

REPUBLIQUE DU BENIN

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

Faculté des Sciences et Techniques (FAST)
Laboratoire de Chimie Organique Physique et de Synthèse (LACOPS)



THESE N° 028-2013/FDCA/FAST/UAC

Hémi-synthèse *in situ*, activité antitrypanosomienne et toxicité de thiosemicarbazones substituées de composés carbonylés naturels d'huiles essentielles de plantes aromatiques acclimatées au Bénin

THÈSE UNIQUE

Présentée en vue de l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi

***Spécialité:* Chimie Organique et Chimie des Substances Naturelles**

par

Amoussatou SAKIRIGUI

Soutenue publiquement à l'Université d'Abomey-Calavi

le 27 Mai 2013 devant la commission d'examen composée de :

Président : 1- M. Mansourou MOUDACHIROU, Professeur Titulaire/CAMES,
Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Membres : 2- M. Jacques POUPAERT, Professeur Titulaire : Rapporteur,
Université catholique de Louvain (Belgique)

3- Mme Eléonore YAYI LADEKAN, Maître de Conférences/CAMES : Rapporteur,
Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

4- Mme Kafui KPEGBA, Maître de Conférences/CAMES : Rapporteur,
Université de Lomé (Togo)

5- M. Hyacinthe AHISSOU, Maître de Conférences/CAMES : Examineur,
Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

6- M. Cosme KOSSOUOH, Maître de Conférences/CAMES : Examineur,
Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

7- M. Georges Coffi ACCROMBESSI, Professeur Titulaire/CAMES : Directeur de Thèse
Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Année 2013

DEDICACE

A

Mon Dieu

Mes parents : Monsieur et Madame SAKTRIGUI

Mes merveilleux bouts de choux et leur adorable papa

Remerciements

Avant d'inviter le lecteur à se plonger dans ce mémoire de thèse, je tiens à vous rappeler quelques secondes que ma modeste contribution à la science, aura d'abord été une formidable histoire.

Une histoire, qui depuis plus de cinq ans a commencé au Laboratoire de Chimie Organique Physique et de Synthèse (LACOPS) autour du Professeur Georges Coffi ACCROMBESSI, le Directeur dudit laboratoire. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a faite en m'acceptant dans son laboratoire et en dirigeant avec rigueur et professionnalisme ce travail. Je le prie de trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude et de mon éternelle reconnaissance.

Que le Professeur Jacques POUPAERT de l'Unité de Chimie Pharmaceutique et de Radiopharmacie (U.C.P.R) de l'Université Catholique de Louvain (U.C.L) en Belgique trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour ses précieux conseils et sa déterminante contribution à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie très sincèrement le Professeur Messanvi GBEASSOR, Directeur du Laboratoire de Physiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé (UL) pour l'accueil chaleureux dont il m'a gratifiée lors de mon séjour dans son laboratoire.

Une histoire encore avec celui-là qui, malgré ses nombreuses occupations, m'a suivie, encouragée, accompagnée, aidée et guidée pour que j'en arrive à ce résultat. Il s'agit du Professeur Fernand GBAGUIDI que je remercie très sincèrement.

Je pense également au Docteur Salomé KPOVIESSI qui a beaucoup œuvré pour l'aboutissement de ce travail. Merci pour tout Docteur et que Dieu vous bénisse.

Je n'oublie point l'aide du Professeur Cosme KOSSOUOH. Merci pour tout Professeur.

Je saisis cette opportunité pour remercier les Professeurs Mansourou MOUDACHIROU et Dominique SOHOUNHLOUE respectivement Directeurs scientifique et pédagogique de l'Ecole Doctorale « Chimie et Applications » de m'avoir acceptée dans ladite Ecole.

Je souhaite également remercier d'une manière toute particulière :

Mon Président du jury ; Le Professeur **Mansourou MOUDACHIROU**. C'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de présider ce jury de soutenance de thèse. Je vous en sais gré, tout en réitérant ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Les membres du jury :

Le Professeur **Georges C. ACCROMBESSI**, de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Le Professeur **Jacques POUPAERT** de l'Université catholique de Louvain (Belgique)

Le Professeur **Eléonore YAYI LADEKAN** de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Le Professeur **Kafui KPEGBA** de l'Université de Lomé (Togo)

Le Professeur **Hyacinthe AHISSOU** de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Le Professeur **Cosme KOSSOUOH** de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je suis convaincue que vos critiques et suggestions aideront à l'améliorer.

Je n'oublie point les Professeurs Jean-Baptiste MENSAH et Henry SOCLO.

Je remercie également ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ces travaux. Je veux citer à cet effet :

- Le Docteur Nicolas KOUDOUVO pour son accueil et son aide à l'UL.
- Le Professeur Amegnona AGBONON qui m'a particulièrement suivi au cours de mes manipulations au Laboratoire de Physiologie de l'UL.
- Mesdames Véronique HANNERT et Joanne BERO (U.C.L) pour la réalisation des tests biologiques.
- Les Professeurs Eléonore YAYI et Valentin WOTTO. J'ai été très sensible à vos marques de sympathie et de générosité.
- Tous les professeurs du département de Chimie pour leur soutien incondtionnel.

➤ Mr Pierre AGBANNI pour sa collaboration.

Je ne saurais rester indifférente aux marques de sympathie et d'affection paternelle dont a fait preuve le Professeur Bouraïma ADEOTI à mon égard. Qu'ALLAH vous bénisse.

Je remercie également le Docteur Raymond FATONDJI pour son soutien. Je n'oublie pas les amis du LACOPS : Tadjou, Guévara, Bienvenu, Alban, Fidèle, Bouraïma, Bénédicte, Finagnon, Justin, Camille, Louis, Lyde etc. Je remercie également la famille AGBAHOUNGBATA en particulier ma chère Marielle. Vous êtes simplement merveilleux. Merci à toutes les mains qui m'ont été tendue.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) qui m'a retenu dans son programme et qui a entièrement financé cette formation.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ATP: Adénosine triphosphate
ICPA : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
CDCl₃ : Chloroforme deutéré
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CCPA : Conseil Canadien de Protection des Animaux
CphT : citral 4-phényl-3-thiosemicarabzone
CT : Citral thiosemicarabzone
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DL₅₀ : Dose Létale à 50%
EtOH: Ethanol
FDA (Food and Drug Administration)
HE : Huile Essentielle
HCc : Huile essentielle de *Cymbopogon citratus*
IE : Impact Electronique
IC₅₀: Concentration Inhibitrice à 50%.
IR : Infrarouge
IS: Index de Sélectivité
CL₅₀ : Concentration Létale à 50%.
NaOH: Hydroxyde de sodium
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
ppm: parties par millions
RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
SM: Spectrométrie de Masse
VSG: Variant Surface Glycoprotein
WHO: World Health Organization
VAT: Type antigénique variable

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Un chromatographe	11
<u>Figure 2</u> : Feuilles de <i>Cymbopogon citratus</i>	16
<u>Figure 3</u> : Feuilles de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	19
<u>Figure 4</u> : Un arbre d' <i>Eucalyptus citriodora</i>	20
<u>Figure 5</u> : Exemple de complexe métallique de thiosemicarbazone	25
<u>Figure 6</u> : Schéma d'un trypanosome	32
<u>Figure 7</u> : Cycle évolutif du parasite chez l'homme et le vecteur	33
<u>Figure 8</u> : Chancre au cou et ulcération à l'épaule des trypanosomés	34
<u>Figure 9</u> : Photo de la mouche tsé-tsé	35
<u>Figure 10</u> : Région regorgeant de mouches tsé-tsé	37
<u>Figure 11</u> : Structure de la Pentamidine	40
<u>Figure 12</u> : Structure de la suramine	40
<u>Figure 13</u> : Structure du mélarsoprol	41
<u>Figure 14</u> : Structure de l'éflornithine	43
<u>Figure 15</u> : Structure du Nifurtimox.....	44
<u>Figure 16</u> : Matériel végétal.....	51
<u>Figure 17</u> : Appareil d'extraction de type Clevenger amélioré	52
<u>Figure 18</u> : Structure des composés carbonylés majoritaires des huiles essentielles utilisées	55
<u>Figure 19</u> : Structures des réactifs utilisés	56
<u>Figure 20</u> : Mécanisme de formation des thiosemicarbazones selon Vollhardt.....	57
<u>Figure 21</u> : Mécanisme de formation des thiosemicarbazones selon Allinger	58
<u>Figure 22</u> : Mécanisme de formation des thiosemicarbazones selon Carey	58
<u>Figure 23</u> : Equation de réaction de synthèse du citral semicarbazone	60
<u>Figure 24</u> : Equation de réaction de la formation des citral thiosemicarbazones substituées	61
<u>Figure 25</u> : Equation de réaction de la formation de la pipéritone semicarbazone	62
<u>Figure 26</u> : Equation de réaction de la formation des pipéritone thiosemicarbazones substituées..	63
<u>Figure 27</u> : Equation de réaction globale de synthèse du citronellal semicarbazone.....	64
<u>Figure 28</u> : Equation de réaction globale de synthèse des thiosemicarbazones du citronellal	65
<u>Figure 29</u> : <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	66

<u>Figure 30</u> : Rats de type « Wistar »	67
<u>Figure 31</u> : Pourcentage de décès par rapport à la dose d'huile essentielle	80
<u>Figure 32</u> : Caractère π de la liaison CN	85
<u>Figure 33</u> : Mésonérie impliquant la chaîne carbonée du composé carbonyle	104
<u>Figure 34</u> : N-phényl thiosemicarbazone	104
<u>Figure 35</u> : Réduction de double liaison	104
<u>Figure 36</u> : pourcentage de décès par rapport à la dose du citral thiosemicarbazone	114
<u>Figure 37</u> : Taux d'ALAT avant et après administration des composés	117
<u>Figure 38</u> : Taux d'AST avant et après administration des composés	118
<u>Figure 39</u> : Taux de PAL avant et après administration des composés	119
<u>Figure 40</u> : Taux de bilirubine avant et après administration des composés	120
<u>Figure 41</u> : Taux de créatinine avant et après administration des composés	121
<u>Figure 42</u> : Taux de protéine avant et après administration des composés	121

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> . Produits disponibles pour le traitement de la trypanosomose humaine africaine	39
<u>Tableau 2</u> : N° d'identification, nom scientifique et famille des plantes étudiées	50
<u>Tableau 3</u> : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon citratus</i>	75
<u>Tableau 4</u> : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. schoenanthus</i>	76
<u>Tableau 5</u> : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus citriodora</i>	77
<u>Tableau 6</u> : Propriétés pharmacologiques des HE	79
<u>Tableau 7</u> : Propriétés physiques des thiosemicarbazones de la série A	82
<u>Tableau 8</u> : Propriétés physiques des thiosemicarbazones de la série B.	83
<u>Tableau 9</u> : Propriétés physiques des thiosemicarbazones du citronellal	84
<u>Tableau 10</u> : Fréquence de vibration des fonctions du composé 2a d'après littérature	86
<u>Tableau 11</u> : Fréquence de vibration des fonctions du composé 2c d'après littérature	87
<u>Tableau 12</u> : Déplacements chimiques des protons du composé 2a d'après littérature	87
<u>Tableau 13</u> : Déplacements chimiques des protons du composé 2c d'après littérature	88
<u>Tableau 14</u> : Activité antitrypanosomienne des thiosemicarbazones	102
<u>Tableau 15</u> : « Règle des cinq » de Lipinski des composés	107
<u>Tableau 16</u> : Lipophilie et activité antitrypanosomienne des thiosemicarbazones et 4-phényl-3-thiosemicarbazones	108
<u>Tableau 17</u> : Activité sur les larves de crevettes	109
<u>Tableau 18</u> : Lipophilie et activité larvaire des thiosemicarbazones et 4-phényl-3-thiosemicarbazones	110
<u>Tableau 19</u> : Index de sélectivité des thiosemicarbazones	112
<u>Tableau 20</u> : Evolution des poids moyens des animaux après administration de différentes doses du citral 4-Phényl thiosemicarbazone 6a	115

Avant propos

Une partie du travail exposé dans la présente thèse a fait l'objet de trois publications dans des journaux internationaux :

1. Antitrypanosomal activity and toxicity of substituted citronellal semicarbazones and thiosemicarbazones hemi-synthesized *in situ* in the essential oil of *Eucalyptus citriodora*. Amoussatou Sakirigui, Salomé D.S. Kpoviessi, Fernand Gbaguidi, Cosme Kossouh, Jacques Poupaert, Mansourou Moudachirou and Georges C. Accrombessi. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. (2012) 4(9): 4373-4380.
2. Selective trypanocide activity of some substituted thiosemicarbazones of citral from Benin *Cymbopogon citratus* essential oil and their toxicity against *Artemia salina* leach. Amoussatou Sakirigui, Salomé D.S. Kpoviessi, Fernand Gbaguidi, Cosme Kossouh, Joanne Bero, Joelle Quetin-Leclercq, Mansourou Moudachirou, Jacques Poupaert & Georges C. Accrombessi. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences* (2012) 12 (3): 454-462.
3. Héli-synthèse et activités antiparasitaires sur *Trypanosoma brucei brucei* de thiosemicarbazones du citral dans l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* du Bénin. Amoussatou Sakirigui, Cosme Kossouh, Fernand Gbaguidi, Salomé Kpoviessi, Raymond H. Fatondji, Jacques Poupaert et Georges C. Accrombessi. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* (2011) 031 : 11 -20.

