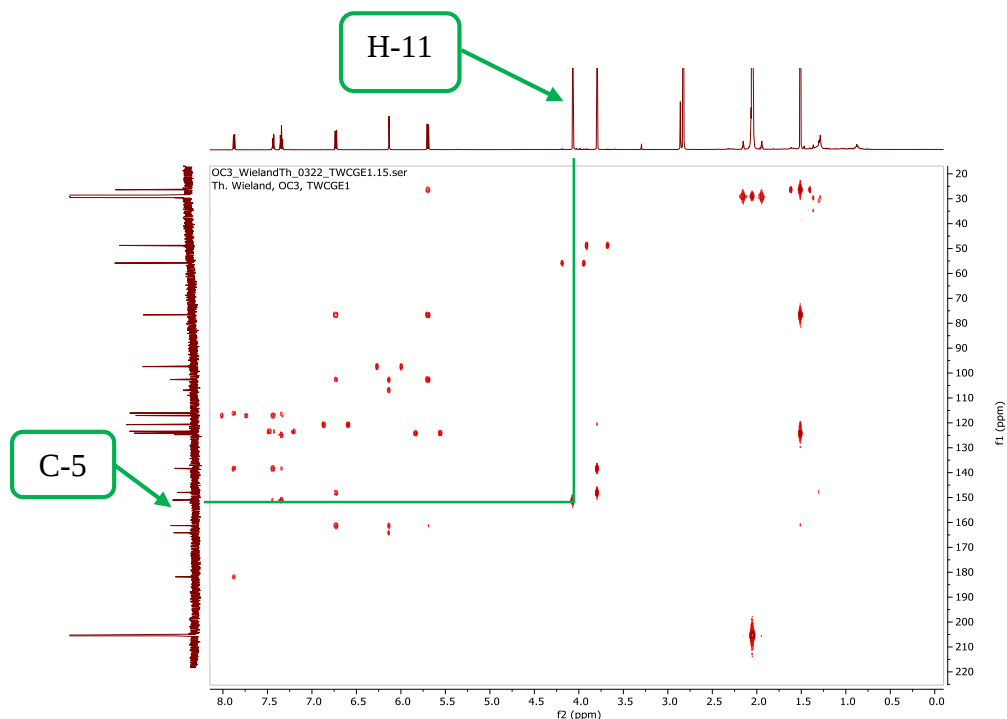


**Figure 13:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, acétone- $d_6$ ) du composé CGE1



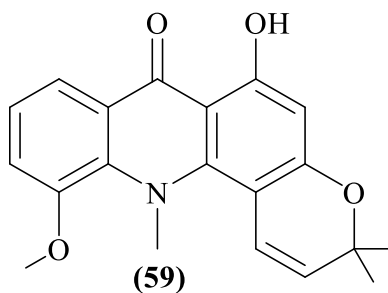
**Figure 14:** Spectre HSQC du composé CGE1

La position du –OMe a été confirmée par l'analyse de spectre HMBC où l'on observe une corrélation hétéronucléaire  $^3J$  entre le proton à  $\delta_H$  4,07 (H-11) et les carbones à  $\delta_C$  151,2 (C-5), 151,2 (C-11).



**Figure 15:** Spectre HMBC du composé CGE1

L'ensemble de ces données (RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , DEPT 135, HSQC, HMBC, COSY) et les données de la littérature nous ont permis d'attribuer à CGE1, la structure **38**, qui est celle de la Baiyumine-A isolée pour la première fois de *Citrus grandis* (Wu et al., 1987).



**Tableau 10** : Données spectrales de RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  de CGE1 comparées à celles de la Baiyumine-A (Wu *et al.*, 1987).

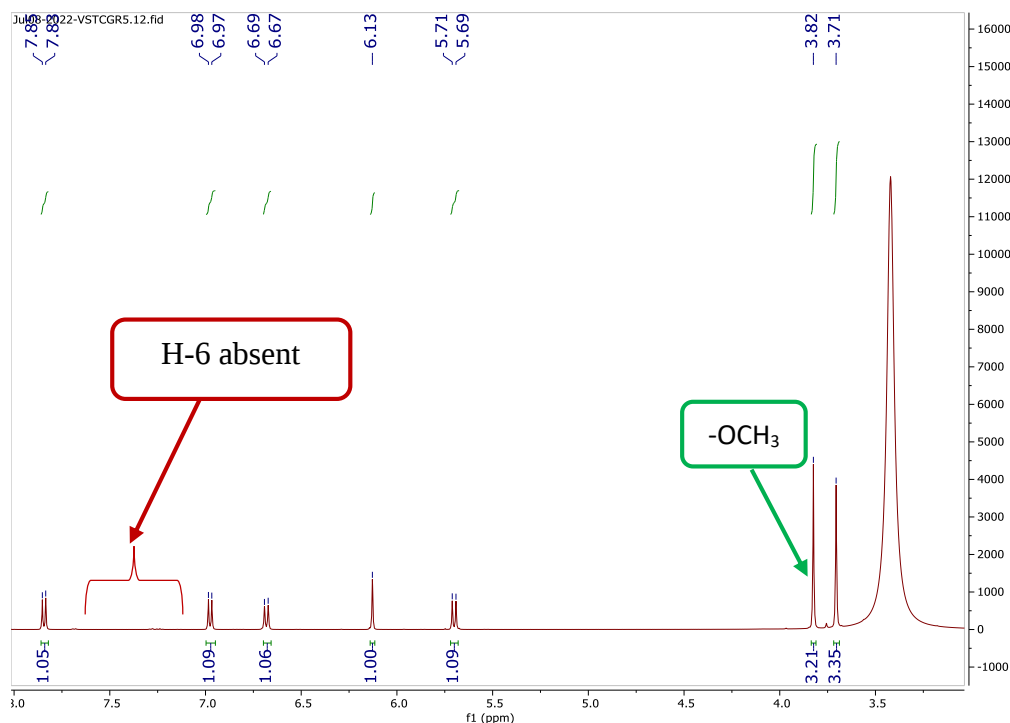
| Position | Types de C     | CGE1<br>(acétone- $d_6$ ) |                                  | Baiyumine-A<br>( $\text{CDCl}_3$ ) |                                  |
|----------|----------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
|          |                | $\delta_{\text{C}}$       | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) | $\delta_{\text{C}}$                | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
| 1        | C              | 164,1                     | -                                | 164,5                              | -                                |
| 2        | CH             | 97,4                      | 6,13 (s,1H)                      | 98,2                               | 6,25 (s, 1H)                     |
| 3        | C              | 161,2                     | -                                | 161,4                              | -                                |
| 4        | C              | 102,6                     | -                                | 102,4                              | -                                |
| 4a       | C              | 147,9                     | -                                | 147,8                              | -                                |
| 5        | C              | 151,0                     | -                                | 150,6                              | -                                |
| 5a       | C              | 138,2                     | -                                | 138,1                              | -                                |
| 6        | CH             | 116,0                     | 7,43 (d, 8,0 ;1H)                | 115,4                              | 7,10 (m,1H)                      |
| 7        | CH             | 123,3                     | 7,34 (d, 8,0 ;1H)                | 123,1                              | 7,35 (m,1H)                      |
| 8        | CH             | 117,0                     | 7,88 (t, 8,0 ;1H)                | 117,7                              | 7,96 (dd, 2,5; 7 ;1H)            |
| 8a       | C              | 124,7                     | -                                | 124,7                              | -                                |
| 9        | C              | 181,8                     | -                                | 181,9                              | -                                |
| 9a       | C              | 106,8                     | -                                | 107,3                              | -                                |
| 10       | $\text{NCH}_3$ | 48,7                      | 3,79 (s,1H)                      | 49,1                               | 3,74 (s, 3H)                     |
| 11       | $\text{OCH}_3$ | 55,8                      | 4,07 (s,1H)                      | 56,1                               | 4,01 (s,3H)                      |
| 1'       | CH             | 120,7                     | 6,73 (d, 9,7 ;1H)                | 121,0                              | 6,65 (d, 10,0;1H)                |
| 2'       | CH             | 124,1                     | 5,70 (d, 9,7;1H)                 | 123,8                              | 5,54 (d, 10,0;1H)                |
| 3'       | C              | 76,6                      | -                                | 76,6                               | -                                |

