

## ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DE L'EXTRAIT TOTAL ET DES FRACTIONS DE JUS DE FRUIT DE CITRUS MEDICA LIN. (RUTACEAE)

Kuete, V <sup>a\*</sup>, Penlap Beng V <sup>a</sup>, Etoa, F-X <sup>a</sup>, Modjo, S.L <sup>a</sup>, Bogne, P <sup>a</sup>, Assob, J. C <sup>a</sup>, Lontsi, D <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, BP812 Yaoundé-Cameroun

<sup>b</sup> Département de chimie organique, Université de Yaoundé I, Faculté des Sciences, BP812 Yaoundé-

\* Auteur correspondant : Victor KUETE; Tel: (237) 7355927; Fax: (237) 2319334 kuetevictor@yahoo.fr

### RESUME

Dans cette étude, nous avons évalué les propriétés antimicrobiennes de l'extrait total du jus de fruit de *Citrus medica* (Rutaceae) et de ses fractions sur 22 souches microbiennes associées à plusieurs pathologies humaines. L'extrait total et les fractions utilisées ont également subi une étude phytochimique préliminaire. La toxicité aiguë de l'extrait total a enfin été évaluée. L'évaluation des propriétés antimicrobiennes a été faite par la méthode de diffusion par puit sur gélose pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition et par la méthode de dilution en milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Au terme des tests antimicrobiens, nous avons constaté que cet extrait possède une très forte activité avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 6 à 27 mm. Ceux des fractions variaient entre 6 et 32 mm. Les diamètres maximaux de 27 mm pour Cmb et Cmb2 sur *Neisseria gonorrhoeae*, Cmb2 sur *Staphylococcus aureus*, Cmb3 sur *Morganella morganii*, 29 mm pour Cmb4 et 32 mm pour Cmb2 sur *Proteus vulgaris* ont été observés. Les CMI de l'extrait total variaient entre 12,5 et 25 µg/ml. Les fractions exerçant les effets antimicrobiens les plus importants ont donné les CMI variant entre 3,12 et 25 µg/ml. L'extrait total et les fractions se sont révélés sans effet inhibiteur sur la croissance de *Candida albicans* et *Candida krusei* (levures) bien qu'une forte activité ait été observée sur *Trichophyton rubrum*, un champignon filamenteux. L'analyse phytochimique de l'extrait et des fractions a montré la présence des groupes de composés biologiquement actifs parmi lesquels les flavonoïdes, les phénols et polyphénols, des glycosides et des stéroïdes, ces composés étant différemment distribués dans les fractions. L'étude de la toxicité aiguë réalisée suivant le protocole standard de l'OMS a indiqué que *C. medica* pouvait être classé parmi les composés faiblement toxiques, avec une DL<sub>50</sub> de 16 g/kg de poids corporel des rats de souche Wistar. Cette étude a montré que l'extrait total de *C. medica* peut être utilisé dans le traitement des maladies infectieuses.

**MOTS CLE :** *Citrus medica*; Activité antimicrobienne; Toxicité aiguë

### ABSTRACT

In this study, we have evaluated the antimicrobial activity of the total extract and fractions from the juice of the fruits of *Citrus medica* (Rutaceae) on 22 microbial strains associated to several human diseases. The preliminary phytochemical study was also investigated on both total extract and fractions. Finally the acute toxicity if this total extract was also assayed. Antimicrobial study was realised following the agar hole diffusion method and liquid dilution method for the determination of the inhibition zones and the minimal inhibition concentration (MIC) respectively. The results showed that the total extract was very active with the inhibition zones obtained varying from 6 to 27 mm. The fractions gave the inhibition zone ranged from 6 to 32 mm. The highest inhibition zones of 27 mm for Cmb and Cmb2 against *Neisseria gonorrhoeae*, Cmb2 against *Staphylococcus aureus*, Cmb3 on *Morganella morganii*, 29 mm for Cmb4 and 32 mm for Cmb2 against *Proteus vulgaris* were observed. The MIC of the total extract varied from 12.5 to 25 µg/ml. The most active fractions exhibited MICs varying from 3.12 to 25 µg/ml. Fractions and total extract didn't inhibited the growth of the yeast strains used (*Candida albicans* and *Candida krusei*), though a significant antifungal activity was noted against *Trichophyton rubrum*, a filamentous fungus. Phytochemical analysis of the total extract and fraction showed the presence of biologically active compounds groups such as flavonoïds, phénols and polyphénols, glycosides and stéroïds. These compounds were differently distributed in the fractions. Acute toxicity study realised according to the WHO experimental procedure indicated that *C. medica* was fairly toxic with the medium lethal dose (LD50 of 16 g/kg body weight on the Wistar strain rats. This study suggested that the total extract of *C. medica* can be used in the treatment of infectious diseases.