Les Huiles Essentielles (HE) des plantes aromatiques du Bénin sont bien connues pour leurs activités biologiques. Parmi ces huiles, plusieurs contiennent des composés carbonylés malheureusement instables, oxydables (aldéhydes) et parfois agressifs pour l'organisme. Cependant les thiosemicarbazones dérivant de la condensation des thiosemicarbazides sur les composés carbonylés, sont des molécules douées d'excellentes propriétés pharmacologiques. C'est pourquoi ce travail a pour but d'éviter ces facteurs néfastes des composés carbonylés en faisant à partir de ces huiles, une héli-synthèse *in situ* de thiosemicarbazones, puis d'étudier leurs propriétés antiparasitaires.

A cet effet, les HE de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon schoenanthus* et *Eucalyptus citriodora* ont été extraites. L'analyse chimique de ces HE montre qu'elles contiennent respectivement du citral (aldéhyde : 72,91%), de la pipéritone (cétone : 68,2%) et du citronellal (aldéhyde : 67,5%).

A partir de ces trois HE, quatorze thiosemicarbazones ont été héli-synthétisées *in situ*. Toutes ces molécules ont été purifiées et leurs structures ont été déterminées par les analyses spectrométriques IR, RMN ¹H, RMN ¹³C et SM. A notre connaissance, un tel travail n'avait encore été jamais entrepris et plusieurs composés obtenus n'ont jamais été décrits dans la littérature. Des tests antitrypanosomiens, il ressort que les 4-phényl-3-thiosemicarbazones sont plus actives que les autres thiosemicarbazones et les huiles de départ. Le calcul de l'index de sélectivité a révélé le composé candidat médicament de chaque HE : citralthiosemicarbazone (IS = 51,27), citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone (IS = 36,07), pipéritone-4-phényl-3-semicarbazone (IS = 7,84) et citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone (IS = 4,92). Ces index sont généralement plus intéressants que ceux des HE de départ (IS = 11,47 pour l'HE de *C. citratus*, IS = 6,39 pour l'HE de *C. schoenanthus* et IS = 5,90 pour l'HE de *E. citriodora*).

Les études toxicologiques ont révélé que les substances les plus sélectives (HE de *C. citratus*, citralthiosemicarbazone et citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone) à dose raisonnable n'affectent pas les fonctions hépatiques et rénales. On note aussi une absence d'agressivité des composés. Cette agressivité est confirmée chez l'huile de *C. citratus* à partir d'une dose de 2 mL/kg. Les thiosemicarbazones obtenues *in situ* pourraient constituer une alternative très intéressante pour éviter certains effets néfastes des HE.

Mots clés : Huiles essentielles, héli-synthèse, analyses spectrométriques, antitrypanosomiens, Index de sélectivité.

Essential oils (EO) of aromatic plants of Benin Republic are well known for their pharmacological activities. Many of them contain several volatile carbonyl compounds, which are unfortunately, oxydable (aldehydes) and aggressive to the human body. However the thiosemicarbazones derived from condensation of thiosemicarbazides on carbonyl compounds, are the molecules with excellent pharmacological properties. That is why the aim of this work is to avoid these adverse factors of carbonyl compounds by using these oils on hemi- synthesis *in situ* of thiosemicarbazones and to study their antiparasitic properties.

To this end, the EO of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Eucalyptus citriodora* were extracted. Chemical analysis of these shows that they contain respectively HE citral (aldehyde: 72.91%), the piperitone (ketone: 68.2%) and citronellal (aldehyde: 67.5%).

From these three EO, fourteen thiosemicarbazones were hemi-synthesized *in situ*. All these molecules were purified and their structures were confirmed by spectroscopic analyses IR, NMR 1H, NMR 13C and MS. For all we know, this work had never been undertaken and several compounds obtained have never been described in the literature. From trypanosomal tests, it appears that the 4-phenyl-3-thiosemicarbazones are more active than the other thiosemicarbazones and initial oils. The calculation of the selectivity index revealed compound candidate drug of each Essentialju oil: citralthiosemicarbazone (SI = 51.27), citral-4-phenyl-3-thiosemicarbazone (SI = 36.07), piperitone-4-phenyl-3 semicarbazone (SI = 7.84) and citronellal-4-phenyl-3-thiosemicarbazone (SI = 4.92). The selectivity indexes of these compounds are generally more attractive than EO indexes (SI = 11.47 for EO of *C. citratus*, SI = 6.39 for EO of *C. schoenanthus*, SI = 5.90 for EO of *E. citriodora*).

Toxicological studies have shown that the most selective substances (EO of *C. citratus*, citral thiosemicarbazone and citral-4-phenyl-3-thiosemicarbazone) do not really affect the liver and kidney functions. There is also a lack of aggressiveness of compounds (citral thiosemicarbazone, citral-4-phenyl-3-thiosemicarbazone). This aggressiveness is confirmed in the oil of *C. citratus* from a minimum dose of 2 mL/kg. Thioemicarbazones obtained *in situ* could be a very interesting alternative to overcome some adverse effects of EO.

Key words: Essential oils, hemi-synthesis, spectrometric analyses, antitrypanosomal, selectivity index.

I. Introduction Générale.....	1
II. Généralités.....	7
2.1. Huiles essentielles	8
2.1.1. Plantes aromatiques	8
2.1.2. Définition d'une huile essentielle	8
2.1.3. Etat naturel, répartition, caractéristiques et propriétés physiques.....	9
2.1.4. Extraction des huiles essentielles	9
2.1.5. Analyse des huiles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	10
2.1.6. Composition chimique des HE	11
2.1.7. Notion de chémotype	12
2.1.8. Emplois et Propriétés pharmacologiques	12
2.1.9. Aperçu sur le mode d'action des HE	13
2.1.10. Toxicité des huiles essentielles.....	14
2.1.11. Aperçu sur les plantes utilisées et leurs HE	15
2.1.11.1. <i>Cymbopogon citratus</i>	15
a. Origine	15
b. Composition chimique	16
c. Propriétés pharmacologiques.....	17
2.1.11.2. <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	15
a. Origine	18
b. Composition chimique	19
c. Propriétés pharmacologiques.....	19
2.1.11.2. <i>Eucalyptus citriodora</i>	15
a. Origine	20
b. Composition chimique	21
c. Propriétés pharmacologiques.....	21
2.1.12. Toxicité des HE des plantes étudiées	22
2.1.13. Importance des synthèses et héli-synthèses	23
2.2. Semicarbazones et thiosemicarbazones.....	24
2.2.1. Historique.....	24
2.2.2. Propriétés pharmacologiques des thiosemicarbazones	26
2.2.3. Mode d'action des thiosemicarbazones	30
2.2.4. Toxicité des thiosemicarbazones.....	31
2.3. Trypanosomose.....	31
2.3.1. Les parasites de trypanosomes.....	32
2.3.2. Cycle évolutif du parasite	33
2.3.3. Animal vecteur : mouche tsé-tsé.....	35
2.3.4. Infestation, symptômes	37
2.3.5. Médicaments et traitement.....	39
2.3.6. Trypanosomiase animale.....	44
2.3.7. Conséquences de la maladie	45
2.4. Etudes toxicologiques.....	46
2.4.1. Voies d'exposition	47
2.5. Paramètres liés aux tests biologiques	48

III. Matériel et méthodes.....	49
3.1 . Cadre d'étude	50
3.2 . Extraction et analyse chimique des HE.....	50
3.2.1 . Matériel végétal.....	50
3.2.2 . Extraction des huiles essentielles.....	51
3.2.3 . Calcul du rendement	52
3.2.4 . Analyse chimique des HE.....	53
3.3 . Hémi-synthèse.....	55
3.3.1 . Matériel d'hémi-synthèse et d'identification des molécules.....	55
3.3.1.1. Matériel d'hémi-synthèse	55
3.3.1.2. Matériel d'identification et de détermination des molécules.....	56
3.3.2 . Mécanismes de réaction	57
3.3.3 . Méthodes de Synthèse.....	59
3.3.3.1. Citralthiosemicarbazones.....	59
3.3.3.2. Pipéritonethiosemicarbazones	61
3.3.3.3. Citronellalthiosemicarbazones.....	63
3.3.3.4. Recristallisation	65
3.3.3.5. La chromatographie sur couche mince (CCM)	66
3.4 . Biologie.....	66
3.4.1. Matériel animal	66
3.4.2. Méthodes de réalisation des tests biologiques.....	67
3.4.2.1. Evaluation de l'activité trypanocide	67
3.4.2.2. Evaluation de la toxicité sur <i>Artémia salina</i>	68
3.4.2.3. Evaluation de la toxicité aiguë sur les rats wistars	69
IV. Résultats et discussion.....	72
4.1. Etude des huiles essentielles	73
4.1.1. Extraction.....	73
4.1.1.1. Rendement en huile essentielle de <i>C. citratus</i>	73
4.1.1.2. Rendement en huile essentielle de <i>C. schoenanthus</i>	73
4.1.1.3. Rendement en huile essentielle de <i>Eucalyptus citriodora</i>	73
4.1.2. Analyse chimique des huiles essentielles.....	74
4.1.2.1. Analyse chimique de l'huile essentielle de <i>C. citratus</i>	74
4.1.2.2. Analyse chimique de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	75
4.1.2.3. Analyse chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus citriodora</i>	76
4.1.3. Activité antitrypanosomienne des HE.....	78
4.1.4. Toxicité larvaire des HE.....	78
4.1.5. Index de sélectivité	79
4.1.6. Toxicité aiguë de l'HE de <i>C. citratus</i>	79
4.1.7. Conclusion	80
4.2. Hémi-synthèse.....	81
4.2.1. Propriétés physiques des thiosemicarbazones de la série A.....	82
4.2.2. Propriétés physiques des thiosemicarbazones de la série B.....	82
4.2.3. Propriétés physiques des thiosemicarbazones de la série C.....	83
4.2.4. Détermination des structures.....	84

4.2.2.1.	Caractéristiques spectrométriques des molécules de la série A.....	90
4.2.2.1.	Caractéristiques spectrométriques des molécules de la série B.....	94
4.2.2.2.	Caractéristiques spectrométriques des molécules de la série C.....	98
4.3.	Tests biologiques.....	101
4.3.1.	Activités antitrypanosomiennes des thiosemicarbazones	101
4.3.2.	Relation structure-activité.....	103
4.3.3.	« Règle des cinq » de Lipinski	105
4.3.4.	Tests de toxicité sur les larves de crevette	108
4.3.5.	Toxicité larvaire et activité antitumorale	110
4.3.6.	Index de sélectivité (IS)	111
4.3.7.	Conclusion	113
4.4.	Etudes toxicologiques.....	113
4.4.1 .	Toxicité aiguë (Doses létales)	113
4.4.1.1 .	Citralthiosemicarbazone (2a)	114
4.4.1.2 .	Citral-4-Phényl-3-thiosemicarbazone (6a)	115
4.4.2 .	Toxicité aiguë (Tests biochimiques).....	116
4.4.2.1.	Alanine aminotransférase (ALAT)	116
4.4.2.2.	Aspartate aminotransférase (ASAT)	117
4.4.2.3.	Phosphatase alcaline (PAL).....	118
4.4.2.4.	Bilirubine	119
4.4.2.5.	Créatinine.....	120
4.4.2.6.	Protéines totales.....	121
4.4.3 .	Conclusion	122
V.	Conclusion générale et perspectives.....	123
VI.	Références bibliographiques.....	127
	Sources des images.....	150
	Annexes.....	151



Introduction

La thérapie par les plantes est sans doute, aussi ancienne que l'est la maladie. En dehors des tisanes, un liquide volatil et très odorant appelé Essence Naturelle ou Huile Essentielle (HE) peut également être extrait des plantes aromatiques par diverses techniques en particulier l'hydrodistillation. Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été et continue d'être scientifiquement démontrée (Bernadet *et al.* 2000).

Les huiles essentielles sont constituées de molécules chimiquement définies, clairement identifiées et quantifiées (Belanger *et al.* 1994). Ce sont ces molécules et leurs proportions qui constituent l'identité propre à chaque huile, et qui déterminent leurs propriétés, leurs champs d'action, leurs toxicités et donc leurs précautions d'emploi. Il est donc fondamental de savoir précisément ce que contient une huile essentielle pour l'utiliser en sécurité et surtout pour se garantir le meilleur résultat en fonction de ce que l'on attend d'elle. L'utilisation des HE peut être contre-indiquée dans certains cas (grossesse, épilepsie, hypertension etc.) (Belanger *et al.* 1994).

Les pourcentages des HE dans les plantes varient d'une espèce à une autre. Elles sont présentes en très faible proportion dans certaines espèces, mais en proportion non négligeable dans d'autres. *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon schoenanthus* et *Eucalyptus citriodora* font partie de ces dernières. Les HE issues de ces plantes sont en majorité constituées de composés carbonylés (Ayédoun *et al.* 1995, Nonviho *et al.* 2010). Plusieurs propriétés biologiques sont affectées à ces HE (Koba *et al.* 2004, Tyagi *et al.* 2010, Mohammed *et al.* 2012).