|    |                 |      |             |      |             |
|----|-----------------|------|-------------|------|-------------|
| 4' | CH <sub>3</sub> | 26,3 | 1,51 (s,3H) | 27,2 | 1,51 (s,3H) |
| 5' | CH <sub>3</sub> | 26,3 | 1,51 (s,3H) | 27,2 | 1,51 (s,3H) |
| 12 | OH <sub>1</sub> | -    | -           | -    | 14,25       |

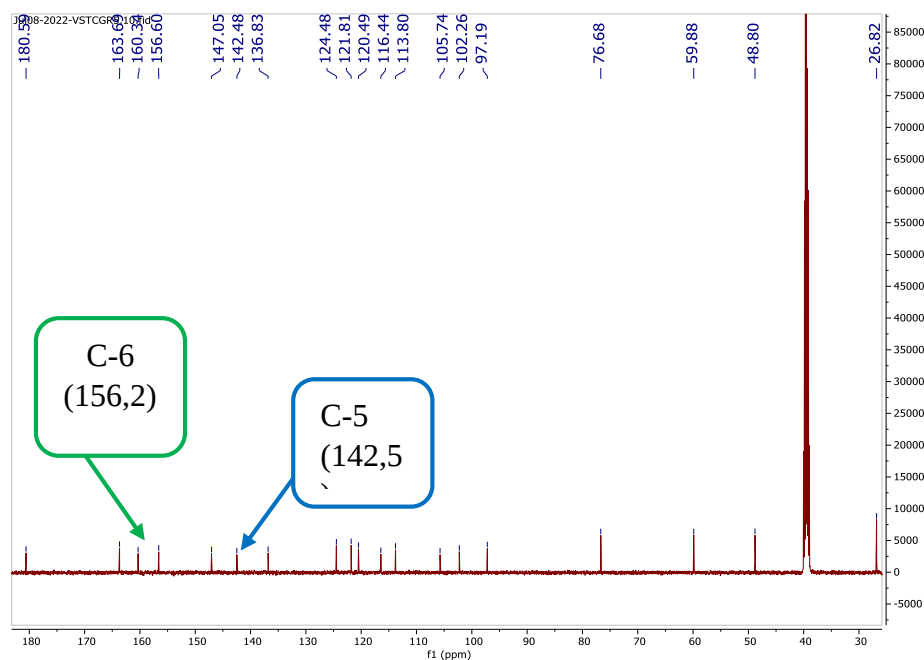
### II.2.1.3. Identification de CGE5

Le composé CGE5 a été isolé au système hexane/acétate d'éthyle 12%, sous forme de poudre marron soluble au DMSO. Il répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des hydroxyles phénoliques. La formule brute C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N qui renferme 12 insaturations lui a été attribuée sur la base des spectres de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et HSQC.

L'analyse de son spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, figure 11) présente des similitudes avec celui du composé CGE1, à la seule différence que : sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, figure 15) de CGE5, on observe l'absence du proton (H-6) présent sur le spectre proton de CGE1. Ceci est visible sur le spectre de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, figure 16) de CGE5 grâce au déblindage du déplacement chimique du C-6 apparaissant à  $\delta_C$  157,2 ce qui suggérerait que ce carbone serait lié à un hétéroatome.