**KEY WORDS:** *Citrus medica*; antimicrobial activity; acute toxicity

## 1. Introduction

*Citrus medica* (Rutaceae) ou le citronnier est un petit arbuste à jeunes rameaux anguleux devenant cylindriques par la suite. Les feuilles alternées sont unifoliées, ordinairement minces, non coriaces avec quelques nervures latérales. Les fleurs sont à l'angle des feuilles, solitaires et disposées en bref corymbiforme. Le fruit est basiforme, globuleux, ellipsoïde, plurilobulaire dont les quartiers contiennent les grains ou les pépins près à leur angle interne (Bois, 1934). Ces fruits, riches en vitamines C, flavonoïdes, acides et pétroles volatiles et contiennent également les coumarines (Sauer, 1993) et connaissent plusieurs usages traditionnels.

Le jus de fruit mur est utilisé par les tradipraticiens et herboristes à l'Ouest du Cameroun, parfois mélangé ou non au décocté de *Piper umbellatum*, dans le traitement des infections génitales d'origine vénérienne (Megne, 1998). Au Sénégal et en Sierra Léone, le jus de fruit est utilisé comme vermifuge tandis que l'on attribue à la décoction des écorces du tronc une activité antigonococcique et antidyentérique (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962). Kuete et al. (2002) a montré que le jus de fruit de cette plante était bactéricide vis à vis de quelques souches bactériennes responsables d'infection urogénitales. Au Madagascar, la plante est utilisée dans le traitement des bronchites, du rhume de cerveau, de la splénomégalie et comme tonifiant (Peret et Meyer, 1957). A l'instar de la plupart des Rutacées du genre *Citrus*, l'huile essentielle de *C. medica* est utilisée comme arôme en para pharmacie, les industries agroalimentaires et en parfumerie (Bruneton, 1999).

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antimicrobienne de l'extrait total du jus de fruit de cette plante et de ces fractions sur une large gamme de bactéries et champignons impliqués dans diverses infections chez l'homme. Une étude de la toxicité aiguë de cette plante a également été faite.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Matériel végétal, extraction et fractionnement

Les fruits de *Citrus medica* ont été collectés en février 2001 dans le village de Bamenkombo (Mbouda) dans la province de l'Ouest du Cameroun. Ces fruits, de même que les feuilles, les écorces et la photographie complète de la plante ont ensuite été identifiés à l'Herbier National du Cameroun par M. Koufani Analectus. L'extrait aqueux a été obtenu par pressage des fruits mures, puis le jus obtenu a été filtré et concentré à 56°C dans un incubateur jusqu'à séchage complet. L'extrait total ainsi obtenu avec un rendement de 2 % par rapport aux fruits entiers a été conservé à température ambiante du laboratoire pour différents usages.

Pour le fractionnement, Cent grammes (100g) d'extrait total sont préalablement épuisés au méthanol et deux fractions CMFa (précipité) et CMFb (Surnageant) sont obtenues. Après les essais microbiologiques, la fraction CMFb est retenue pour la suite de la purification et est de ce fait fractionnée par chromatographie flash sur colonne de silice 60 (0,063- 0,200 mm) en utilisant un gradient hexane- acétate d'éthyle (hex-AE) et acétate d'éthyle-méthanol (AE-MeOH). Les fractions de 500ml chacune sont collectées et évaporées au rotavapor (Büchi rotavapor R-114), puis regroupées sur la base de la Chromatographie (CCM analytique) en 8 nouvelles fractions dénommées CMF 1 à 8 (tableau 1). Ces fractions sont ensuite conservées pour les tests d'activités.

### 2.2. Analyses phytochimiques qualitatives des extraits et fractions

Les principaux groupes de substances antimicrobiennes ont été recherchés dans l'extrait total et les fractions par les méthodes phytochimiques décrites par Harbone (1973) pour les alcaloïdes, flavonoïdes, stéroïdes, phénols, polyphénols, coumarines, saponines, tanins et les anthraquinones.