Les médications traditionnelles et l'utilisation des plantes en médecine empirique ont souvent été à l'origine de recherches scientifiques de haut niveau. Dans la plupart des cas, ces recherches aboutissent à la découverte de substances originales présentant un intérêt thérapeutique considérable. L'industrie pharmaceutique jouit largement de ces molécules isolées, purifiées puis utilisées par la médecine conventionnelle (Flet *et al.* 1984). Les

rendements d'extraction faibles ou laborieux de certaines molécules biologiquement actives et la toxicité des mélanges de départ contenus dans les extraits ont suscité chez les chimistes l'esprit de synthèse et d'hémi-synthèse pour approvisionner la production. Dans une hémi-synthèse, la molécule de départ est issue directement de substances naturelles et correspond quasiment dans sa structure à la molécule que l'on souhaite produire (Johnson *et al.* 2003). Grâce donc à la synthèse chimique, il est possible de reproduire pour des raisons écologiques ou économiques des molécules qui existent en trop petite quantité dans la nature (principes actifs de médicaments, arômes etc.), de créer également de nouvelles molécules (plastiques, colorants, médicaments etc.).

Parmi les molécules synthétiques actives, les thiosemicarbazones ont retenu notre attention. Ce sont des molécules hautement convoitées par la chimie pharmaceutique en raison de leurs multiples propriétés biologiques très intéressantes. C'est cela qui justifie l'importance qui leur est accordée dans le cadre de la lutte contre les maladies microbiennes (Sharma *et al.* 2006, Kasuga *et al.* 2003, Choudhary *et al.* 2011), tumorales (Afrasiabi *et al.* 2004, Subrahmanyam *et al.* 2012), paludéennes (Klayman *et al.* 1984, Pingaew *et al.* 2010), trypanosomiennes (Glinma *et al.* 2011, Fatondji *et al.* 2010, Rosenthal *et al.* 2005) et virales (Fujii *et al.* 2004) etc.

Il faut toutefois comprendre que, la mise au point *in vitro* d'un médicament candidat, efficace n'est qu'une première étape. Lors de la découverte de toute substance à pouvoir thérapeutique, les études toxicologiques sont obligatoires et constituent une étape préliminaire aux expérimentations cliniques qui représentent un préalable indispensable à la mise au point d'un médicament destiné à l'être humain.

La recherche de médicaments en Afrique à partir de nos plantes est toujours un sujet d'actualité car, la question liée à la santé des populations de ce continent est toujours critique. Ce continent de part sa situation géographique est propice à la naissance et à la prolifération de beaucoup de pathologies (Academie des sciences, 2006). L'accroissement démographique, le peuplement de territoires jusque-là inhabités, l'urbanisation rapide,

l'agriculture intensive, la dégradation de l'environnement et l'utilisation inappropriée des anti-infectieux sont autant de facteurs qui bouleversent l'équilibre du monde microbien en Afrique. Cette situation entrave le développement aussi bien social qu'économique du continent. Sur cette toile de fond se superposent l'émergence et la réémergence de certaines maladies. La trypanosomose en est un exemple palpable.

La trypanosomose consiste en un groupe de maladies humaine et animale importantes causées par des protozoaires parasites du genre *Trypanosoma*. En Afrique subsaharienne, la dernière décennie du XXème siècle a vu une résurgence de la trypanosomiase Humaine Africaine (THA) (Hotez *et al.* 2009). Il n'est pas inutile de rappeler que ce groupe de parasites (*Trypanosoma*) se déploie dans des contextes de grande pauvreté (Simarro *et al.* 2011) et dans les régions les plus reculées. La plupart des médicaments comme le mélarsoprol qui sont toujours utilisés contre la maladie ont été développés il y a plusieurs décennies (Balasegaram *et al.* 2006). Notons au passage que la toxicité de certains de ces médicaments utilisés est susceptible d'induire 5 à 10% de cas de décès chez les patients. En Amérique du Sud et en Amérique centrale, la maladie de Chagas (trypanosomiase américaine) est aussi loin d'être contrôlée (Duschak *et al.* 2007). En absence de traitement, ces différentes pathologies peuvent être fatales. Les perspectives à moyen et long terme pour la mise au point de nouveaux médicaments efficaces et sans danger contre ces pathologies doivent forcément être envisagées.

En Afrique, des extraits de plantes sont de plus en plus testés sur les parasites de trypanosomes (Ngantchou *et al.* 2004). Plusieurs travaux réalisés au Bénin mentionnent les propriétés biologiques des HE de *Cymbopogon citratus*, de *Cymbopogon schoenanthus* et d'*Eucalyptus citriodora*. Mais l'activité antitypanosomienne de ces HE reste encore non élucidée. Si les HE révèlent une activité trypanocide, on pourrait plus ou moins lier cette activité à la présence de leurs composés majoritaires (carbonylés). Cette corrélation peut faire penser au fait que les molécules de thiosemicarbazones qui proviendraient de ces carbonylés pourraient être autant ou même plus actives sur lesdits parasites. La question fondamentale est de savoir si ces dernières molécules pourraient être hémi-

synthétisées *in situ* dans ces huiles. Si on trouve une réponse positive à cette question, les problèmes liés à l'oxydation rapide, à la grande instabilité et même à l'agressivité de ces composés carbonylés pourraient être contournées (Ouédraogo *et al.* 2009, Lalko *et al.* 2008, Couderc *et al.* 2001, OFSP, 2007).

Il apparait donc que ce travail vise la valorisation d'un nouvel axe de recherche dans le domaine des huiles essentielles naturelles à travers l'utilisation de leurs composés majoritaires dans les réactions d'hémi-synthèse conduisant à la formation de molécules trypanocides. Ce sujet nous a semblé d'autant plus intéressant que la flore béninoise est extrêmement riche en plantes aromatiques qui sont elles mêmes, riches en huiles essentielles.

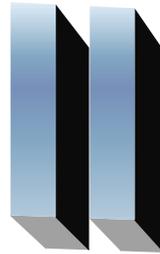
Objectif général

Nous allons de façon générale, hémi-synthétiser *in situ* des thiosemicarbazones afin de comparer leurs activités antitrypanosomiennes et leurs toxicités aux activités des substrats de départ que sont les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon schoenanthus* et *Eucalyptus citriodora*.

Objectifs spécifiques

- Déterminer la composition chimique les HE de *C. citratus*, de *C. schoenanthus*, et d'*E. citriodora*.
- Etudier les propriétés antitrypanosomiennes et la toxicité larvaire des HE afin de déduire l'HE la plus sélective.
- Evaluer la toxicité aiguë de l'HE la plus sélective.
- Hémi-synthétiser *in situ* à partir du citral de *C.citratus*, du citronellal de *E. citriodora* et de la pipéritone de *C. schoenanthus* une série de thiosemicarbazones substituées.
- Déterminer les structures des molécules hémi-synthétisées par diverses techniques d'analyses spectrométriques (SM, IR, RMN ^1H et ^{13}C).

- Etudier les propriétés antitrypanosomiennes et la toxicité larvaire des molécules. Déterminer les relations structure-activité des molécules.
- Dédire et comparer les sélectivités des molécules hémi-synthétisées à celles des huiles de départ.
- Caractériser également les composés qui pourraient être candidats dans la lutte contre certaines tumeurs humaines.
- Elucider théoriquement la pharmacocinétique des composés thiosemicarbazones à travers la « règle des cinq de lipinski ».
- Déterminer à partir des tests de toxicité aiguë les doses létales des substances les plus sélectives et leur impact sur certains organes chez des rats de type « Wistar ».



Généralités

2.1 . Huiles essentielles

2.1.1. Plantes aromatiques

L'odeur souvent agréable qui s'exhale de certains organes végétaux : feuilles, fleurs, écorce etc., est constituée de molécules actives tels que les phénols, les terpènes etc. qui sont douées de nombreuses propriétés pharmacologiques (Franchomme *et al.* 1990, Belaiche *et al.* 1979). Ces molécules contenues dans les plantes peuvent également être une source d'inspiration dans la fabrication d'autres molécules biologiquement actives. Les arômes caractéristiques de plusieurs plantes, viennent des composés chimiques présents, variant en quantité, de parties par billion à parties par million. Ce sont des substances odorantes, volatiles du métabolisme secondaire des plantes supérieures (Wright *et al.* 1995). Cet ensemble de composés forme l'huile essentielle (HE) de la plantes. Dans la nature, quelques espèces de plantes évoluent avec de hauts niveaux de composants odorants que d'autres. De telles plantes ont été utilisées depuis très longtemps pour aromatiser des aliments, et même pour le traitement de certaines maladies (Wright *et al.* 1995, Bardeau *et al.* 1976, Teisseire *et al.* 1991).

2.1.2. Définition d'une huile essentielle

L'Agence Française de Normalisation (AFNOR, 1989) définit une huile essentielle comme étant « le produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

En dehors des huiles essentielles naturelles, il y a aussi des huiles artificielles ou synthétiques. Les imitations sont parfois parfaites aboutissant à la même odeur. Mais la composition est habituellement fort différente du produit naturel végétal. Leur emploi est souvent destiné à la parfumerie, à la droguerie, à l'industrie, mais rarement à la

thérapeutique, qui pour usage interne ou externe, n'est pratiquement faite qu'avec des essences extraites des végétaux (Belanger *et al.* 1994).

2.1.3. Etat naturel, répartition, caractéristiques et propriétés physiques

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes dans certaines familles (Mann *et al.* 1987) : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées, Poacées. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleuries (lavande, menthe...), mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), dans les écorces (cannelles), le bois (camphrier), les fruits (poivres) et les graines (muscade).

Liquides à température ambiante, exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent (Leung *et al.* 1980), ce qui les différencie des huiles "fixes".

2.1.4. Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction (Conseil de l'Europe 1996). Nous allons dans ce travail nous intéresser à la méthode basée sur l'entraînement à la vapeur.

2.1.4.1. *L'entraînement à la vapeur d'eau*

Le principe de cette méthode est basé sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et est entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation (Clevenger *et al.* 1928).

2.1.5. Analyse des huiles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

2.1.5.1. Définition

C'est une méthode physique de séparation basée sur les différences entre les affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur différente solubilité dans chaque phase.

2.1.5.2. Principe de la CPG

L'échantillon (un liquide volatil) est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une microsiringue qui va traverser une pastille en caoutchouc, appelée *septum*, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée *injecteur*. L'injecteur est traversé par le *gaz porteur* et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0.2 à 5.0 µl.

Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le *gaz porteur* (ou *gaz vecteur*) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la *phase stationnaire*. La phase stationnaire peut être un liquide non (ou peu) volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de ***rétenion chromatographique*** avec les différents composés (appelés ***solutés***). Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne. La grandeur expérimentale brute est appelée ***temps de rétenion***. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur. Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (***élution***), il faut déterminer la bonne température du four. En général, la température doit être supérieure à la température d'ébullition des composés. On peut

travailler en isotherme, c'est-à-dire avec une température fixe durant toute l'analyse ou avec un programme de température qui varie (Adam *et al.* 2001).

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est appelé *détecteur*. Cet élément évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux. Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur (sorte d'imprimante) qui dessinera la courbe de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne) (fig. 1). L'ensemble des pics est appelé *chromatogramme*. Actuellement et de plus en plus, les logiciels remplacent avantageusement les enregistreurs papiers pour l'interprétation des signaux envoyés par les détecteurs.

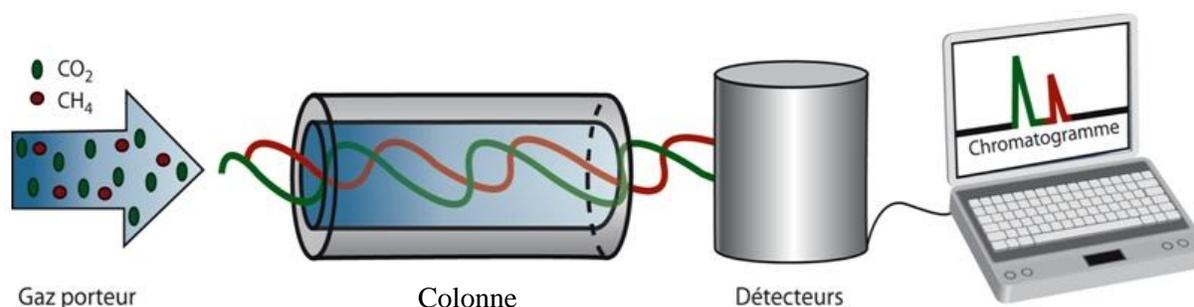


Figure 1: Un chromatographe

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier et de quantifier chacune de ces molécules et ainsi d'obtenir la composition précise des huiles essentielles.

2.1.6. Composition chimique des HE

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes (Mann *et al.* 1987). Ce sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe de *Terpénoïdes* (les plus volatils c'est-à-dire à masse

moléculaire peu élevée), spécialement monoterpènes: (C10) cinéol, menthol, néral, géraniol, citronellal, pipéritone... qui constituent parfois plus de 70 % de l'huile essentielle (Loza-Tavera *et al.*1999, Robinson *et al.* 1991), et sesquiterpènes : (C15) caryophyllène, humulène... bien que des diterpènes (C20) peuvent aussi être présents (Porter *et al.* 1981, Loza-Tavera *et al.*1999). Le groupe des composés aromatiques : des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'anisaldéhyde, l'eugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde.

2.1.7. Notion de chémotype

Les techniques d'analyse chimique très performantes actuellement mises à la disposition des chercheurs nous ont permis d'avoir une connaissance plus approfondie des structures moléculaires présentes dans les huiles essentielles. Dans une même espèce botanique, la variation chimique permet de définir précisément la nature des sous-espèces, des variétés, des cultivars et des taxons des plantes aromatiques. Cette variation chimique génère la notion de : chémotype ou race chimique. Une notion capitale en aromathérapie.