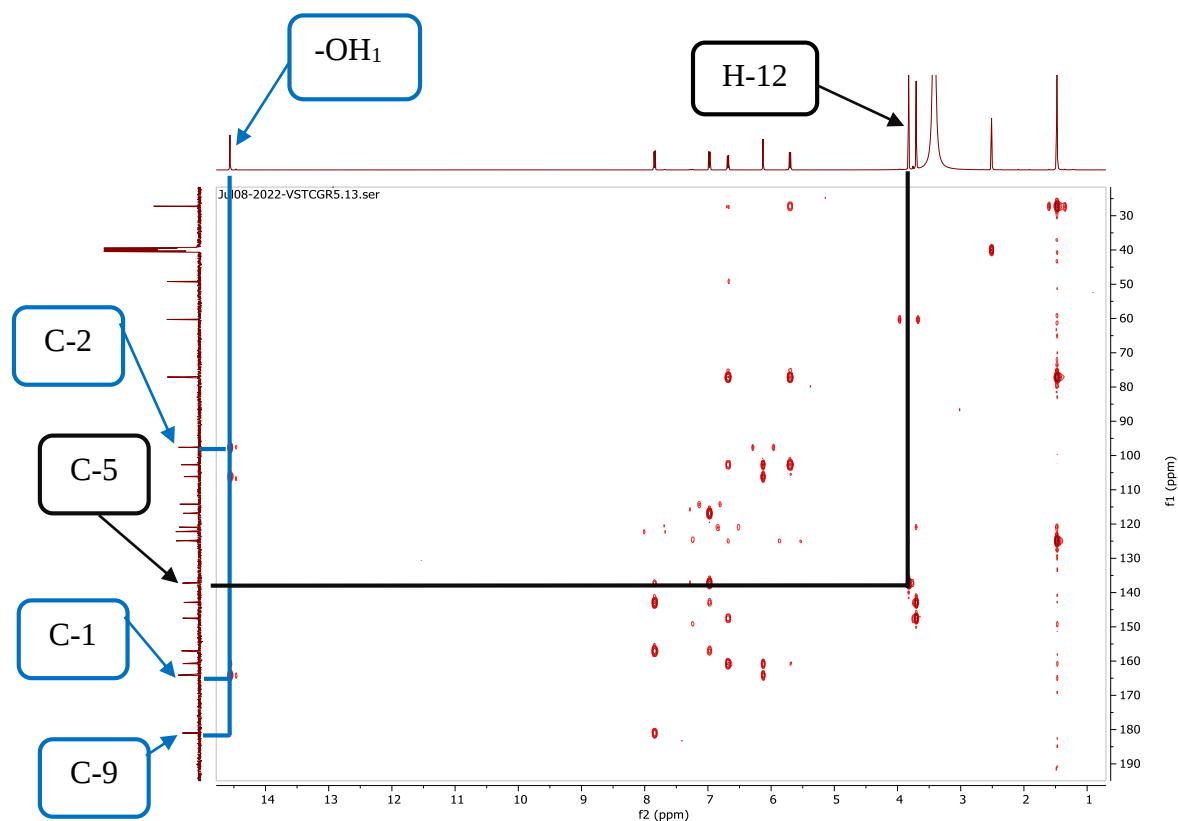
**Figure 16:** Spectre proton de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) du composé CGE5



**Figure 17:** Spectre proton de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) du composé CGE5

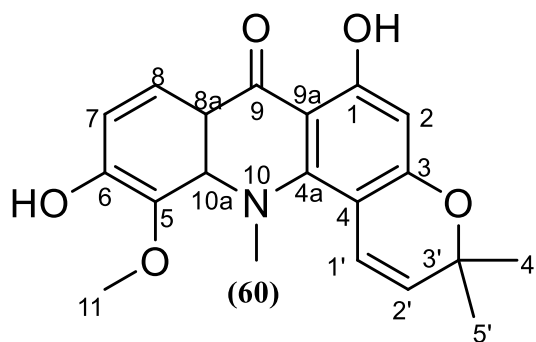
La position du (-OMe) a été confirmée par l'analyse de spectre HMBC où l'on observe une corrélation hétéronucléaire  $^3J$  entre le proton à  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (H-11) et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  137,2 (C-5) ppm.

Les corrélations hétéronucléaire  $^3J$  et  $^4J$  observés sur le spectre HMBC de CGE5 entre le proton  $\delta_{\text{H}}$  14,56(OH<sub>1</sub>) et les carbones  $\delta_{\text{H}}$  97,5(C-1) ; 106,1 (C-9a) ; 160,7(C-3) ; 180,9(C-9) nous ont permis de confirmer la position du proton chélaté.



**Figure 18:** Spectre HMBC du composé CGE5

L'ensemble des données spectrales et physicochimique en accord avec celles décrites dans la littérature a permis d'attribuer au composé CGE5 la structure (39) qui est celle de la Citracridone I isolée pour la première fois de *Citrus depressa* (Wu et al., 1983).



**Tableau 11 :** Données comparatives de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de CGE5 et de la Citracridone I (Wu et al., 1983).

| Position | Types<br>C       | CGE5 (DMSO)         |                                  | citracridone I (CDCl <sub>3</sub> ) |                                  |
|----------|------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
|          |                  | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) | $\delta_{\text{C}}$                 | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
| 1        | C                | 164,0               | -                                | 164,3                               |                                  |
| 2        | CH               | 97,6                | 6,13 (s,1H)                      | 97,8                                | 6,23 (s,1H)                      |
| 3        | C                | 160,7               | -                                | 160,6                               | -                                |
| 4        | C                | 102,6               | -                                | 102,3                               | -                                |
| 4a       | C                | 147,4               | -                                | 147,4                               | -                                |
| 5        | C                | 137,2               | -                                | 142,5                               | -                                |
| 5a       | C                | 142,8               | -                                | 136,7                               | -                                |
| 6        | C                | 157,0               | -                                | 156,2                               | -                                |
| 7        | CH               | 114,2               | 6,98 (d, 8,8;1H)                 | 113,4                               | 6,88 (d, 8,8;1H)                 |
| 8        | CH               | 122,2               | 7,84 (d, 8,8;1H)                 | 122,2                               | 7,95 (d, 8,8;1H)                 |
| 8a       | C                | 116,8               | -                                | 117,4                               | -                                |
| 9        | C                | 180,9               | -                                | 181,1                               | -                                |
| 9a       | C                | 106,1               | -                                | 106,4                               | -                                |
| 10       | NCH <sub>3</sub> | 49,2                | 3,71 (s,3H)                      | 48,6                                | 3,75 (s,3H)                      |
| 11       | OH-1             | -                   | 14,56 (s,1H)                     | -                                   | 14,52 (s,1H)                     |
| 12       | OCH <sub>3</sub> | 60,2                | 3,83 (s,3H)                      | 59,8                                | 3,91 (s,3H)                      |
| 1'       | CH               | 120,9               | 6,68 (d,1,0;10,0;1H)             | 120,6                               | 6,63<br>(dd,1,0;10,0;1H)         |
| 2'       | CH               | 124,8               | 5,70 (d, 10,0;1H)                | 124,1                               | 5,61 (d, 10,0;1H)                |
| 3'       | C                | 77,0                |                                  | 76,5                                | -                                |
| 4'       | CH <sub>3</sub>  | 27,2                | 1,48 (s,3H)                      | 27,0                                | 1,53 (s,3H)                      |
| 5'       | CH <sub>3</sub>  | 27,2                | 1,4 (s,3H)                       | 27,0                                | 1,53 (s,3H)                      |

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a porté sur l'étude chimique d'une plante médicinale Camerounaise : *Citrus grandis* appartenant à la famille des Rutaceae. Une plante largement utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies fongiques, car constitue une riche source de métabolites secondaires et de principes actifs intéressants.