### 2.3. Souches microbiennes

Les microorganismes utilisés dans ce travail sont des souches aérobies constituées de deux levures (*Candida albicans* et *Candida krusei*), un champignon filamenteux (*Trichophyton rubrum*), 18 bactéries aérobies ou aérobies facultatives (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* et une souche de bactérie anaérobie (*Neisseria gonorrhoeae*). *T. rubrum* et *C. krusei* nous ont été fournis par le Laboratoire de mycologie du CHU-Yaoundé, 3 espèces de *Bacillus* par l'institut Appert de Paris, *Bacillus cereus* par le A.F.R.C Reading Laboratory

de Grande Bretagne. Les autres souches ont été fournies par le Centre Pasteur du Cameroun. Ces souches ont été manipulées dans le Laboratoire de Microbiologie Appliquée et Pharmacologie Moléculaire de l'Université de Yaoundé I. Elles ont été conservées puis activées sur les milieux Sabouraud Glucose Agar (SGA) (Champignons) ou sur Gélose Nutritive (GN) (bactéries aérobie excepté les *Bacillus*) ou sur gélose Mueller Hinton supplémentée de 5% de sang de mouton et 1% de polyvitex (MHAPS) pour *N. gonorrhoeae*. Les 4 espèces de *Bacillus* ont été activées sur la Gélose Glucosée au pourpre de Bromocrésol. Les milieux Mueller Hinton Agar (MHA) et MHAPS ont été utilisés pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition tandis que le Bouillon Nutritif (BN) (bactéries) et le Bouillon Glucosé de Sabouraud (BGS) ont été utilisés pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices.

#### **2.4. Animaux d'expérience**

Les animaux expérimentaux sont constitués des rats albinos de souches Wistar disponible dans notre animalerie. Ils recevaient quotidiennement une alimentation de composition standard et de l'eau de robinet à volonté.

#### **2.5. Détection des activités antimicrobiennes**

##### **2.5.1. Détermination des diamètres des zones d'inhibition**

La méthode utilisée est celle de diffusion par puits sur gélose telle que décrite par Berghe et Vlietinck (1991). Le milieu MHA ou MHAPS (*N. gonorrhoeae*) est coulé sur boîte de pétri à une épaisseur de 8 mm. Après inoculation par inondation d'une dilution adéquate (environ  $10^6$  UFC/ml) du microorganisme à tester réalisée suivant une échelle de Mac Farland, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés de manière concentrique sur les milieux puis, 150  $\mu$ l d'une concentration de 10 mg/ml pour l'extrait total et 2 mg/ml (dans l'eau distillée) pour les fractions sont introduits dans chaque puits. Une solution de gentamicine (Bactéries) ou de nystatine (Champignons) (à 2 mg/ml) utilisée comme antibiotique de référence est introduite dans le puits central. Après une pré-diffusion de 45 minutes à température ambiante sous la hôte, les souches sont incubées à 37°C (bactéries et levures) ou à température ambiante (*T. rubrum*), pendant 24 heures au terme desquelles les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Pour créer les conditions d'anérobioses adéquate pour la croissance de *N. gonorrhoeae*, cette souche est incubé dans une cuve contenant une bougie allumée tant pour l'activation que pour les test antimicrobiens. Les essais sont répétés 2 fois et les résultats enregistrés comme diamètre moyen de ces deux expériences.

##### **2.5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices**

La méthode de dilution en milieu liquide telle que décrite par Mims *et al.* (1993) a été combinée à celle de Delaras (1998) avec quelques modifications pour la détermination des CMI des échantillons testés

Ainsi, les différents échantillons sont préalablement dissouts dans l'eau distillées stérile. Ensuite, une série géométrique de dilution de raison 2 de premier terme 1.0625  $\mu$ g/ml pour l'extrait total et les fractions est réalisée dans le bouillon nutritif supplémenté de 10% de glucose et du rouge phénol placé dans les tubes à essai (pour les bactéries aérobies) ou le bouillon de Sabouraud au rouge phénol (pour les champignons). Puis, une suspension du microorganisme à tester (d'environ  $10^6$  UFC/ml) est introduite dans les tubes. Après une incubation de 24 heures à 37°C, la CMI est enregistrée comme la plus petite dilution dans laquelle aucune croissance macroscopique n'est observée, ceci étant caractérisé par l'absence de la décoloration du milieu de culture due à l'acidification causée par le catabolisme microbien du glucose. Pour *N. gonorrhoeae*, la CMI est déterminée par la technique de diffusion sur gélose des séries de dilutions de chaque échantillon telle que décrite pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition.

#### **2.6. Toxicité aiguë de l'extrait total**

Cette étude est effectuée sur des rats mâles et femelles de cinq semaines, de poids compris entre 90-100g d'après le protocole de l'OMS (WHO, 1992). Ainsi, les lots de 8 rats chacun (comprenant 4 mâles et 4 femelles) reçoivent par gavage unique, après 15 heures de jeun, des doses croissantes d'extrait de *C. medica* (0, 4, 8, 12, 16 et 20 g/kg de poids corporel). Les animaux du lot témoin (0 g/kg de poids corporel) ne reçoivent que de l'eau distillée. Pendant la première phase d'observation de 48 heures post- traitement, le nombre de morts est

noté dans les différents groupes, de même que le comportement des animaux (locomotion, sensibilité au toucher et au son, agressivité après pincement de la peau et aspect des fèces etc. ).