C'est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle (Kpadonou *et al.* 2012).

2.1.8. Emplois et Propriétés pharmacologiques

L'intérêt pour les huiles essentielles s'est accru, et la demande est de plus en plus forte tant pour la pratique de l'aromathérapie que pour d'autres usages (Baudoux *et al.* 2001). Beaucoup d'entre elles sont utilisées pour assaisonner et aromatiser les aliments. Elles ont aussi une grande importance économique comme saveurs, parfums et solvants. Elles entrent aussi dans la fabrication des désodorisants, de l'encens et des produits pour le bain.

De même elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme conservateurs et dans l'industrie chimique (Rusenova *et al.* 2009).

Plusieurs activités sont attribuées aux huiles essentielles. La littérature fait cas de leurs activités cholérétique, cicatrisante, neurosédative, spasmolytique, digestive, stomachique, antimicrobienne, anti-inflammatoire, désinfectante du système respiratoire, antioxydante, acidifiante, tonocardiaque, fluidifiante du sang, antivenimeuse, antispasmodique (Adebayo *et al.* 2010, Derwich *et al.* 2010, Koba *et al.* 2009). Ces substances peuvent éveiller, rafraîchir ou calmer l'esprit et le corps, relâcher les muscles et embellir la peau (Cassella *et al.* 2002, Hammer *et al.* 2002).

Chez l'homme, les constituants lipophiles sont rapidement absorbés par voie pulmonaire, cutanée, ou digestive, pour exercer l'activité voulue. Mais à cause de leur toxicité orale, et leur agressivité à l'encontre des muqueuses et/ou de la peau, il faut prendre toutes les mesures de prudence. Elles ne doivent être utilisées qu'après dilution dans un véhicule approprié: huiles fixes (Mann *et al.* 1987), lait, yaourt, fromage blanc, crème, miel, confiture, alcool. Une telle dilution réduit souvent la durée de conservation (Cowan *et al.* 1999).

2.1.9. Aperçu sur le mode d'action des HE

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale (Mangena *et al.* 1999, Lis-Balchin *et al.* 1998, Magiatis *et al.* 1999). Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE (Osawa *et al.* 1990, Montessori *et al.* 1996). Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable.

En effet, certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des HE varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, qui est largement diversifié (Cox *et al.* 2000,

Harkenthal *et al.* 1999, Kandil *et al.* 1994). Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs :

D'autres suggèrent que les HE hydroxylées créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cibles les enveloppes protectrices, le mésosome et le cytoplasme (Franchomme *et al.* 1981).

Plus tard, il a été montré que le carvacol provoque un effet inhibiteur chez *Bacillus cereus* (Ultée *et al.* 1998). Cet effet réside dans une forte diminution de l'ATP (Adénosine triphosphate) intracellulaire, une réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire et aussi une influence sur le flux de potassium (intra et extracellulaire). Ceci témoigne de l'endommagement de la membrane cytoplasmique.

Des études sur le mécanisme d'action des HE réalisées en 1978 ont montré que dans le corps humain, les HE possèdent un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques et qu'elles agissent à différents niveaux (Valnet *et al.* 1978).

2.1.10. Toxicité des huiles essentielles

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que d'autres (Belanger *et al.* 1994). D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques (Laleye *et al.* 2004, Bruneton *et al.* 1993).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement de pratiques telles que l'aromathérapie et autres, conduisent à une

utilisation souvent abusive. L'automédication est dangereuse, mais elle est souvent favorisée par le fait que bon nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique (Dorman *et al.* 2000).

Les huiles essentielles riches en aldéhydes et cétones aromatiques et terpéniques sont plus dermocaustiques ou irritantes (Couderc *et al.* 2001, OFSP, 2007). Vu la puissance des molécules aromatiques, une ingestion accidentelle importante peut entraîner une toxicité élevée voire un coma puis la mort. La plupart des huiles essentielles ingérées à doses élevées causeront une gastralgie plus ou moins importante qui s'améliorera par la prise d'huile végétale en quantité importante.

En règle générale, les huiles essentielles, par voie orale, ont une toxicité aiguë, moyenne, faible ou très faible. La demi-concentration létale (DL₅₀) est comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle...). D'autres ont une DL₅₀ inférieure à 1g/kg: l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg, convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg); l'essence de moutarde (0.34 g/kg); l'origan et la sarriette (1.37 g/kg). La toxicité chronique est assez mal connue (Bruneton *et al.* 1999). En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter que la présence de constituants "allyl et propénylphénols" de certaines huiles est capable d'induire l'apparition de cancers (chez les rongeurs).

2.1.11. Aperçu sur les plantes utilisées et leurs HE

2.1.11.1. *Cymbopogon citratus*

a. *Origine*

Le genre *Cymbopogon* comprend environ une cinquantaine d'espèces originaires d'Asie maintenant naturalisées dans le monde du fait de leurs excellentes aptitudes aromatiques culinaires et médicinales (Cheel *et al.* 2005). On les retrouve dans le monde entier surtout dans les régions tropicales et subtropicales (Khanuja *et al.* 2005).

Cymbopogon citratus Stapf appartient donc au genre *Cymbopogon* et à la famille des poaceae, anciennement nommée gramineae. Cette plante se retrouve un peu partout au Bénin et se cultive facilement dans les jardins. Elle s'appelle Tchama (fon), Tigbé (mina).

Les feuilles de cette plante sont de couleur verte. Persistantes et coriaces (même tranchantes), elles répandent une forte odeur de citron quand on les froisse (fig. 2). La base des tiges foliaires est blanche, renflée et charnue.



Figure 2: Feuilles de *Cymbopogon citratus*

b. *Composition chimique*

L'HE de *C. citraus* est constituée majoritairement du citral (mélange de deux aldéhydes isomères géométriques, le néral et le géraniol). Cette huile contient aussi d'autres composés en quantités non négligeables. On peut citer entre autres le géraniol (pourcentage autour de 5%), le geranylacetate (environ 1%) et le myrcène (au moins 10 %) (Nonviho *et al.* 2010, Ayédoun *et al.* 1995, Koba *et al.* 2003, Owolabi *et al.* 2009, Matasyoh *et al.* 2011, Blanco *et al.* 2009, Cavalcati *et al.* 2004).

c. Propriétés pharmacologiques

Les feuilles sont traditionnellement utilisées dans la cuisine et contre les maladies infectieuses. Leurs infusions sont rafraîchissantes, aromatisées et agréables à boire. Pour la cuisine, on utilise plutôt le bulbe renflé qui se trouve à la base des tiges. Au délicieux goût citronné, il ajoute une agréable consistance sous la dent qui est indispensable par exemple au poulet à la citronnelle.

Les feuilles de *C. citratus* constituent aussi une source d'huile essentielle très importante, étudiée et utilisée en Afrique et partout dans le monde. D'après la littérature, les extraits de la plante et son huile essentielle possèdent d'excellentes propriétés biologiques. L'HE de *Cymbopogon citratus* peut être utilisée contre des infections mycosiques animales et des lésions profondes (Koba *et al.* 2004). Certains auteurs ont trouvé qu'on peut utiliser cette huile pour conserver les aliments et boissons tout en évitant la prolifération de microbes et champignons (Smith-Palmer *et al.* 1998, Dahouenon-Ahoussi *et al.* 2012). Assez de propriétés antimicrobiennes sont connues pour cette plante (Koba *et al.* 2003, Roussanova *et al.* 2011, Cuéllar Cuéllar *et al.* 2009). Ses qualités antifongiques ont également fait l'objet de plusieurs études scientifiques (Matasyoh *et al.* 2011, Tyagi *et al.* 2010, Bansod *et al.* 2008, Abe *et al.* 2003). L'activité antioxydante de l'huile a été aussi démontrée (Blanco *et al.* 2009, Sacchetti *et al.* 2005). Beaucoup d'autres travaux scientifiques font cas des propriétés insecticides et larvicides (Tchoumboungang *et al.* 2009, Karunamoorthi *et al.* 2010, Fandohan *et al.* 2004), des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques, diurétiques (Mirza *et al.* 2004) de l'HE de la plante. L'HE est aussi un bon antipaludéen et ses propriétés antidiabétiques sont bien connues (Negrelle *et al.* 2007, Tangpu *et al.* 2006).

Le citral est le nom donné aux deux isomères aldéhydiques acycliques contenus majoritairement dans cette huile. Le pourcentage de citral selon la littérature tourne autour de 70 % (Nonviho *et al.* 2010).

En raison de son arôme de citron qu'il confère à l'huile, le citral est d'une importance considérable dans l'industrie alimentaire. C'est aussi une matière première utilisée dans les industries pharmaceutiques, de parfumerie et cosmétiques, notamment pour la synthèse des ionones et de la vitamine A (Dawson *et al.* 1994). Cet aldéhyde, en plus de sa forte capacité à se volatiliser s'oxyde aussi très rapidement en présence de l'air, de la chaleur, de la lumière etc. Certains auteurs pensent qu'on pourrait pallier à ces phénomènes en réalisant *in situ* des oximes plus stables dans cette huile (Ouédraogo *et al.* 2009).

Le citral possède également une activité antifongique contre des pathogènes affectant les végétaux et l'homme (Rauber *et al.* 2005, Rodov *et al.* 1995). On lui reconnaît aussi les propriétés bactéricides et insecticides (Kim *et al.* 1995, Rice *et al.* 1994).

2.1.11.2. *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng

a. *Origine*

Cymbopogon schoenanthus (L.) Spreng appartient aussi au genre *Cymbopogon* et à la famille des poaceae. Cette plante aromatique (fig. 3) aussi originaire d'Asie existe de façon naturelle dans presque tous les pays tropicaux et subtropicaux (Rizk *et al.* 1986). Au Bénin, ces feuilles se retrouvent surtout dans la partie septentrionale du pays (Ayédoun *et al.* 1995). Elle s'appelle Tsable (yoruba), Susume (waci).



Figure 3 : Feuilles de *Cymbopogon schoenanthus*

b. *Composition chimique*

La plante, utilisée comme source d'huile essentielle est connue pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques (Weiss *et al.* 1997, Cheel *et al.* 2005). En plus de la pipéritone qui est le composé majoritaire (environ 60 %), l'HE contient également d'autres composés comme le limonène, le δ -2-carène, β -eudesmol, élémol, (Nonviho *et al.* 2010, Ayédoun *et al.* 1995, Onadja *et al.* 2007, Koba *et al.* 2004, Bassole *et al.* 2001).

c. *Propriétés pharmacologiques*

Les feuilles de cette plante, à l'état frais et jeune sont consommées dans les salades et également utilisées pour la préparation des recettes de viande traditionnelles. Le centre blanc de la feuille est utilisé pour donner un goût de curry au plat (Khadri *et al.* 2006).

La médecine traditionnelle l'utilise comme: antidiarrhéique, antirhumatismal, carminatif, diaphorétique, stomachique, diurétique. Elle entre dans le traitement de la fièvre, de l'ictère etc. (Rizk *et al.* 1986) A. (1986, Atyat *et al.* 1995). La plante traite également les personnes atteintes de calculs rénaux (Hilo *et al.* 1996).

Il a été montré que les germes pathogènes d'animaux de compagnie sont sensibles à cette huile (Koba *et al.* 2004). L'activité antiparasitaire de l'HE de *Cymbopogon schoenanthus*

sur *Haemonchus contortus* est aussi connue (EL-Kamali *et al.* 2010). Les propriétés diurétiques de l'infusion de la plante ont été expérimentées avec succès (Al-Ghamdi *et al.* 2007). Les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de l'HE de la plante sont connues (Khadri *et al.* 2006). Cette huile inhibe fortement *Callosobruchus maculatus* (Ketoh *et al.* 2005, Ketoh *et al.* 2006). Les activités anticonvulsantes, insecticides, larvicides etc. de la plante ont été également décrites dans la littérature (Nonviho *et al.* 2010, Gbogbo *et al.* 2006).

2.1.11.3. *Eucalyptus citriodora* Hook

a. Origine et aspect physique

Le genre *Eucalyptus* de la famille des Myrtaceae (fig. 4), fut décrit et baptisé en 1788, après l'étude des échantillons d'*Eucalyptus obliqua* parmi les plantes australiennes récoltées (L'Heritier de Brutelles *et al.* 1789). L'eucalyptus est un grand arbre, à croissance rapide possédant des feuilles persistantes. Cette plante est originaire d'Australie et de Tasmanie. L'arbre peut atteindre 125 à 160 mètres. Cette plante originaire de l'Australie a été introduite dans nombre de régions tropicales, subtropicales et sud américaines.