L'étude chimique des écorces de cette plante nous a permis d'isoler dix composés indexés de CGE1 à CGE10. Ces composés ont été identifiés non seulement à l'aide des méthodes spectroscopiques (1D et 2D) et aussi des techniques chromatographique (CCM) par comparaison avec des échantillons authentiques disponibles au laboratoire. Ces composés appartenant à des classes différentes sont entre autres :

- **Deux stéroïdes** : le mélange de  $\beta$ -sitostérol et de stigmastérol (CGE2) et le 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sistostérol (CGE9)
- **Trois alcaloïdes acridones** : la Baiyumine-A (CGE1), la 5-hydroxynoracridone (CGE3), la Citracridone (CGE5)

Ces structures ont été confirmées par une étude comparative des données physiques et spectrales à celles décrites dans la littérature.

Compte tenu de la richesse de cette plante de par son activité biologique et de son utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement de certaine maladie, nous envisageons dans les travaux futurs, d'identifier la structure des autres composés déjà isolés et de travailler sur les autres parties de la plante. D'effectuer des tests à activités antifongiques sur les extraits et les composés isolés dans le but de trouver les substances bioactives responsables de l'activité et enfin d'étendre notre recherche sur d'autres espèces du même genre.



### III. APPAREILLAGE ET MATERIEL VEGETAL

#### III.1. Appareillage

Le présent travail a été réalisé dans le Laboratoire d'étude chimique des endophytes et des plantes médicinales (LECEPLAM) de l'Université de Yaoundé 1. Nous avons eu recours à l'utilisation des appareils et instruments suivants :

Les masses des matériels, extraits ont été prises sur balance électronique de type INDUSTRY 12000 g/1g.

Après extraction, l'évaporation s'est faite sur un évaporateur rotatif de marque HEIDOLPH.

L'isolement et la purification des composés ont été faits par chromatographie. Nous avons effectué des chromatographies sur colonne de gel de silice et des chromatographies analytiques sur couche mince constituées de feuilles d'aluminium de dimensions 20×20 cm recouvertes d'environ 0,2 mL de silice G-60, type GF245 Merck. Le gel de silice de type G-60 (Merck) de granulométrie variée a été utilisé comme phase stationnaire dans une colonne de 7,5 centimètres de diamètres et 75 centimètres de hauteur qui ont été choisies en fonction de la quantité de l'extrait à étudier. Les différents éluants ont été utilisés aux phases stationnaires en fonction de la polarité des composés à séparer.

Les plaques CCM ont été relevées, par utilisation de la lumière ultraviolette de longueur d'onde compris entre 254 et 360 nm dont l'appareil est de type Nu-4KL, puis par exposition de la plaque aux vapeurs de diiode et ensuite pulvérisation à l'aide d'une solution d'acide sulfurique diluée à 20 % suivie du chauffage.

Les composés obtenus ont été pesés à l'aide d'une balance électronique de type P.J. PRECISA JUNIOR 1000.

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre BRUKER Corporation, GERMANY avance 500 MHz

#### III.2. Matériel végétal

Les écorces du tronc de *Citrus grandis* ont été récoltées en Mars 2020 à Ndobong localité de Douala région du Littoral. Elles ont été identifiées par le botaniste Mr NANA Victor puis authentifiées par comparaison avec l'échantillon référencié N° : 25860/HNC conservé à l'herbier

national du Cameroun. Ces écorces du tronc de *Citrus grandis* ont été découpées, séchées et broyées pour donner 2,5 Kg de poudre.

### III.3. Extraction

La poudre obtenue a subi une double macération au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  à température ambiante pendant 48h et 24h. Après filtration, la solution résultante a été concentrée sous évaporateur rotatif pour conduire à 50,5g d'extrait brut de couleur noire.

### III.4. Isolement et purification

L'extrait obtenu (50,5g) a été soumis à un dégrossissement par chromatographie sous pression réduite avec le gel de silice de granulométrie 70-230 Mesh comme phase stationnaire. La phase mobile quant à elle est constituée respectivement de l'hexane, du mélange *n*-hexane/acétate d'éthyle de polarité croissante jusqu'à 30% puis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  de polarité croissante et du méthanol comme le montre le tableau ci-dessous:

**Tableau 12** : Chromatogramme du fractionnement de l'extrait brut

| Solvant                  | Fractions | Série          | CCM                       | Observations                                                                                                                                                                          |
|--------------------------|-----------|----------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hex pur                  | 1 - 91    | A              | Hex/ $\text{AcOEt}$ 7,5 % | Dépôt sous forme d'huile                                                                                                                                                              |
| Hex/ $\text{AcOEt}$ 2,5% | 92 - 139  | B <sub>1</sub> | Hex/ $\text{AcOEt}$ 7,5%  | Deux tâches visibles à l'iode et une tâche violette à l'acide                                                                                                                         |
|                          | 140-151   | B <sub>2</sub> | Hex/ $\text{AcOEt}$ 7,5%  | Tâches violettes                                                                                                                                                                      |
|                          | 152-153   | B <sub>3</sub> | Hex/ $\text{AcOEt}$ 7,5%  | Cette série cristallise sous forme de poudre jaune, soluble à l'acétone visible à la petite longueur d'onde, à l'iode et à l'acide se dissout à l'acétone. Ce composé est indexé CGE1 |
| Hex/ $\text{AcOEt}$ 5%   | 153-172   | C              | Hex/ $\text{AcOEt}$ 17 %  | Cette série cristallise sous forme de poudre blanche, soluble à l'hexane invisible à l'UV, visible                                                                                    |