Au terme des 48 heures d'observation, les survivants sont gardés pendant 5 jours au terme de desquelles ils sont sacrifiés par dislocation cervicale. Le sang est recueilli est conservé, puis centrifugé à 3000 trs/mn pendant 15 minutes. Le sérum obtenu est conservé à -20°C pour les analyses de quelques paramètres biochimiques : Phosphatase Alcaline (PAL), Aspartate aminotransférase (ASAT), Alanine aminotransférase (ALAT), la glycémie, le cholestérol sérique, les protéines sérique par les méthodes spectrophotométriques standards (Cheesbrough, 1991).

### 3. Résultats

Le tableau 2 indique la présence dans l'extrait brut des fruits de *C. medica* de plusieurs groupes de composés chimiques parmi lesquels les flavonoïdes, les phénols et polyphénols, des glycosides et des stéroïdes et l'absence d'autres comme les saponines, les coumarines, les alcaloïdes, les tanins et les anthraquinones. Ces composés sont différemment répartis dans les fractions et varient de l'abondance à l'absence totale. C'est ainsi que la fraction Cmb1 et Cmb2 contiennent essentiellement flavonoïdes et les stéroïdes, Cmb3, Cmb4, Cmb5 et Cmb6 contiennent les flavonoïdes, les stéroïdes, les phénols, les polyphénols et les Glycosides, Cmb7 et Cmb8 contiennent les stéroïdes, les phénols, les polyphénols et les Glycosides.

Le tableau 3 montre que l'extrait total des fruits de *C. medica* exerce une activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes testées avec les diamètres des zones d'inhibition variant entre 8 mm sur *C. freundii* à 27 mm sur *P. vulgaris*. Aucune activité n'est par ailleurs notée sur les deux souches de levure testée tandis *T. rubrum* reste bien sensible à cet extrait avec un diamètre de 16 mm. La fraction Cma est inactive tandis que Cmb possède le même spectre d'action que l'extrait total. Au terme du fractionnement de Cmb, on aboutit également aux fractions très actives telles que Cmb2, Cmb3 et Cmb4 qui ont elles aussi le même spectre d'action que la fraction mère. Bien plus, des diamètres des zones d'inhibition plus grands que ceux de leur fraction mère sont obtenues ; c'est ainsi que le diamètre maximale de 32 mm est Cmb2 sur *P. vulgaris*. Les autres fractions telles que Cmb6, Cmb7 et Cmb8 ont un spectre d'activité moins important. Relevons également que toutes ces fractions n'exercent pas d'effet anticandidale. L'extrait total de même que plusieurs fractions possèdent des diamètres des zones d'inhibition supérieurs à ceux obtenus avec la gentamicine sur les différentes souches microbiennes.

Le tableau 4 montre que les CMI de l'extrait total sur les souches testées varient généralement de 12,5 µg/ml sur *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* et *S. aureus* à 25 µg/ml. Ces valeurs sont 1 à 2 fois plus grande que celles des antibiotiques de référence. Ce tableau montre également une augmentation de l'activité des fractions issues du dégrossissement sur plusieurs agents pathogènes, avec les valeurs des CMI de 3,12 µg/ml observées avec Cmb2 et Cmb4 sur *P. vulgaris*. Plusieurs fractions ont des CMI inférieures à celles des antibiotiques de référence, indiquant ainsi un degré d'activité plus élevé.

Les animaux traités avec l'extrait total aux doses de 0 à 8 g/kg n'ont présenté aucune déviation de leur comportement après traitement et durant les 7 jours d'observation. A 12 g/kg on note dès la première heure, une diminution de la sensibilité aux bruits, de la locomotion, une inoffensivité et une augmentation du rythme cardiaque. Cependant, aucune mortalité des animaux n'est constatée et le comportement redevient normal après 24 heures. A 16 g/kg, ces signes d'intoxication sont suivis d'une diarrhée abondante et 50% animaux succombent au bout de 2 heures. Ce nombre est maintenu pendant les 7 jours d'observation. La diarrhée est plus abondante à 20 g/kg et 100% d'animaux meurent dans les 2 heures qui suivent le traitement. La dose létale médiane calculée d'après la formule de Behrens et Karber (1983) a été de DL<sub>50</sub> de 16 g/kg.