Figure 4: Un arbre d'*Eucalyptus citriodora*

Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'eucalyptus assèche rapidement les marais qu'il colonise (Poore *et al.* 1986). Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria.

b. Composition chimique

L'HE d'*Eucalyptus citriodora* a été longuement étudiée au Bénin et partout dans le monde (Sohounhloue *et al.* 1996, Moudachirou *et al.* 1999). Les résultats obtenus après l'étude de la composition chimique de cette huile dans la sous-région et ailleurs sont similaires en ce qui concerne le taux du citronellal (composé majoritaire) (tableau 3). D'autres composés sont aussi présents dans cette huile en pourcentage non négligeable; il s'agit de l' α -pinène, du citronellole, de l'isopulégol (Sohounhloue *et al.* 1996, Silou *et al.* 2009, Lee *et al.* 2007, Rajeswara *et al.* 2003, Maciel *et al.* 2010).

c. Propriétés pharmacologiques

La littérature confère de nombreuses propriétés pharmacologiques à cette huile. L'essence extraite de la feuille d'*E. citriodora* repousse efficacement les insectes (Maciel *et al.* 2010). Les potentiels antimicrobiens et antibactériens de cette huile ont été également décrits (Sartorelli *et al.* 2007, Mateus Aparecido *et al.* 2010, Luqman *et al.* 2008, Oyedeji *et al.* 1999, Kumar *et al.* 1988). Récemment, une étude comparative des pouvoirs antimicrobiens sur les HE d'*E. citriodora* et d'*E. camaldulenses* a indiqué que celle de *E. citriodora* était beaucoup plus active sur les germes étudiés (Mohammed *et al.* 2012).

Elle inhibe les infections virales (Olivero-Verbel *et al.* 2010, Schnitzler *et al.* 2001). C'est un très bon analgésique et un anti-inflammatoire très pratique (Bedi *et al.* 2003, Silva *et al.* 2003, Atta *et al.* 1998). Elle est aussi connue pour ses propriétés herbicides (Singh *et al.* 2005).

Cette huile est utilisée pour purifier le sang, désinfecter l'air, et traiter les affections telles que. L'HE d'*Eucalyptus citriodora* soulage les crampes et les douleurs musculaires (Reiter *et al.* 1985).

Les propriétés antifongiques de l'huile sont également décrites dans la littérature (Lee *et al.* 2007, Musyimi *et al.* 2008, Ramezani *et al.* 2002).

L'huile est aussi un fébrifuge efficace, aide donc à réduire la fièvre (Low *et al.* 1990, Barr *et al.* 1988). En raison de ses propriétés d'humidification de la peau, elle est souvent utilisée comme ingrédient dans le shampooing antipelliculaire. Les propriétés relaxantes de l'HE ont été largement parcourues (Reiter *et al.* 1985).

Le citronellal, composé majoritaire de l'HE d'*Eucalyptus citriodora* à l'instar du citral possède des propriétés pharmacologiques qui lui sont propres. Cette molécule est un antidépresseur très pratique (Melo *et al.* 2010). Le citronellal ne manque pas non plus de propriétés larvicides (Barros *et al.* 2009).

2.1.12. Toxicité des HE des plantes étudiées

Quelques études toxicologiques ont été effectuées sur les HE des plantes décrites plus haut. Il a été constaté en 1981, que les plantes du genre *Eucalyptus* pourraient fatalement causer des irritations intestinales chroniques suite à leur usage interne (Morton *et al.* 1981). Les études plus récentes sur la toxicité et la tolérance gastrique de l'HE de *C. citratus* ont révélé qu'une dose supérieure ou égale à 1500 mg/kg de cette huile pourrait causer des dommages significatifs sur l'estomac et le foie (Fandohan *et al.* 2008). Nombres d'auteurs pensent que l'usage externe des HE limiterait leur agressivité et leur toxicité sur certains organes de l'homme (Belanger *et al.* 1994). Malheureusement, pour combattre certaines pathologies, l'administration par voie orale demeure le mode le plus commode. Toute substance agressive le long du tube digestif serait donc inopportune.

2.1.13. Importance des synthèses et héli-synthèses

L'usage des extraits de plantes a précédé celui des composés naturels de structure chimique connue et des composés inorganiques dans l'histoire de la thérapie moderne (Chadwick *et al.* 1990). La transformation de composés chimiques dérivés de plantes médicinales a commencé au début du XIXe siècle. La découverte et la fabrication des médicaments ont avancé avec l'avènement de la chimie de synthèse dans les années 1940 et 1950. La Vinblastine et la Vincristine (médicaments utilisés dans la chimiothérapie contre la prolifération des cellules cancéreuses) commercialisées respectivement en 1961 et 1963, ont été des médicaments très utiles d'origine végétale extraits de plantes utilisés comme une source de découverte pour les entités bioactives (Raskin *et al.* 2002).

Le XX^{ème} siècle est marqué par l'évolution du processus d'extraction de molécules naturelles et la fabrication de leurs analogues synthétiques (Raskin *et al.* 2002). Les composés synthétiques, identiques dans leur structure chimique et de mêmes propriétés biologiques ont partiellement substitué les principes actifs d'origine naturelle des médicaments. De nombreux composés bioactifs dérivés des plantes sont utilisés en tant que prototypes, où leurs structures sont connues et peuvent être utilisées comme modèles pour la modification structurelle afin de développer des médicaments plus efficaces et plus récents (programmes d'optimisation de structure) (Raskin *et al.* 2002, Heinrich *et al.* 2004). Quelques obstacles rencontrés dans l'utilisation des extraits des plantes pourraient se justifier par les points suivants :

- Les quantités de substances actives sont en pourcentage très faible dans les plantes. A l'échelle d'une population, cela demanderait des quantités énormes de matériel végétal. Pour des raisons écologiques, on est souvent obligé de recourir à la synthèse organique.
- La synthèse de certains principes actifs peut parfois paraître moins chère par rapport à leur extraction ou leur séparation.

- Les molécules actives sont souvent mélangées dans les plantes à d'autres substances non souhaitées qui pourraient fortement influencer leur efficacité ou leur toxicité.

Une héli-synthèse est un cas particulier de synthèse chimique. La molécule de départ est issue directement de substances naturelles. L'enjeu d'une héli-synthèse est une modification de cette molécule cible afin de lui faire acquérir des propriétés qu'elle n'avait pas. L'intérêt par rapport à une synthèse est d'économiser des étapes dans la fabrication. Dans le cas des huiles essentielles de *C. citratus*, de *C. schoenanthus* et d'*E. citriodora*, on pourrait héli-synthétiser à partir de leurs constituants majoritaires qui sont des composés carbonylés, des semi et thiosemicarbazones, des oximes, des hydrazones des carbazones etc. L'intérêt porté aux thiosemicarbazones est dû à leurs nombreuses propriétés pharmacologiques.

2.2 . Semicarbazones et thiosemicarbazones

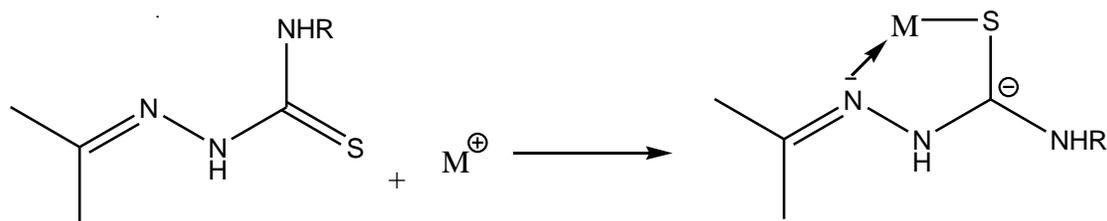
Les semicarbazones sont des molécules obtenues par une réaction de condensation d'un composé carbonylé avec un semicarbazide. Lorsque l'atome d'oxygène du semicarbazide est remplacé par un atome de soufre on parle de thiosemicarbazide et la réaction conduit à la formation d'une thiosemicarbazone.

2.2.1. Historique

Les semicarbazones et les thiosemicarbazones sont des composés qui ont été et qui continuent d'être étudiés à cause de leurs nombreuses propriétés pharmacologiques. Leurs traces remontent au début du XX^e siècle, mais les premiers rapports sur leurs applications médicales ont commencé à apparaître dans les années cinquante quand ces molécules faisaient partie des médicaments contre la tuberculose et la lèpre (Bavin *et al.* 1950, Koch *et al.* 1950). Dans les années soixante leurs propriétés antivirales ont été

découvertes, de nombreuses recherches ont été menées et ont conduit à la commercialisation de méthisazone, Marboran[®], pour traiter la variole (Kune *et al.* 1964).

Durant cette période, l'un des résultats les plus importants concernait aussi leurs activités antitumorales (Sartorelli *et al.* 1967). Récemment la Triapine[®] (3-aminopyridine-2-carboxaldéhyde thiosemicarbazone) a été développée comme un médicament anticancéreux et a atteint la phase clinique (II) sur plusieurs types de cancer (Traynor *et al.* 2009, Mackenzie *et al.* 2007, Nutting *et al.* 2009, Ma *et al.* 2008). D'après la littérature, les complexes métalliques des thiosemicarbazones possèdent d'excellentes propriétés pharmacologiques parfois plus intéressantes que celles des ligands qui constituent les thiosemicarbazones (fig. 5). La présence d'un ion métallique augmenterait l'activité ou contribuerait à atténuer les effets secondaires des composés organiques parents (French *et al.* 1965).



M^{\ominus} est un ion métallique

Figure 5 : Exemple de complexe métallique de thiosemicarbazone

De façon particulière, certaines activités des thiosemicarbazones du citral et du citronellal commerciaux ont été aussi étudiées. Certains auteurs ont indiqué la synthèse et la caractérisation des thiosemicarbazones non substituées du citral et du citronellal commerciaux (Tarasconi *et al.* 2000).

D'autres études ont conduit à la synthèse des 4-aryl halogénures substitués du citral semicarbazone et de la carvone semicarbazone (Aggarwal *et al.* 2008). De ces études, il ressort que ces molécules présentent d'excellentes activités anticonvulsives. Leur

avènement s'est avéré salutaire car les médicaments antiépileptiques connus jusqu'en 2004, en plus parfois de leur toxicité ne sont efficaces qu'à 75% (McNamara *et al.* 2001, Porter *et al.* 1985).

2.2.2. Propriétés pharmacologiques des thiosemicarbazones

2.2.2.1. *Inhibition de la Ribonucléotide réductase*

L'un des domaines les plus prometteurs dans lequel les molécules de thiosemicarbazones sont en cours de développement est celui qui concerne la cancérologie. Leur activité anti-tumorale est extrêmement différenciée et elle est très dépendante de la typologie des cellules tumorales. Cette caractéristique rend l'ensemble de la classe des thiosemicarbazones très intéressante, car elle implique une sélectivité rigoureuse vis-à-vis des cellules tumorales et cancérigènes. A l'heure actuelle, les principaux effets connus liés à leur activité anticancéreuse sont, dans l'ordre de la découverte de l'inhibition de la ribonucléotide réductase (RR) (Brockman *et al.* 1970), inhibition des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Shao *et al.* 2006), l'inhibition de la topo-isomérase (II) (Hall *et al.* 2000), la perturbation des mitochondries (Yuan *et al.* 2004), et, plus récemment l'inhibition d'une protéine multi-résistance (MDR1) (Ludwig *et al.* 2006, Wu *et al.* 2007). En effet, la compréhension de l'effet antitumoral des thiosemicarbazones a été explorée dans les années 50 (Brockman *et al.* 1956, French *et al.* 1965).

Une première hypothèse de l'action de ces composés est basée sur la formation constante de leurs complexes métalliques, et leur capacité à séquestrer le fer de l'environnement cellulaire. Les exigences relatives à l'activité chélatrice ont été identifiées avec un système NNS chélateur. Sartorelli *et al.* ont observé l'incorporation de ces composés dans l'ADN des cellules et ont, à cet effet, proposé un mécanisme par lequel ces molécules inhibent la ribonucléotide réductase (Opletalová *et al.* 2008, Sartorelli *et al.* 1971). L'inhibition de cette enzyme entraîne un blocage de la synthèse en phase du cycle cellulaire et éventuellement la mort cellulaire par apoptose. En fait, il a été découvert plus tard que les complexes de fer et de cuivre sont de loin plus actifs que leurs ligands libres (Antholine *et*

al. 1976). Un mécanisme raisonnable a prouvé que les médicaments à base de thiosemicarbazones inhibent l'enzyme de la ribonucléotide réductase en détruisant les radicaux (Thelander *et al.* 1983). Le fait que le 1-formylisoquinolinethiosemicarbazone et la 2-formylpyridinethiosemicarbazone inhibent fortement la ribonucléotide réductase a donné une indication indirecte selon laquelle l'enzyme devrait avoir une poche hydrophobe ou un patch avec lequel le système aromatique interagit, ce qui pourrait justifier le fait que la méthylation sur le cycle aromatique de 2-formylpyridinethiosemicarbazone rend ce composé plus actif (Thelander *et al.* 1983, Agrawal *et al.* en 1974). De récents articles ont rapporté la synthèse, la caractérisation et les essais biologiques des complexes de Fe (III) et Ga (III) de diverses thiosemicarbazones (Kowol *et al.* 2007a). La 2-acétylpyridine-N,N-diméthylthiosemicarbazone, la 2-acétylpyridine-N-pyrrolidinylthiosemicarbazone, l'acétylpyrazine-N,N-diméthylthiosemicarbazone, l'acétylpyrazine-N-pyrrolidinylthiosemicarbazone et l'acétylpyrazine-N-pipéridinylthiosemicarbazone ont été étudiées. Leurs complexes correspondants aux ligands ont été testés *in vitro* avec succès pour leur activité anti-proliférative sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines (41M et SK-BR-3).