|                  |          |                |                 |                                                                                                                                            |
|------------------|----------|----------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |          |                |                 | à l'iode et à l'acide se dissout à l'acétone. Ce composé de coloration violette indexe CGE2                                                |
|                  | 173-182  | C <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt 15%  | Coloration bleu à l'UV + trainées                                                                                                          |
|                  | 183-202  | C <sub>3</sub> | Hex/ AcOEt 15%  | Cette série cristallise sous forme de cristaux blanc soluble au DCM pas visible à l'acide visible à l'UV et à l'iode (proton). Indexé CGE6 |
| Hex/ AcOEt 7,5 % | 203 -212 | D <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt 15 % | Cette série cristallise sous forme de cristaux blanc soluble à l'acétone pas visible à l'acide visible à l'UV et à l'iode. Indexé CGE7     |
|                  | 213-222  | D <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt 15 % | Cette série cristallise sous forme de cristaux blancs solubles à l'acétone pas visible à l'acide visible à l'UV et à l'iode. Indexé CGE8   |
|                  | 223-235  | D <sub>3</sub> | Hex/ AcOEt 15 % | Trainées + Taches bleu et jaune                                                                                                            |
|                  | 236-245  | D <sub>4</sub> | Hex/ AcOEt 17 % | Trainées + Taches bleu et jaune                                                                                                            |
|                  | 246-279  | D <sub>5</sub> | Hex/ AcOEt 17 % | Trainées + Taches bleu et jaune                                                                                                            |
|                  | 280-283  | D <sub>6</sub> | Hex/AcOEt 17 %  | Trainées + Taches bleu et jaune                                                                                                            |
| Hex/ AcOEt 10 %  | 284–313  | E <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt 20 % | Trainées                                                                                                                                   |
|                  | 314–321  | E <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt 21 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                             |

|                    |         |                |                    |                                                                                                                                              |
|--------------------|---------|----------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hex/ AcOEt<br>12 % | 322-348 | F <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>25 % | Cette série cristallise sous forme de poudre de couleur orange visible à l'iode, à l'acide et à la petite longueur d'onde indexé CGE 3       |
| Hex/ AcOEt<br>12 % | 349-369 | F <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt 25 %    | Cette série cristallise sous forme de poudre beige visible à l'iode, à l'acide et pas visible à l'UV. Ce composé est indexé CGE 10           |
| Hex/ AcOEt<br>12 % | 370-373 | F <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt<br>25 % | Cette série cristallise sous forme de cristaux de poudre Marron, soluble à l'acétone visible l'acide visible à l'UV et à l'iode. Indexé CGE5 |
| Hex/ AcOEt<br>15 % | 374-388 | G <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>30 % | Cette série cristallise sous forme de poudre blanche, soluble au chlorure méthanol visible l'acide visible à l'UV et à l'iode. Indexé CGE4   |
|                    | 389-413 | G <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>30 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                               |
|                    | 414-418 | G <sub>3</sub> |                    | Trainée et mélange de composés                                                                                                               |
| Hex/ AcOEt<br>20 % | 419-430 | H <sub>1</sub> | Hex/AcOEt<br>30 %  | Trainée et mélange de composés                                                                                                               |
|                    | 431-438 | H <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt 30 %    | Trainée et mélange de composés                                                                                                               |
|                    | 439-478 | H <sub>3</sub> | Hex/ AcOEt<br>35 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                               |
| Hex/ AcOEt<br>25%  | 479-483 | I <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>35 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                               |

|                                               |         |                |                    |                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------|---------|----------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                               | 484-503 | I <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt<br>35 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
| Hex/ AcOEt<br>30 %                            | 504-521 | J <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>35 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> pure          | 522-533 | K <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>40 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
|                                               | 534-541 | K <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt<br>40 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
|                                               | 542-561 | K <sub>3</sub> | Hex/ AcOEt<br>40 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
|                                               | 562-566 | K <sub>4</sub> | Hex/ AcOEt<br>50 % | Cette série cristallise sous forme de cristaux blanc soluble au CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> visible à l'acide pas visible à l'UV et à l'iode. Indexé CGE9 |
|                                               | 567-571 | K <sub>5</sub> |                    |                                                                                                                                                               |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2,5 %<br>MeOH | 572-587 | L <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>50 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
|                                               | 588-604 | L <sub>2</sub> | Hex/ AcOEt<br>50 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / MeOH<br>5 % | 605-612 | M <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>50 % | Trainée et mélange de composés                                                                                                                                |
| MeOH pure                                     | 610-616 | N <sub>1</sub> | Hex/ AcOEt<br>50 % | Trainée                                                                                                                                                       |

- **Traitement de la série B<sub>3</sub>**

Le contenu des flacons 152-153 contient une poudre jaune dans un mélange hexane/acétate d'éthyle (2,5 %), soluble dans l'acétone. Après filtration et essorage nous avons obtenu un produit indexé CGE1.

- **Traitement de la série F<sub>1</sub>**

Le contenu des flacons 374-388 contient une poudre blanche dans un mélange hexane/acétate d'éthyle (15 %), soluble dans l'acétone. Après filtration et essorage nous avons obtenu un produit indexé CGE3.

- **Traitement de la série F<sub>3</sub>**

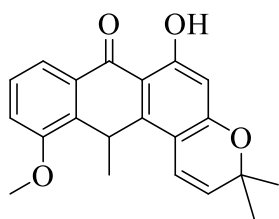
Le contenu des flacons 370-373 contient une poudre marronne dans un mélange hexane/acétate d'éthyle (12 %), soluble dans l'acétone. Après filtration et essorage nous avons obtenu un produit indexé CGE5.

- **Traitement de la série F<sub>2</sub>**

Le contenu des flacons 349-369 contient une poudre beige dans un mélange hexane/acétate d'éthyle (12 %), soluble dans l'acétone. Après filtration et essorage nous avons obtenu un produit indexé CGE10.