Le tableau 5 montre qu'aucun paramètre de toxicité dosé ne varie de manière significative par rapport aux témoins pour les rats traités à la dose de 4 g/kg. A partir de 8 g/kg et à 12 g/kg, on note une variation significative ( $P > 0,05$  ; ANOVA) des taux de PAL, d'ALAT et de la glycémie. A la dose de 16 g/kg, on note en plus de ces paramètres une variation significative du taux de cholestérol sérique. Les taux de variation de ces différents paramètres varient de 0,73% ( $1,36 \pm 0,97$  contre  $1,36 \pm 0,97$  g/l) pour la glycémie des rats traités à la dose de 4 g/kg et les témoins et 91,24 % ( $0,12 \pm 0,008$  contre  $1,37 \pm 0,14$  g/l) toujours pour la glycémie des rats traités à la dose de 12 g/kg et les témoins.

### 4. Discussion

Au terme de l'analyse phytochimique de l'extrait total, plusieurs groupes de composés chimiques tels que les flavonoïdes, les phénols et polyphénols, des glycosides et des stéroïdes ont été détectés. L'activité

antimicrobienne de plusieurs molécules appartenant à ces différents groupes a par ailleurs déjà été signalée par plusieurs auteurs (Bruneton, 1999 ; Cowan, 1999). La présence de plusieurs de ces groupes chimiques à l'instar des stéroïdes et des flavonoïdes est en accord avec les travaux effectués par Govindachari *et al.* (2000) qui ont isolés entre autres des triterpénoïdes à effets antifongiques dans cette plante. D'autres composés constituant d'huiles essentielles tels que les limonènes, le citral, le citronellol, l'isopulegol, le linalol, le géraniol, le terpineol, les terpinènes et bien d'autres ont également été identifiés dans le jus de fruit de *C. medica* (Capello *et al.*, 1982 ; Singh *et al.*, 1999).

Ces différents composés pourraient expliquer la forte activité antibactérienne observée au cours de cette étude. Les résultats obtenus corroborent les travaux de Mose *et al.* (1957) qui ont montré que les huiles essentielles issues du jus de fruit de *C. medica* possédaient des activités bactériostatiques et bactéricides vis à vis de nombreuses souches bactériennes. Dans cette étude, nous avons noté que ces activités augmentent ou diminuent avec le dégrossissement, probablement due à la distribution relative des principes actifs dans les fractions obtenues. Nous avons également noté que l'extrait total et les fractions n'exerçaient pas d'effet inhibiteur sur la croissance de *C. albicans* et *C. krusei* qui sont des levures contrairement à *T. rubrum* (un champignon filamenteux). L'absence d'effet sur les levures s'expliquerait par le fait que les levures sont acido-résistantes contrairement aux champignons filamenteux et que l'effet antifongique de cet extrait est généralement exercé par les molécules acides comme l'acide nomilinique (Sleigh et Timburry, 1998 ; Govindachari *et al.*, 2000). En effet, l'activité de cet extrait a également été démontré sur *Puccinia arachidis*, un champignon filamenteux, pathogène des arachides (Govindachari *et al.*, 2000).

Si plusieurs études antérieures ont déjà permis de clarifier l'activité antimicrobienne de cette plante, peu de données scientifiques sont disponibles pour ce qui est de sa toxicité. Dans ce travail, nous avons noté que cet extrait présentait une DL<sub>50</sub> de 16 g/kg de poids corporels chez les rats, ce qui permet de le classer d'après les critères de l'OMS (WHO, 1992) parmi les composés faiblement toxiques. Par ailleurs, la mort des animaux à forte doses permet de noter qu'il n'est pas sans danger pour l'organisme. L'investigation des paramètres de toxicité aiguë permet de mieux comprendre son mode d'action. Les modifications importantes de l'ALAT observées à partir de 8 g/kg indiqueraient que l'extrait total est susceptible d'engendrer des dommages hépatiques à fortes doses ; il pourrait également causer une obstruction des voies biliaires telle que le témoigne l'évolution des taux de PAL entre les animaux témoins et les traités à partir de la dose de 8 g/kg (Cheesbrough, 1991). Bien plus, cet extrait consommé à forte doses pourrait engendrer une forte hypoglycémie comme le montre la diminution spectaculaire de ce paramètre à partir de 8 g/kg (Cheesbrough, 1991). Ces informations nous permettent de comprendre que l'extrait total de *C. medica* exerce son action toxique essentiellement en provoquant une hypoglycémie, une obstruction des voies biliaires et des dommages au niveau des hépatocytes.

Cette étude a montré que l'extrait total du jus de *C. medica* possède un important pouvoir thérapeutique, mais il doit être consommé avec modération en ayant à l'esprit qu'il est susceptible d'engendrer des dommages hépatiques et une forte hypoglycémie.

## Remerciement

Les auteurs remercient sincèrement le Centre Pasteur du Cameroun, le CHU de Yaoundé, le Centre Appert de Paris, France, le *A.F.R.C Reading Laboratory* de Grande Bretagne pour leur appui technique dans ce travail.