Plus tard en 2009, les mêmes auteurs ont observé que la coordination de gallium (III) augmente la cytotoxicité, tandis que le complexe de fer (III), montrent une réduction de l'activité cytotoxique. Ces composés ont été aussi testés pour la capacité de l'inhibition de la ribonucléotide réductase par incorporation de 3H-cytidine dans l'ADN dans une solution de protéines purifiées et dans des cellules entières (Kowol *et al.* 2009).

Ils ont également essayé de voir l'influence du changement de l'hétéroatome dans les molécules de 2-acétylpyridine-N,N-selenosemicarbazone, de diméthylsemicarbazone et de N-2-acétylpyridine-N-diméthylthiosemicarbazone sur les mêmes lignées cellulaires (41M et SK-BR-3) (Kowol *et al.* 2007b). De cette étude, il résulte que l'activité anti-proliférative est fortement dépendante de l'hétéroatome (O, S, Se) et qu'elle augmente dans l'ordre $Se > S \gg O$. Cette observation pourrait suggérer un rôle possible de

l'hétéroatome sur la stabilisation d'une forme hypothétique anionique ou une espèce radicale (cette dernière conduirait alors à l'extinction du radical tyrosine dans la ribonucléotide réductase). La réactivité du soufre dans les thiosemicarbazones avec les cystéines est en effet envisagée par des chercheurs qui proposent, en tant que mécanisme d'action, une attaque nucléophile d'une teneur en soufre de cystéine sur le fragment de thionyle (Trossini *et al.* 2009). L'intermédiaire formé est stabilisé, dans leur modèle, par la présence d'une histidine mais il pourrait être encore mieux stabilisé par un centre métallique. Évidemment, cette réaction est réversible.

En résumé, Les agents « alkylants » que constituent les thiosemicarbazones induisent une modification chimique des molécules qui entrent dans la composition de l'ADN et entravent sa réplication, ce qui aboutit à la mort de la cellule touchée.

L'activité anticancéreuse des thiosemicarbazones est donc connue depuis très longtemps et continues de faire l'objet de plusieurs travaux scientifiques (Jevtović *et al.* 2010a, Ferrara *et al.* 2010, Jevtovic *et al.* 2010b, Palanimuthu *et al.* 2013).

2.2.2.2. *Inhibition de la Topo-isomérase II et interactions avec l'ADN*

La planéité de nombreux complexes suggèrent un comportement possible d'intercalation d'ADN vers une autre cible possible récemment identifiée dans la topo-isomérase II. La topo-isomérase est une protéine nucléaire de cellules eucaryotes qui empêche le passage à travers une hélice d'ADN en évitant ainsi la réplication de l'ADN (Larsen *et al.* 1998, Larsen *et al.* 1996,). La topo-isomérase II est nécessaire pour la synthèse de l'ADN et la division cellulaire des cellules à prolifération rapide. Les tumeurs contiennent généralement des niveaux élevés de cette enzyme, ce qui explique le comportement des cellules cancéreuses. L'activité inhibitrice de la topo-isomérase II des thiosemicarbazones, se déroule par stabilisation des produits clivables formés par la topo-isomérase II de l'ADN (Easmon *et al.* 2001, Chen *et al.* 2004).

2.2.2.3. *Thiosemicarbazones contre la résistance hypoxique*

Un autre domaine dans lequel les complexes métalliques de thiosemicarbazone reçoivent beaucoup d'attention est leur utilisation comme supports pour les radio-traceurs comme ^{64}Cu . Cette technique est particulièrement utile dans les tumeurs solides. L'hypoxie se produit souvent lorsque la tumeur devient trop grande pour son apport vasculaire et les cellules ont tendance à s'adapter en régulant à la hausse la production de nombreuses protéines qui favorisent leur survie. L'hypoxie tumorale résiste souvent à la chimiothérapie, mais beaucoup de travaux ont montré que la voie des thiosemicarbazones est prometteuse (Dietz *et al.* 2008, Lewis *et al.* 2008, Jalilian *et al.* 2009, Dehdashti *et al.* 2008, Matarrese *et al.* 2010, Krohn *et al.* 2008).

2.2.2.4. *Activité antimicrobienne et antibactérienne*

L'action inhibitrice très intéressante des thiosemicarbazones sur plusieurs microorganismes *Bacillus Subtilis*, *Enterobacter aeruginosa*, *Eschericia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Candida albicans*, et *Saccharomyces cerevisiae* a été démontrée (Choudharya *et al.* 2011, Lessa *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2013). Le même travail réalisé au Bénin sur la semicarbazone et la thiosemicarbazone de la carvone a montré que ces molécules inhibent de façon significative les microbes et les champignons utilisés (Fatondji *et al.* 2010b).

2.2.2.5. *Activité antitrypanosomienne et antipaludique*

En effet, le paludisme et la trypanosomose humaine africaine (THA) font partie des maladies parasitaires à transmission vectorielle constituant des menaces constantes de santé publique et souvent multiples dans de vastes zones géographiques. Elles représentent 17% des maladies infectieuses et figurent parmi les plus importantes pathologies en santé humaine, tant par la morbidité que par la mortalité qu'elles entraînent.

Parmi les molécules les plus prometteuses en cours de développement contre ces maladies, il y a aussi les thiosemicarbazones, leurs dérivés nitrés et leurs complexes

métalliques. Des études ont été publiées sur l'activité de la 5-nitrofuryl-3-thiosemicarbazoneacroléinepalladium (II) sur les parasites de trypanosome (Otero *et al.* 2006). La plupart des complexes ont montré une grande activité *in vitro* d'inhibition de la croissance de *Trypanosoma cruzi* supérieure à celle du Nifurtimox : médicament utilisé dans le traitement de la maladie. Pérez-Rebolledo *et al.* rapportent que des dérivés N-4 substitués de la 4-nitroacétophénonthiosemicarbazone ainsi que leurs complexes de cuivre (II) de formule générale $[CuL_2]$ testés *in vitro* inhibent la croissance de la forme épimastigote de *Trypanosoma cruzi* (Pérez-Rebolledo *et al.* 2008).

Etant donné les effets secondaires graves des médicaments utilisés pour le traitement de ces maladies, les thiosemicarbazones pourraient constituer une nouvelle classe de médicaments candidats contre la trypanosomose sous toutes ses formes (Vieites *et al.* 2008, Glinma *et al.* 2012). Toutes les recherches sur le mécanisme d'action trypanocide des thiosemicarbazones s'accordent principalement sur la forte inhibition de la croissance des parasites à travers une double voie impliquant la production de radicaux libres toxiques par bioréduction des thiosemicarbazones en interaction avec l'ADN. Beaucoup de travaux ont aussi indiqué l'activité trypanocide des complexes métalliques des thiosemicarbazones.

Biot *et al.* ont en 2007 rapporté la synthèse et l'évaluation de l'activité antipaludique de thiosemicarbazones et de leurs complexes de fer qui se sont révélés très actifs contre les parasites responsables de la maladie. D'autres auteurs ont également apprécié la puissante activité antipaludique de thiosemicarbazones (Pingaew *et al.* 2010).

2.2.3. Mode d'action des thiosemicarbazones

Les thiosemicarbazones sont susceptibles d'inhiber les cystéine protéases telles que les cathepsines: TbcapB et rodesain. Ces protéases seraient impliquées dans l'absorption de nutriments, la dégradation des protéines de l'hôte, la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte, ou la traversée de la barrière hémato-encéphalique et sont essentielles à la survie

du parasite (Caffrey *et al.* 2001, Mackey *et al.* 2004). L'inhibition de ces protéases par les thiosemicarbazones conduirait à la mort du parasite.

2.2.4. Toxicité des thiosemicarbazones

Les études toxicologiques menées sur les thiosemicarbazones ne mentionnent point leur agressivité face à l'estomac et aux parois intestinales. En 2002, la pharmacocinétique et les tests cliniques en phase I de la 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP), par injection intraveineuse (Feun *et al.* 2002) ont été étudiés. Il ressort que la molécule n'induit aucun effet toxique même suite à une injection d'une dose élevée.

2.3 . Trypanosomose

Les pays en voie de développement comme ceux de l'Afrique subsaharienne, payent le tribut le plus lourd aux maladies infectieuses et parasitaires ; ce continent où le contexte géographique lie un milieu naturel propice au développement de nombreux micro-organismes à des données humaines complexes et difficilement maîtrisables (urbanisation rapide, inadaptation des habitats urbains aux climats et aux structures familiales, complexe gestion des déchets) conjugue bien des difficultés (Prost *et al.* 1989). Cet ensemble de relations politiques, économiques, sociales et culturelles que certains regroupent sous le terme « d'écologie politique de la maladie » (*political ecology of disease*) compose une totalité complexe constituant le socle sur lequel vont se développer les pathologies. À côté de tout cela, se superpose malheureusement le cas des maladies réémergentes comme les infections respiratoires aiguës, les maladies diarrhéiques et les dysenteries, les méningites, les leishmanioses, la maladie du sommeil, les filarioses et la bilharziose (Cattand *et al.* 2001).

La trypanosomose humaine africaine (THA) encore appelée maladie du sommeil, est une maladie parasitaire endémique touchant de nombreux pays de l'Afrique Subsaharienne. Elle se manifeste aussi bien chez les animaux (trypanosomose animale africaine (TAA))

que chez les hommes (trypanosomose humaine africaine (THA)). Le nombre de trypanosomés identifiés dans certaines régions au cours de ces dernières décennies nous laisse sceptique par rapport à la question liée à l'éradication de la maladie (Van *et al.* 1999).

Les parasites responsables de la maladie sont des protozoaires sanguicoles, *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) en Afrique de l'ouest et centrale, *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'est (Louis *et al.* 2004). Ils sont transmis à l'homme par un arthropode vecteur hématophage : la glossine ou mouche tsé-tsé (Van *et al.* 1999).

2.3.1. Les parasites de trypanosomes

Les trypanosomes appartiennent à un grand groupe de protozoaires caractérisés par la possession, au moins à un moment du cycle de développement, d'un kinétoplaste d'où part un flagelle. Les protozoaires flagellés (fig. 6) agents de la THA appartiennent à l'ordre des Kinetoplastida, famille des Trypanosomatidae, section Salivaria (trypanosomes transmis par la salive des vecteurs), genre *Trypanosoma*, sous-genre *Trypanozoon*, espèce *brucei*. Plusieurs sous-espèces de *Trypanosoma brucei* sont décrites : parmi elles *T. b. brucei*, qui par définition n'est pas pathogène pour l'homme mais coexiste dans les réservoirs d'animaux et chez la glossine avec les deux autres sous-espèces pathogènes pour l'homme, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*.

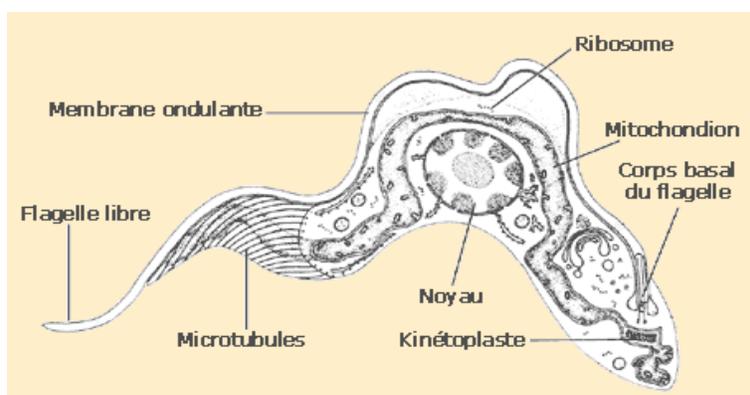


Figure 6: Schéma d'un trypanosome

2.3.2. Cycle évolutif du parasite

La surface cellulaire des trypanosomes africains est constamment remodelée. Dans les formes sanguines, la membrane plasmique est complètement recouverte à sa partie externe d'une couche épaisse de glycoprotéines. Ces glycoprotéines initient une réponse immunitaire efficace, mais la variation des épitopes de ces molécules très antigéniques permet au trypanosome d'échapper à la réponse humorale de l'hôte, d'où leur appellation de glycoprotéines variables de surface (Variant Surface Glycoprotein, VSG). Quand les trypanosomes se retrouvent dans l'intestin de la glossine à la suite d'un repas de sang, la VSG est remplacée à la surface des formes procycliques par une glycoprotéine invariable, la procycline. La VSG est à nouveau exprimée à la surface des trypanosomes métacycliques infectants pour l'homme, dans les glandes salivaires (Askonas *et al.* 1984). Les diverses étapes sont représentées à la figure 7.