### III.5. Caractéristiques physico-chimiques des composés isolés

#### CGE1 ou Baiyumine-A



-Formule brute : C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N

-Aspect physique : poudre jaune

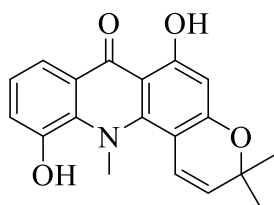
-Spectre UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm : 254 et 365

-Spectre de RMN <sup>1</sup>H (600MHz, Acétone-*d*<sub>6</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (150MHz, Acétone-*d*<sub>6</sub>)

-Test de Dragendorff et de Bouchardat : précipité jaunâtre et orange

-Test au chlorure ferrique : coloration bleue

### CGE4 ou 5- hydroxynoracridone



-Formule brute :  $C_{19}H_{17}O_4N$

-Aspect physique : poudre blanche

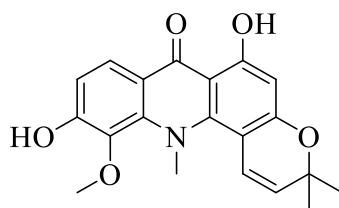
-Spectre UV  $\lambda_{max}$  nm : 254 et 365

-Spectre de RMN  $^1H$  (500MHz, Acétone-) et RMN  $^{13}C$  (125MHz, Acétone- $d_6$ )

-Test de Dragendorff et de Bouchardat : précipité jaunâtre et orange

-Test au chlorure ferrique : coloration bleue

### CGE5 ou Citracridone-I



-Formule brute :  $C_{20}H_{19}O_4N$

-Aspect physique : poudre marrone

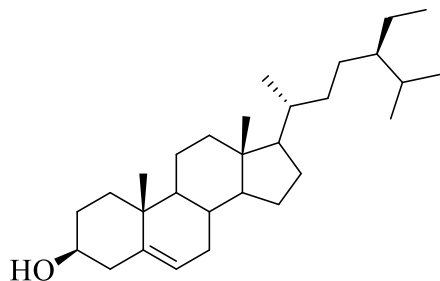
-Spectre UV  $\lambda_{max}$  nm : 254 et 365

-Spectre de RMN  $^1H$  (500MHz, Acétone-) et RMN  $^{13}C$  (125MHz, Acétone- $d_6$ )

-Test de Dragendorff et de Bouchardat : précipité jaunâtre et orange

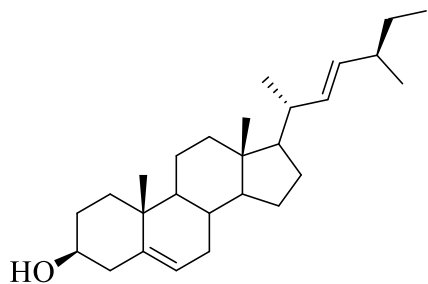
-Test au chlorure ferrique : coloration bleue

**CGE 2 ou mélange de  $\beta$ -Sitostérol et de Stigmasterole**



- Formule brute :  $C_{29}H_{50}O$

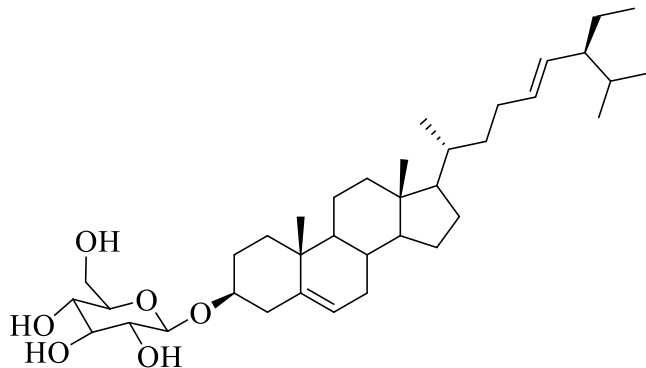
- Aspect physique : poudre blanc



- Formule brute :  $C_{29}H_{48}O$

- Aspect physique : poudre blanc

### CGE 9 ou glucoside de $\beta$ -sitostérol



Formule brute :  $C_{29}H_{50}O$

-Aspect physique : poudre blanc

### III.6. Tests caractéristiques des composés isolés

#### III.6.1. Test d'Erhlich

Dans un tube à essai, dissoudre le composé au chloroforme ; étaler une goutte de la solution obtenue sur une plaque de silice, vaporiser le réactif *N,N*-paradiméthylamino benzaldehyde (coloration jaune) puis chauffer la plaque pendant quelques minutes au four. L'apparition de la coloration rose indique la présence des limonoïdes.

#### III.6.2. Test de Dragendorff et de Bouchardat

Traitez 2 ml de solution éthanolique par HCl dilué, répartissez la solution dans 2 tubes à essai numérotés et enfin ajoutez respectivement deux (02) gouttes de réactif de Bouchardat (iodo-iodurée d'acide acétique :  $CH_2I CO_2H$ ) dans le tube n°1 et deux gouttes de réactif de Dragendorff (iodobismuthate de sodium ou de potassium) dans le tube n°2. L'apparition d'un précipité jaunâtre dans le tube n°1 et d'un précipité orange n°2 indique un test positif aux alcaloïdes.

### **III.6.3. Test au chlorure ferrique**

À une solution méthanolique de produit, ajouter quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique. La présence des groupe phénols se manifestent par le changement de coloration suite à la formation d'un l'ion complexe de couleur violette ou bleue.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Adjangba K.M., Feuell A.J., Barranco A., Johnson D., Salami M.L., (2008).** Chimie et propriétés pharmacologiques des extraits d'*Afraegie paniculata* (schum et thom) université du Benin (lome) et tropical products institute Gray'inn road, London WCI X 8LU, (England). 56-62.

**Amit R., Shailendre S., (2006).** Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biological and pharmaceutical bulletin* 29, 191-201.

**Angiosperm phylogeny Group (APG) (1998).** "An Ordinal classification From the Familles of the Flowering Plants". *Annals of Missouri Botanical Garden* 85, 531-553.