## Références

- BEHRENS, B. and KARBER, G. (1983). Mathematics for Naturalists and Agriculturalist. PWN, Warszawa, 212p.
- BERGHE, V. A. and VLIETINCK, A. J. (1991). Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry* 6 : 47-68.
- BOIS, B. (1934). Plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges. Histoire, utilisation, culture. Plantes à épices, aromates, condiments. Vol. 2. Ed. Paul Chevalier, Paris, 298 p
- BRUNETON, J. (1999). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc. Paris, 3<sup>ème</sup> ed., 1120p.
- CAPELLO, C., CALVARANO, M., DI, A., GIOFFRE, D. (1982). *Citrus medica* essential oil. *Essenze, Derivati Agrumari* 52(1) ; 59-66.
- CHEESBROUGH, M. (1991). Medical Laboratory Manual Countries. Low Price edition, vol 2, 479 p.
- COWAN, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology review* 12 (4): 564-582.
- DELARAS, C. (1998). Microbiologie : 90 heures de travaux pratiques. Gaétan Morin, Paris, pp 169-191.
- GOVINDACHARI, T. R., SURESH, G., GOPALAKRISHNAN, G., MASILAMANI, S., BAUNUMATHI, B.

- (2000). Antifungal activity of some tetraterpenoidss. *Fitoterapia* 71 (3): 317-320.
- KUETE, V., ASSOBA, J.C., PENLAP BENG, V., ETOA, F-X., TCHOUNGUEP MBIAPO, F. (2002) Activités antimicrobiennes de quelques plantes de la pharmacopée camerounaise sur certains agents à infections urogénitales. Biosciences. Proceeding 9
- MEGNE, B. C. (1998). Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun : Inventaire de quelques plantes utilisées dans le traitement des MST dans la région de Dschang (Ouest-Cameroun). Mémoire de Maîtrise de Biologie Végétale, Université de Dschang, 51 p.
- MIMS, C.A., PLAYFAIR, J. H. L., ROITT, I.M., WAKELIN, D. and WILLIAMS, R. (1993). Antimicrobials and Chemotherapy In: Mims et al. (Eds) Medical Microbiology., St Louis, 35.1-35.34
- MOSE, J. R., LUKAS, G. (1957). Antibacterial action of some ethereal oils and their components. *Arzneimittel-Forschung* 7: 687-692
- PERET, R ET MEYER, G. (1957). Pharmacopée du Madagascar. Publication de l'institut de la recherche scientifique. Tannanarive, 85p.
- SLEIGH, D. J. and TIMBURY, M. C. (1998). Note on medical Bacteriology. 5<sup>th</sup> edition Churchill Livingstone. 482 p.
- SINGH, G., KAPOOR, I. P. S., SINGH, O. P., LECLERG, P. A. and KLINKBY, N. (1999). Analysis of chemical constituents of *Citrus medica* oils. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin* 2: 7-10.
- WATT, J. M. and BREYER-BRANDWIJK, M. G. (1962). Medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2<sup>nd</sup> ed. E & S. Livingstone, pp 676-678, 758, 989-1008.
- WHO. (1992). Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. WHO regional office for Western Pacific, Manila, Phillipine, 38p.

Tableau 1  
Chromatogramme de l'extrait total *Citrus medica*

solvant <sup>a</sup>	Fraction collectées <sup>b</sup>	Fraction regroupées <sup>c</sup>	Dénomination des fractions	Rendement <sup>d</sup>	Solvant de développement <sup>e</sup>	Observations <sup>f</sup>
Hex-AE 25%	1-4	1-5	Cmb1	0,16%	Hex-AE 5%	Mélanges de 5 taches, dont 2 fluorescents à l'UV
Hex-AE 50%	5-13	6-17	Cmb2	0,15%	Hex-AE 15%	Mélanges de 3 taches, dont 1 fluorescents à l'UV
Hex-AE 75%	14-34	18-40	Cmb3	0,12%	Hex-AE 20%	Mélanges de 5 taches + trainée
AE 100%	36-43	41-46	Cmb4	0,16%	Hex-AE 25%	Mélanges de 4 taches + trainée
AE-MeOH 10%	44-49	47-51	Cmb5	0,12%	Hex-AE 30%	Mélanges de 5 taches
MeOH 50%	50-63	52-61	Cmb6	0,09%	AE-MeOH 10%	Mélanges de 4 taches
MeOH 100%	64-80	75-80	Cmb7	0,13%	AE-MeOH 20%	Mélanges de 3 taches + trainée
H <sub>2</sub> O	81-86	81-86	Cmb8	0,08%	ND	CCM non faite

<sup>a</sup>Solvant de dégrossissement ( Hcx :Hexane ; AE : Acétate d'éthyl ; MeOH : Méthanol)

<sup>b</sup>Fraction de 500 ml collectées

<sup>c</sup>Regroupement sur les base de la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) analytique

<sup>d</sup>Rendement calculé par rapport au poids initial des fruits

<sup>e</sup>ND : non déterminée car CCM non faite

<sup>f</sup>Observation après révélation de la plaque de CCM à l'acide sulfurique 5 % et après action de la chaleur

Tableau 2  
Etudes phytochimiques<sup>a</sup> préliminaires de l'extrait brut de *C. medica* par les méthodes décrites par Harbone (1973).