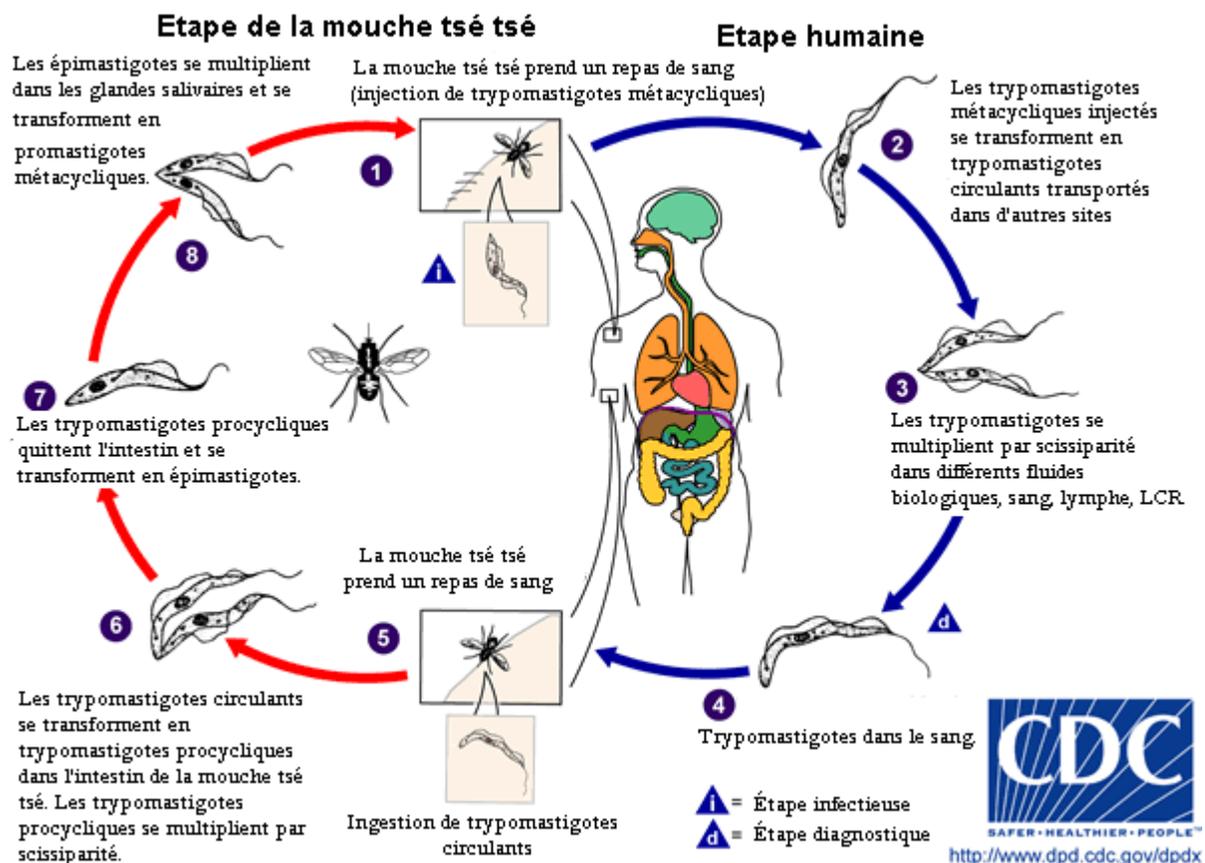


Figure 7 : Cycle évolutif du parasite chez l'homme et le vecteur

Au moment de la piqûre, les trypanosomes métacycliques présents dans le proboscis et les glandes salivaires sont injectés dans les tissus de l'hôte. Ils peuvent alors se multiplier localement, entraînant une réaction inflammatoire et la formation d'une ulcération non suppurative, le chancre (Fig. 8).



Figure 8 : Chancre au cou et ulcération à l'épaule des trypanosomés

A partir du chancre, les trypanosomes sont acheminés par la lymphe dans les ganglions lymphatiques et par le sang à tout l'organisme. Les trypanosomes se divisent sous forme de trypomastigotes très longs et fins qui sont recouverts d'une glycoprotéine particulière. Cette VSG porte un type antigénique variable (VAT) qui est reconnu par le système immunitaire de l'hôte. Des anticorps sont formés contre ce VAT et la population qui porte ce VAT est détruite. Cependant, quelques trypanosomes expriment un VAT différent sur leur VSG. Ils survivent à cette réaction d'immunité humorale de l'hôte et donnent une nouvelle vague de parasitémie jusqu'à ce qu'ils soient détruits à leur tour par de nouveaux anticorps. L'infection évolue ainsi par vagues parasitémiques successives comportant des trypanosomes porteurs de VAT différents. Ce phénomène est appelé variation antigénique. Le nombre de VAT exprimables est très important, sous contrôle de nombreux gènes du parasite ; le parasite peut ainsi échapper à la réaction immunitaire de son hôte. Chaque vague parasitémique est suivie par un accès fébrile correspondant à la destruction des trypanosomes circulants. Après un certain temps d'évolution non connu, certains trypanosomes traversent la barrière hémato-encéphalique pour envahir le système nerveux central. Quelques trypanosomes subissent une évolution différente, ils se

transforment en formes trypomastigotes courtes et trapues qui ne se divisent plus chez l'hôte vertébré mais qui sont infectantes pour les glossines (Poinsignon *et al.* 2007).

2.3.3. Animal vecteur : mouche tsé-tsé

Les mouches tsé-tsé appartiennent au genre *Glossina* qui est habituellement divisé en trois groupes d'espèces. Le groupe *fusca* (sous-genre *Austenina*) inclut des vecteurs transmettant des trypanosomes responsables de maladies animales. Les deux autres groupes ont une importance en médecine humaine : les espèces du groupe *palpalis* (sous-genre *Nemorhina*) transmettent *T. gambiense* en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale, celles du groupe *morsitans* (sous-genre *Glossina*) transmettent *T. rhodesiense* en Afrique de l'Est (Vesten *et al.* 1971).

Les glossines sont des mouches de grande taille, 6 à 15 mm de longueur, avec un proboscis bien marqué (fig. 9). Durant le repas de sang, les parties buccales sont abaissées à 90° par rapport à l'axe du corps de l'insecte. Les mouches mâles et femelles se nourrissent exclusivement du sang de vertébrés.



Figure 9 : Photo de la mouche tsé-tsé

L'habitat des espèces du groupe *palpalis* est constitué par les rives des lacs et les berges des rivières en zone forestière ou anciennement forestière (forêt galerie). Certaines espèces de ce groupe se sont adaptées au changement d'environnement lié aux activités humaines, en particulier agricoles (plantations de caféiers, de cacaoyers). Ce groupe comprend *G. palpalis*, *G. tachinoides* et *G. fuscipes*. L'homme constitue le réservoir principal de parasites, bien que certaines espèces animales, en particulier domestiques (cochons, moutons, chèvres), puissent jouer un rôle dans le cycle dans quelques foyers de transmission (Brunhes *et al.* 1999).

La mouche tsé-tsé ne vit malheureusement qu'en Afrique, dans un secteur situé au sud du Sahara (fig. 10). Elle se nourrit exclusivement du sang de l'homme et des animaux domestiques et, bien entendu, des animaux sauvages. C'est ainsi qu'elle acquiert et transmet les trypanosomes qui provoquent le nagana (Trypanosome chez le bétail) et la maladie du sommeil. C'est parce qu'elle répand ces maladies qu'elle est si redoutable.



Figure 10: Région regorgeant de mouches tsé-tsé

2.3.4. Infestation, symptômes

L'expression clinique de la maladie n'est ni simple ni univoque. La THA, d'évolution très lente (plusieurs mois à plusieurs années), est constamment mortelle sans traitement (Vickerman *et al.* 1985, Askonas *et al.* 1984). Elle peut être résumée à 3 phases, en précisant que les symptômes décrits ne sont ni constants ni spécifiques :

- Les suites immédiates de la piqûre par la mouche tsé-tsé : la piqûre de la mouche est douloureuse, mais elle est banale en zone d'infestation par les glossines. Au point de la piqûre se développe un chancre d'inoculation qui, le plus souvent, n'attire pas l'attention.

- La phase de diffusion lymphatico-sanguine du parasite : la multiplication du parasite et sa diffusion dans l'organisme se traduit par quelques signes de valeur inégale. Le plus fréquent et le plus caractéristique est le développement d'adénopathies dans la région cervicale. L'adénopathie est de taille modérée, ferme, indolore, mobile sur les plans profonds. Un autre symptôme, de faible valeur dans des régions où les parasitoses tissulaires sont fréquentes, est le prurit souvent intense accompagné de lésions de grattage. Plus intéressante est la bouffissure du visage, et notamment des paupières, donnant au sujet un classique aspect mongoloïde.
- la phase de polarisation neurologique débute au moment où les trypanosomes franchissent la barrière hémato-encéphalique. Le franchissement de la barrière hémato-encéphalique par le trypanosome est avéré lorsque les signes cliniques et biologiques d'une méningo-encéphalite sont présents et que le trypanosome a été isolé du liquide céphalo-rachidien. Le tableau clinique est très variable et fonction de la région cérébrale la plus touchée. On décrit des syndromes psychiatriques, des crises convulsives, des syndromes cérébelleux, pyramidaux, extrapyramidaux, etc. A ce stade de la maladie, les troubles du sommeil sont les plus caractéristiques. L'atteinte est, tout au moins au début de la maladie méningo-encéphalitique, de nature certainement plus fonctionnelle que lésionnelle, car elle se normalise rapidement sous l'effet du traitement. Sans traitement, l'évolution inexorable se fait vers la cachexie et la mort.

De part sa localisation géographique, la trypanosomose humaine africaine (THA) sévit dans un environnement qui explique la difficulté de la prise en charge des malades. La THA a été qualifiée de maladie située «au-delà du bout de la piste », difficile à dépister et à traiter, même dans les régions où les médicaments sont disponibles.

Le traitement de la THA est compliqué par : la nécessité d'un traitement différent en fonction du stade, l'existence de chimiorésistances, la nécessité d'un suivi, au moins 2 ans, des patients pour affirmer la guérison.

2.3.5. Médicaments et traitement

Seuls quelques médicaments sont actifs et accessibles pour le traitement de la THA (tableau 1). Cette situation ne s'est pratiquement pas améliorée depuis 40 ans.

Le traitement au stade hémo- lymphatique n'a pas évolué. Il demeure basé sur la pentamidine (Pentacarinat®), la suramine (Germanin®) et parfois l'acéturate de diminazène (Bérénil®, bien qu'uniquement autorisé pour usage vétérinaire). Au stade nerveux, le traitement repose toujours sur l'emploi du mélarsoprol (Arsobal®), même si ce produit ne répond pas aux critères actuels de mise sur le marché en raison de sa toxicité. L'efficacité de l'éflornithine (Ornidyl®) (Ollivier *et al.* 2001) et celle du nifurtimox (Lampit®) sont connues depuis une vingtaine d'années (Atouguia *et al.* 1999).

Tableau 1. Produits disponibles pour le traitement de la trypanosomose humaine africaine.

Médicaments	Mise sur le marché	Activité	Utilisation	Voie	Remarques
Pentamidine	1937	<i>T. b. gambiense</i>	Stade 1	IM	Echecs thérapeutiques signalés
Suramine	1922	<i>T. b. rhodesiense</i> (<i>T. b. gambiense</i>)	Stade 1	IV	Non recommandée pour <i>T. b. gambiense</i>
Mélarsoprol	1949	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	Stade 2	IV	2 à 12 % de mortalité (encéphalopathies) Echecs thérapeutiques signalés
Eflornithine	1981	<i>T. b. gambiense</i>	Stade 2	IV	Difficulté d'administration Pas d'activité sur <i>T. b. rhodesiense</i>
Nifurtimox	1960	<i>T. b. gambiense</i>	Stade 2	<i>per os</i>	Pas d'autorisation pour la THA Activité sur <i>T. b. rhodesiense</i> inconnue

IM: voie intramusculaire; *IV*: voie intraveineuse

2.3.5. 1. Pentamidine (pentamidine iséthionate BP, Pentacarinat®)

La pentamidine est une diamidine aromatique (fig. 11). Seule la pentamidine iséthionate est disponible de nos jours. Le mode d'action exact reste inconnu.

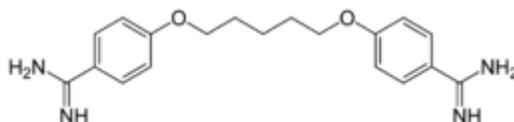


Figure 11: Structure de la Pentamidine

Cette molécule peut inhiber de façon réversible la S-adénosyl-L-méthionine décarboxylase et jouer un rôle dans la biosynthèse des polyamines. L'effet trypanocide ne semble pourtant pas lié à ce mécanisme. Un transport actif lui permet de se concentrer dans le cytoplasme du trypanosome. Des souches de trypanosomes sont résistantes par diminution de ce mécanisme de transport du médicament. La pentamidine est le traitement de choix pour l'infection au stade 1 à *T. b. gambiense*, elle donne des résultats plus variables pour *T. b. rhodesiense* (Bronner *et al.* 1991).

2.3.5. 2. Suramine (Bayer 205, Germanin®)

Ancien produit, issu de la modification chimique d'un colorant, le trypan violet, la suramine est une naphthylamine sulfatée de masse molaire moléculaire élevée (fig. 12). Cette molécule ancienne a bénéficié d'un regain d'intérêt dans l'infection à VIH et les cancers en raison de son action inhibitrice sur différents systèmes enzymatiques (Villalona-Calero *et al.* 2008).

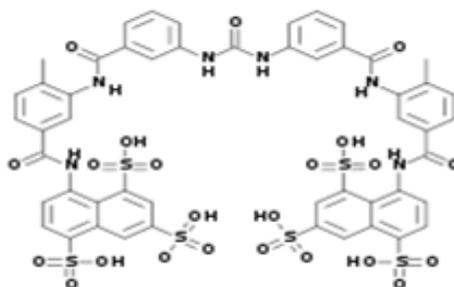


Figure 12: Structure de la suramine

Elle inhibe de nombreuses enzymes du trypanosome et particulièrement l'ensemble des enzymes de la glycolyse (Nok *et al.* 2003). La suramine est absorbée par pinocytose (désigne le mécanisme d'ingestion de liquide situé en dehors des cellules par une variété de globules blancs, les macrophages) et son action trypanocide est lente suggérant qu'elle n'a pas accès directement aux enzymes qu'elle inhibe sauf peut-être au moment de leur présence intracytoplasmique.