**Arbonnier M., (2000).** Arbres, Arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions QUAE. 470-471.

**Atangana F. A., Toze F. A., Langat M., Ngeufa H. E., Mbaze M. L., Mulholland D., Kamdem W. A., Sewald N., Wansi J. D., (2017).** Acridone alkaloids from *Vepris verdoorniana* (Excell & Mendonça) Mziray (Rosacea). *Phytochemical Letters* 19, 191-195.

**Babar A.M., Hahn E.J., Paek K.Y., (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 12, 607-621.

**Badiaga M., (2012).** Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante africaine récolté au Mali. Thèse de docteur d'Université de BAMAKO. 10-32.

**Baudoux D., (2008).** Un procédé, une définition. Lettre d'information de N.A.R.D... *Naturel Aromatherapy Research and Development*, 38, 3.

**Bardeau F., (2009).** Les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edition lanore. 315.

**Bayet C., Fazio C., Darbour O., Berger, Raad I., Chaboud A., Dumontet C., and Guilet D.,(2007).** Modulation of P-glucoprotein Activity by Acridones and Coumarins from *Citrus sinensis*. *Phytotherapy Research*. 21, 386-390.

**Bruneton, J., (1993).** Phytochimie et plantes médicinales; Paris, Pharmacognosie 2 édition, Techniques et documentation, Lavoisier. 200-274.

- Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, Phytochimimie, Plantes médicinales. 3ème Edition. Paris.
- Bruneton J., (2016):** Tec & Doc Lavoisier; 5<sup>e</sup> Édition. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 719–722.
- Champagne D. E., Koul O., Isman B.M., Scudder G.E., Towers N.G., (1992).** Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31, 377-394.
- Celia F.R., Maria E.R., Mariana H., (2019).** Candida sp.infections in patients with diabetes mellitus. *Journal of clinical Medicine*. 8, 76
- Chavanne P., (2011):** 200 remèdes au citron. Editions First Grund, Paris. 255.
- Chau C.F., Huang Y.L., and Lin C.Y., (2004).** Investigation of the cholesterol-lowering action of insoluble fibre derived from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. *Food Chemistry* 87, 361-366.
- Connolly J., Labbé C., Rycroft D., Okorie D., Taylor D., (1979).** Tetranortriterpenoids from *Trichilia prieuriana* and *Guarea thompsonii* and the hydrolysis products of Dregeanin, prieurianin and related compounds. *Journal of Chemical Research* 8, 256-257.
- Croquist A., (1988).** “The Evolution and Classification of Flowering Plants” The New York Botanical Garden, New York, édition. 2.
- Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M., (2004).** Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry* 84, 99-105.
- Economos and Clay, (1998).** Nutritional and health benefits of *Citrus* fruits. Paper presented at the Twelfth Session of the Intergovernmental Group on *Citrus* Fruit.
- FAO (2001).** La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture. Rome.
- Faucon M., (2015).** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, 39-455.

**Fernandez-Lopez J., Fernandez-Gines J.M., Aleson-Carbonell., Sendra E., Sayas-Barbera E., Pérez-Alvarez J.A., (2004).** Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology* 15, 176-185.

**Fomani M., Happi N.E., Poree F.H., Lallemand M.C., Kamdem A.F., Wansi J., (2015).** A prenylated acridone alkaloid and ferulate xanthone from barks of *Citrus medica* (Rutaceae). *Zeitschrift für Naturforsch B* 70, 71–75.

**Ghedira K., (2005).** Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4 162-169.

**Havsteen B.H., (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and therapeutics* 96, 67-202.

**Hawthorne S.B., Grabanski C.B., Martin E., Miller D.J., (2000).** Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography* 892, 421-433.

**Heywood V.H., (1996).** « Les plantes à fleurs ». Editions Nathan, Paris, 202.

**Janati F.S., Beheshti R.H., Feizy J., Fahin K.N., (2012).** Chemical composition of lemon and peels its considerations as animal food. *Food industrial technology and biotechnology park* 37, 267-271.

**Jayaprakasha G.K., Basavaray G., Bhimanagoud S.P., (2008).** Radical scavenging activities of Rio Red grape fruits and sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *bioresource technology* 99, 4484-4494.

**Jardin! L'Encyclopédie** par la Société des Gens de Lettres

**Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P., (2002).** Des hommes et des plantes, in histoire de la pharmacie, <http://www.ordre.pharmacien.fr>.

**Kuate J., Bella-Manga D.F., Kouodiekong L., Ndindeng S.A., David O., Parrot L., (2006).** Enquête dianostic sur les fruitiers dans les exploitations familiales agricoles en zone humide du Cameroun. *Fruits* 61, 373-387.

**Khalil A., Maatooq G., Khalid S., (2003).** Limonoids from *Citrus*. *Zeitschrift fur Naturforschung* 58c, 165-170.

**Kipassa N., Iwagawa T., Okamura H., Doe M., Morimoto Y., Nakatani M., (2008).** Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*. *Journal of Phytochemistry* 69, 1782.

**Letouzey (1963).** Rutaceae, Zygophyllaceae, Balanitaceae. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, (Flore du Cameroun ; 1) 173.

**Lewis, Elvin-Lewis, (1977).** Medical Botany: plant affecting Man's Health, John Willey and Sons; New York, 226-270.

**Li S., Pan M.H., Lo C.Y., Tan D., Wang Y., Shahidi F., Ho C.T., (2009).** Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *Journal of functional Foods* 1, 2-12.

**Lohrasbi M., Pourbafrani M., Niklasson C., Taherzadeh M.J., (2010).** Process design and economic analysis of a *citrus* waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource Technology* 101, 7382-7388.

**Hubertine M.E., Salmun S.A., Junyan L., Zhenbo X., Brian M.P., (2020).** Vulvovaginal candidiasis: A current understanding and Burning question. *Journal of Fungi*. 6, 27

**Mulholland D., Taylor D., (1980).** Limonoids from the seed of the Natal Mahogany, *Trichilia dregeana*. *Journal of Phytochemistry* 19, 2421–2425.

**Mulholland D. A., Parel B., Coombes P., (2000).** The Chemistry of the Meliaceae and ptaerixlaceae of the Southern and Eastern Africa and Madagascar. *Current Organic Chemistry* 4, 1011-1054.