Extrait ou fractions <sup>b</sup> testés	Groupes chimiques									
	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins	Glycosides	Polyphénols	Phenols	Stéroïdes	Saponines	Anthraquinones	Coumarines
Extrait total	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Cmb1	-	++	-	-	-	-	+++	-	-	-
Cmb2	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-
Cmb3	-	+	-	++	+	+	+++	-	-	-
Cmb4	-	+	-	++	++	++	++	-	-	-
Cmb5	-	+++	-	++	++	++	++	-	-	-
Cmb6	-	+	-	++	+++	+++	++	-	-	-
Cmb7	-	-	-	++	+++	+++	++	-	-	-
Cmb8	-	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-

<sup>a</sup>Absent+; Présent ++:abondant +++: très abondant ; <sup>b</sup>Cmb1-8: fractions

Tableau 3  
Diamètres des zones d'inhibition<sup>a</sup> (mm) de l'extrait brut, des fractions et des molécules de référence sur les germes testés

Germes testés	Echantillon testé <sup>b</sup>											G
	Extrait total	Cma	Cmb	Cmb1	Cmb2	Cmb3	Cmb4	Cmb5	Cmb6	Cmb7	Cmb8	
<b>Champignons</b>												
<i>Trichophyton rubrum</i>	16±0	6±0	16±0	22±0	19±0	21±0	16±0	16±0	6±0	6±0	6±0	17
<i>Candida albicans</i>	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	16
<i>Candida krusei</i>	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	18
<b>Bactéries</b>												
<i>Bacillus cereus</i>	16±0	6±0	17±0	19±0	16±0	19±0	8±0	6±0	6±0	6±0	6±0	22
<i>Bacillus megaterium</i>	17±0	6±0	21±0	17±0	19±0	23±0	17±0	16±0	16±0	8±0	8±0	23
<i>Bacillus subtilis</i>	13±0	6±0	17±0	13±0	15±0	18±0	14±0	16±0	6±0	6±0	6±0	19
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	15±0	6±0	19±0	15±0	21±0	19±0	16±0	6±0	6±0	6±0	6±0	21
<i>Citrobacter freundii</i>	8±0	6±0	16±0	19±0	19±0	21±0	13±0	14±0	8±0	6±0	6±0	17
<i>Escherichia coli</i>	16±2	6±0	14±0	6±0	20±2	17±0	18±0	6±0	6±0	6±0	6±0	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18±3	6±0	17±2	6±0	25±0	18±1	25±1	8±0	6±0	6±0	6±0	17
<i>Morganella morganii</i>	16±0	6±0	23±0	26±0	24±0	27±0	22±0	15±0	13±0	6±0	6±0	23
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	18±0	6±0	27±0	21±1	27±2	23±1	26±0	14±0	6±0	6±0	6±0	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14±0	6±0	15±1	8±0	21±1	17±2	19±2	8±0	6±0	6±0	6±0	21
<i>Proteus mirabilis</i>	15±0	6±0	19±0	16±0	23±0	15±0	19±0	6±0	0±0	0±0	0±0	22
<i>Proteus vulgaris</i>	27±2	6±0	24±3	8±1	32±2	25±3	29±2	16±3	6±0	6±0	6±0	24
<i>Shigella flexneri</i>	14±0	6±0	17±0	15±0	19±0	22±0	24±0	12±0	6±0	6±0	6±0	19
<i>Shigella dysenteriae</i>	19±0	6±0	21±0	18±0	21±0	23±0	25±0	16±0	6±0	6±0	6±0	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	18±2	6±0	12±2	8±0	27±3	25±2	17±0	8±0	6±0	14±0	7±0	19
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16±0	6±0	19±0	23±0	21±0	19±0	16±0	12±0	8±0	6±0	6±0	23
<i>Streptococcus faecalis</i>	13±0	6±0	16±0	6±0	26±2	14±0	12±1	7±0	6±0	6±0	6±0	22
<i>Salmonella typhi</i>	14±1	6±0	16±0	16±0	19±0	18±0	26±0	11±0	6±0	6±0	6±0	21
<i>Salmonella typhimurium</i>	17±0	6±0	19±0	19±0	22±0	19±0	8±0	6±0	6±0	6±0	6±0	23

<sup>a</sup> inclue le diamètre des puits (6 mm) pour 2 répétitions ; <sup>b</sup> échantillons testés à 10 mg/ml pour l'extrait total et 2 mg/ml pour les fractions ;

<sup>c</sup> molécule de référence (GM/N : Gentamicine pour les bactéries ou Nystatine pour les champignons).

Tableau 4  
Concentration minimales inhibitrices\* ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'extrait total, des fractions et des molécules de référence sur les microorganismes les plus sensibles

Germe testés	Echantillon testé											
	Extrait total	Cma	Cmb	Cmb1	Cmb2	Cmb3	Cmb4	Cmb5	Cmb6	Cmb7	Cmb8	GM/N
<b>Champignons</b>												
<i>Trichophyton rubrum</i>	25	ND	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	ND	ND	ND	25
<i>Candida albicans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25
<i>Candida krusei</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25
<b>Bactéries</b>												
<i>Bacillus cereus</i>	>25	ND	12.5	12.5	25	12.5	ND	ND	ND	ND	ND	6.25
<i>Bacillus megaterium</i>	25	ND	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	ND	>25	ND	ND	6.25
<i>Bacillus subtilis</i>	25	ND	12.5	25	25	12.5	25	25	ND	ND	ND	6.25
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	25	ND	12.5	25	12.5	12.5	ND	ND	ND	ND	ND	6.25
<i>Citrobacter freundii</i>	>25	ND	25	12.5	12.5	12.5	25	25	ND	ND	ND	12.5
<i>Escherichia coli</i>	25	ND	>25	ND	12.5	12.5	12.5	ND	ND	ND	ND	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5	ND	12.5	ND	6.25	12.5	6.25	ND	ND	ND	ND	12.5
<i>Morganella morganii</i>	25	ND	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5	25	25	ND	ND	6.25
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25	ND	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	25	ND	ND	ND	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	ND	25	ND	12.5	12.5	12.5	ND	ND	ND	ND	6.25
<i>Proteus mirabilis</i>	25	ND	12.5	25	12.5	25	12.5	ND	ND	ND	ND	6.25
<i>Proteus vulgaris</i>	12.5	ND	6.25	ND	3.12	6.25	3.12	25	ND	ND	ND	6.25
<i>Shigella flexneri</i>	25	ND	12.5	25	12.5	12.5	12.5	25	ND	ND	ND	6.25
<i>Shigella dysenteriae</i>	25	ND	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	25	ND	ND	ND	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	ND	25	ND	6.25	6.25	12.5	ND	ND	25	ND	6.25
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25	ND	12.5	12.5	12.5	12.5	25	25	ND	ND	ND	6.25
<i>Streptococcus faecalis</i>	25	ND	ND	ND	6.25	25	25	ND	ND	ND	ND	6.25
<i>Salmonella typhi</i>	25	ND	ND	>25	12.5	12.5	12.5	>25	ND	ND	ND	6.25
<i>Salmonella typhimurium</i>	25	ND	12.5	12.5	12.5	12.5	ND	ND	ND ND	ND	ND	6.25

\*ND: Non déterminé; \* : molécule de référence (GM/N : Gentamicine pour les bactéries ou Nystatine pour les champignons).

Tableau 5  
Evolution des paramètres sanguins dosés lors de l'étude de toxicité aiguë

	Doses d'extrait administrées				
	0 (n=8)	4 (n=8)	8 (n=8)	12 (n=8)	16 (n=4)
Phosphatase Alcaline (UI/L)	157,15 ± 9,14	165,02 ± 8,17	121,78*± 10,67	120,40*± 5,67	121,26*± 9,06
Aspartate Aminotransférase (UI/L)	58,33 ± 6,62	55,60± 4,76	52,45± 3,58	53,50± 6,57	52,45± 4,21
Alanine aminotransférase (UI/L)	32,42± 4,15	36,98 ± 2,07	46,34*± 3,64	48,08* ± 5,23	37,35*± 3,54
Protéines (mg/ml)	35,78±2,26	39,18± 2,08	35,51± 2,12	31,19 ± 1,47	37,74 ± 3,28
Glycémie (g/l)	1,37±0,14	1,36 ± 0,97	0,14* ± 0,048	0,12* ± 0,008	0,34* ± 0,006
Cholestérol (g/l)	1,25±0,18	1,32± 0,29	1,24 ± 0,06	1,23 ± 0,17	1,43 ± 0,36

\*: différence significative par rapport aux animaux témoins au seuil de probabilité de 5%(ANOVA)