**Nakagawa H., Duan H., and Yoshihisa T., (2001).** Limonoids from *Citrus sudachi*. *Journal of Chemical Pharmacology Bulletin* 49, 649-651.

**Newman D.J., Cragg G.M., (2016).** Natural Products as sources of New Drug from 1981 to 2014. *Journal of Natural products*. 79, 629-662.

- Ngnokam D., Massiot., Bliard C., Tsamo E., (1995).** Sapelenin D, a new acyclic triterpenoid from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*. *Journal of Natural Products Letters* 5, 289–293.
- Ndo E., (2007).** Analyse du risque épidémiologique des populations d'agrumes vis-à-vis de la cercosporiose, du scab et de la gommose dans les zones humides du Cameroun. 37-41.
- Ndo E., (2011).** Evaluation des facteurs de risque épidémiologique de la phaeoramulariose des agrumes dans les zones humides du Cameroun. Ecole Doctorale, 37-40.
- Okwn D.E., (2006).** I.N. Emenike, Evaluation of the phytonutrients and vitamins contents of Citrus fruits. *International journal of Molecular Medecine and Advance Sciences* 2, 1-6.
- Ollitrault F., Terol J., Pina A.J., Navarro L., Talon M., Ollitrault P., (2010).** Development of SSR markers from *Citrus Clementina* (Rutaceae) BAC and sequences, and interspecific trasferability in *Citrus*. *American journal of botany*, 97, 124-129.
- Ozaki Y., Fong C.H., Zareb H., Hisao M., Masaki Miya., Yasushi Ifuku., Shin Hasegawa., (1991).** Limonoid glucosides in citrus seeds. *Agricultural and biological chemistry* 55, 137-141.
- Pesson P., Louveau J., (1984).** Pollinisation et production végétale. Edition. INRA. Paris. 637.
- Poulose, S.M., Jayaprakasha, G.K., Mayer, R.T., Girennavar, B., Patil, B.S., (2007).** Purification of *citrus* limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes. *Journal of Science Food Agriculture* 87, 1699–1709.
- Ramful D., Bahorunb T., Bourdonc E., Tarnusc E., Aruoma O.I., (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian 30 citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* 278, 75-87.
- Santos R. M., Fortes G. A., Ferri P. H., Santos S. C., (2011).** Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*; Rev. Bras. *Farmacognosia de Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 581-586.
- Schijlen E. G., Ric de Vos C. H., Van Tunen A. J., Bovy A. G., (2004).** Modification of flavoids biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65, 2631-2648.

- Shohaib T., Shafique M., Dhanya N., Madhu C.D., (2011).** Importance of flavonoides in therapeutics. *Hygeia Journal for Drugs and Medicines* 3, 1-18.
- Siddiqui S., Siddiqui B.S., Faizi B. S., Mahmood T., (1988).** Tetracyclic triterpenoids and their derivatives from *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products* 51, 30-43.
- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E., (Eds). (1996).** Horticultural classification of cultivated *Citrus*. In *Biology of citrus*. Edition: Cambridge university press, 19-44.
- Swingle W.T., Reece, P.C., (1967).** The botany of *Citrus* and its wild relatives. In W.Reuther, L.D.Batchelor H.J. Webber (Eds). *The citrus industry* 1, 130-190.
- Tanaka T., (1961).** Citrologia: semi centennial commemoration papers on *Citrus* studies. Osaka Japan. 191-201
- Takashi K., Yasuaki U., Yoshino H., Chika F., Takako F., Takeshi Y., Reiko T., (2017).** Five New Limonoids from Peels of Satsuma Orange from *Citrus reticulata*. *Molecular* 22, 907.
- Temple., (1999).** Les marches des fruits et légumes au Cameroun. Quantification des flux-Analyse des prix. 163
- Temple., (2001).** Quantification des productions et des échanges de fruits et légumes au Cameroun. *Cahier Agriculture* 10, 87-94.
- Tian Q., Miller E.G., Ahmad H., Tang L., Patil B.S., (2001).** Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer* 40, 180 184.
- Tian Wu., (1986).** Baiyumine-A and -B, Two Acridone Alkaloids from *Citrus grandis*. *Phytochemistry*. 26. N°.3. 871-872.
- Valnet J., (2001).** La santé par les fruits, legumes et les cereals. Edition Vigot. 207-281.
- Wansi J.D., Wandji J., Mbaze M.L., Kamdem W. A., Ranjit R., Khan N.S., Asma A., Iqbal M.C., Lallemand M-C., Tillequin F., Fomum Z.T., (2006).**  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antioxidant acridone alkaloids from the stem bark of *Oriciopsis glaberrima* Engl. (Rutaceae). *Journal of Chemical Pharmacology Bulletin* 54, 292-296.

**Wang X., Chen Q., Lu X., (2014).** Pectin extracted from apple pomace and *citrus* peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids* 38, 129-137.

**Wen-Yun T., Yu-Ling H., Chien-Chang S., Ray-Ling H., Ren-Shih et Chien-Chih C., (2005).** Acridone Alkaloids from the stem Bark of *Citrus maxima*. *Journal of the Chinese chemical society*, 52, 1253-1255.

**Westphal., Embrechts., Ferweda., van-Gils-Meeus., Mutsaers., Wesphal-Stevels., (1985).** Cultures vivrières tropicales avec référence spéciale au Cameroun. Wageningen, Netherlands. 20-41

**WHO 1996.** Guideline for the assessment of herbal medicines. WHO expert committee on specification for pharmaceutical preparation. Technical report series 9, 97-118.

**Wichtl M., Anton., (2003).** Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2<sup>e</sup> édition, Paris Cachan, Edition. *Technique et Documentation*. 692.

**Wu T.S., Kuoh C.S., Furukawa H., (1983).** Acridone alkaloids. VI. The constituents of *Citrus depressa*. Isolation and structure elucidation of new acridone alkaloids from *Citrus* genus. *Journal of Chemical Pharmacology Bulletin* 31, 895-900.

**Xi, W., Fang B., Zhao Q., Jiao B., Zhou Z., (2014).** Flavanoid composition and Antioxidant Activities of Chinese local pummel (*citrus grandis* osbeck) Varieties. *Food Chemistry* 161, 230-8.