La suramine est le traitement de choix pour les infections à *T. b. rhodesiense* au stade 1. Ce médicament est également efficace pour les infections à *T. b. gambiense*, mais en raison des risques de choc brutal en cas d'infection à *Onchocerca volvulus*, la pentamidine lui est préférée. En se basant sur les signes cliniques de patients infectés par *T. b. rhodesiense*, sans réaliser de ponction lombaire, le traitement par la suramine entraîne jusqu'à 49 % de rechutes.

Les principaux effets secondaires sont des réactions fébriles, des éruptions cutanéomuqueuses, des nausées, des vomissements, des polyneuropathies, une toxicité hématologique pouvant atteindre les trois lignées et, rarement, une insuffisance rénale (Louis *et al.* 2003).

2.3.5. 3. Mélarsoprol (Mel B, Arsobal®)

Le mélarsoprol est un produit qui associe un dérivé organique trivalent de l'arsenic, à un chélateur de métaux lourds (fig. 13).

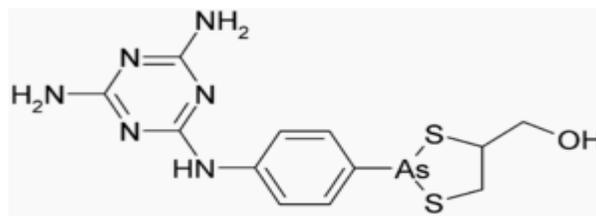


Figure 13: Structure du mélarsoprol

Cette combinaison a permis de diminuer la toxicité du produit sans pour autant perdre son efficacité. La résistance au mélarsoprol serait principalement induite par une diminution de son transport dans le trypanosome (Burri *et al.* 2000).

Ce médicament demeure actuellement le seul traitement qui pourrait être utilisé dans les 2 stades et pour les 2 formes de la maladie. Cependant, sa toxicité et les difficultés d'administration nécessitent beaucoup de prudence et on ne devrait l'utiliser qu'avec la certitude d'une trypanosomose au stade nerveux (Blum *et al.* 2001). Les schémas de traitement varient d'un pays à l'autre, avec des doses totales différentes mais avec une efficacité comparable et relativement constante au fil des années. Dans les infections à *T. b. gambiense*, l'adjonction d'un pré-traitement à la pentamidine, stérilisant le système hémolymphatique, a peut-être retardé l'apparition de résistance. Globalement, les résistances s'observent chez 10 % à 30 % des patients.

Le mélarsoprol est principalement neurotoxique avec la possibilité de survenue d'encéphalopathies mortelles (Blum *et al.* 2001). On a décrit également des cas de convulsions isolées, de neuropathies périphériques, de céphalées, de tremblements, de réactions fébriles, de douleurs abdominales, de douleurs thoraciques, d'éruptions cutanées, de thrombophlébites périphériques liées à l'injection IV, enfin une toxicité cardiaque, rénale, hépatique et des possibilités d'agranulocytose. La mortalité globale varie de 2 % à 9,8 % pour *T. b. gambiense* et de 3,4 % à 12 % pour les infections à *T. b. rhodesiense*. L'origine précise de cette toxicité reste inconnue mais le solvant (propylène glycol) lui-même et l'agent détoxifiant (dimercaprol) inclus dans ce produit peuvent contribuer à cette toxicité.

2.3.5. 4. *Eflornithine (DFMO, Ornidyl®)*

Ce médicament, développé au début des années 1980 dans le cadre de la recherche anticancéreuse s'est avéré trop toxique pour cette prescription, mais actif sur le trypanosome *in vivo* (burri *et al.* 2003).

L'éflornithine (DL- α -difluorométhylornithine) (fig. 14) est un inhibiteur spécifique et irréversible de l'ornithine décarboxylase du trypanosome.

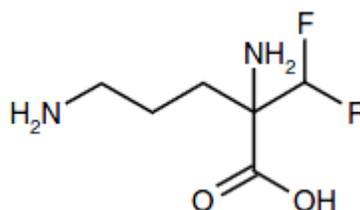


Figure 14: Structure de l'éflornithine

La décarboxylation de l'ornithine est une étape obligatoire dans la biosynthèse des polyamines indispensables à la différenciation et à la division cellulaire. L'inactivation de l'ornithine décarboxylase transforme le trypanosome en une forme courte de type métacyclique incapable de modifier ses antigènes de surface et de se diviser, rendant les réactions immunitaires de l'hôte plus efficaces.

L'éflornithine est efficace aux 2 stades de l'infection à *T. b. gambiense*, mais décevante pour l'infection à *T. b. rhodesiense*. Ce traitement est coûteux, d'administration difficile et compliquée. Il peut cependant être une alternative en cas de rechute au mélarsoprol (Legros *et al.* 1999).

Faisant partie de la lignée des chimiothérapies anticancéreuses, cette molécule présente des effets secondaires similaires : anémie, leucopénie, diarrhées, convulsions, vomissements, thrombopénie, fièvre, douleurs abdominales, céphalées, alopecies, anorexie, vertiges, surdité brutale. Les épisodes de convulsions surviendraient plutôt pendant la première semaine de traitement sans récurrence ultérieure.

2.3.5. 5. Nifurtimox (Bayer 2505, Lampit®)

Le nifurtimox est un 5-nitrofurane (fig. 15), commercialisé dans les années 1960, pour le traitement de la trypanosomose américaine ou maladie de Chagas (Jeganathan *et al.*

2011). Son mécanisme d'action repose sur la genèse de radicaux libres par la réduction du nitrofurane et leur liaison à des protéines et à l'ADN.

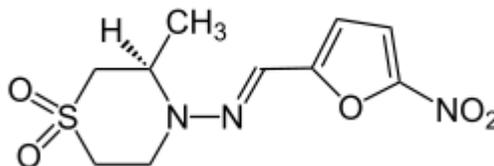


Figure 15: Structure du Nifurtimox

La distribution de ce médicament dans l'organisme est large et l'étude de sa distribution chez les rats révèle la présence du produit dans tout l'organisme, y compris le cerveau et la moelle épinière. Le marquage a également permis de suivre les métabolites et de conclure à un rapide métabolisme du nifurtimox dans le foie (Jeganathan *et al.* 2011).

Cette molécule est active aux 2 stades de l'infection à *T. b. gambiense*. On ne connaît pas son efficacité sur *T. b. rhodesiense* (Legros *et al.* 2008).

Les principales observations révèlent des atteintes du système nerveux central à type de convulsions ou de réactions psychotiques, des neuropathies périphériques ainsi que des atteintes de la sphère digestive à type d'anorexie, de nausées, de vomissements et de perte de poids.

2.3.6. Trypanosomiase animale

La trypanosomose est une contrainte majeure à l'élevage de ruminants en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud. Les principales espèces d'hôtes affectées varient du point de vue géographique mais les buffles, les bovins, les dromadaires et les chevaux y sont particulièrement sensibles. Des infections naturelles à *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei* et *T. evansi* ont été décrites chez les caprins. La trypanosomose chez les caprins produit des formes aiguë, subaiguë, chronique ou subclinique, *T. vivax*, *T. congolense* et *T. evansi* étant les trypanosomes les plus agressifs pour les caprins. Cependant, le rôle des

caprins dans l'épidémiologie de la trypanosomose est largement discuté mais mal compris. Par conséquent, il a été supposé que la trypanosomose présente une évolution subclinique et que les caprins ne jouent pas un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie. Cela peut être dû en partie à la parasitémie causée par les trypanosomes qui a été considérée faible chez les caprins. Cette supposition est actuellement réévaluée car il est possible que les caprins servent également de réservoir d'infection trypanosomienne pour d'autres espèces, y compris les humains dans le cas de *T. brucei rhodesiense* (Maharjan *et al.* 2006, Gutierrez *et al.* 2006).

2.3.7. Conséquences de la maladie

La trypanosomose transmise par les glossines est une maladie unique à l'Afrique et affecte à la fois les humains et les animaux. Le nagana (Trypanosomose chez le bétail) a un grave impact sur l'agriculture africaine; on estime que les pertes annuelles en ce qui concerne la production de bovins uniquement sont de l'ordre de 1,0 à 1.2 milliards de dollars. Il faut y ajouter les effets négatifs indirects engendrés par la trypanosomose sur la production agricole totale. La présence de la maladie a une influence sur l'endroit où les gens décident de vivre, sur la façon dont ils gèrent leur bétail et sur l'intensité de l'agriculture. Les effets combinés résultent en des changements de l'utilisation des terres et de l'environnement et ils affectent le bien-être des humains et accroissent la vulnérabilité des activités agricoles (Boelaert *et al.* 2010).

En somme, les produits disponibles pour le traitement de la THA sont peu nombreux et souvent toxiques. La disponibilité future de ces produits n'est pas certaine et les cliniciens sont souvent confrontés à des échecs thérapeutiques (de Koning *et al.* 2001). La recherche et le développement de nouveaux médicaments spécifiques ont été délaissés pendant plusieurs années, malgré les grands progrès réalisés dans la connaissance des trypanosomes. Il est donc urgent d'intensifier et de faciliter la recherche de nouveaux produits adéquats et surtout non toxiques, contre ces genres de parasites.

2.4 . Etudes toxicologiques

Afin de garantir l'innocuité des produits destinés à l'homme dans les conditions d'emploi prévu, des études toxicologiques doivent être réalisées sur des animaux de laboratoire. Les tests de toxicité aiguë constituent à cet effet une étape préliminaire aux expérimentations précliniques qui représentent un préalable indispensable à tout essai chez l'être humain.

La toxicologie est définie comme l'étude des agents chimiques ou physiques qui interagissent avec les systèmes biologiques pour produire une réponse dans les organismes. La toxicité quand à elle, est la capacité relative d'une substance à causer un dommage aux tissus biologiques (Kavlock *et al.* 1995). La notion de dose est également très importante et peut être définie comme la quantité d'une substance qui, lorsqu'un organisme y est exposé, permet de déterminer si les effets de celle-ci sont toxiques, non-toxiques, ou bénéfiques.

Toute substance étrangère à la vie de l'homme provoquant des troubles plus ou moins graves, passagers ou durables, de façon immédiate ou différée peut donc être considérée comme étant toxique pour l'organisme. Étant donné le large éventail de toxicités, il est facile de comprendre la sagesse de Paracelse (1493-1541) quand il a dit : « toutes les substances sont des poisons; il n'en est aucune qui n'est pas un poison ». La bonne dose différencie un poison et un remède (Borzelleca *et al.* 2000). Cette notion est renchérie par Lehman et Fitzhugh en 1954, qui a également montré que toute substance pouvait devenir dangereuse au delà d'une certaine dose et qu'il n'y avait pas de risque tant que cette condition d'exposition était évitée (Lehman *et al.* 1954). Les études toxicologiques sont donc nécessaires au cours des tests précliniques d'un médicament.

Il existe différentes formes de toxicité. Elle peut être aiguë, subaiguë, chronique ou sub-chronique (US EPA, 1989).

La première forme est celle qui résulte, dans l'immédiat, de l'absorption par la bouche, par la voie pulmonaire ou par pénétration à travers la peau, en une seule fois ou en plusieurs fois très rapprochées, d'une dose suffisamment importante. Il en est ainsi, par exemple, à la suite de l'ingestion de nombreux produits ou de l'inhalation de gaz ou de vapeurs tels que l'oxyde de carbone, le chlore ou l'acide cyanhydrique. Les manifestations de cette forme de toxicité sont spectaculaires, puisqu'elles peuvent même se traduire par une mort rapide. C'est la raison pour laquelle une opinion très répandue tend à considérer les poisons comme des substances qui tuent violemment. Sur le plan expérimental, d'ailleurs, l'estimation de la toxicité aiguë d'une substance donnée s'effectue couramment au laboratoire en déterminant les doses létales (DL_{50}). Cette dose peut varier dans de très larges limites en fonction de l'espèce animale expérimentée, ainsi que de divers facteurs, notamment de la voie d'administration. En toxicologie, la DL_{50} est la dose qui est mortelle pour 50 pour cent des organismes d'essai.

2.4.1 . Voies d'exposition

Il ya trois voies principales pour les substances à pénétrer dans l'organisme: absorption (par contact avec la peau et les yeux), inhalation, ingestion.

Dans les études toxicologiques, la dose administrée aux animaux d'essai est exprimée en termes de quantité administrée:

- Par unité de poids, habituellement exprimée en milligrammes de substance par kilogramme de poids corporel (mg / kg).
- Par zone de surface de la peau, également exprimée en mg / kg.
- Par unité de volume d'air inhalé, généralement exprimée en parties de la vapeur ou de gaz par million. Les doses inhalées peuvent aussi être exprimées par le temps.

2.5 . Paramètres liés aux tests biologiques

Les composés pharmacologiques sont caractérisés par plusieurs facteurs qui relient leurs concentrations à leurs activités sur les microbes, parasites, etc.

Des tests *in vitro* et *in vivo* permettent d'accéder aux valeurs de ces facteurs. On peut citer entre autre l'IC₅₀, la CL₅₀, l'IS etc.

IC₅₀ : demi-Concentration Inhibitrice maximale. C'est aussi une mesure de l'efficacité d'un composé inhibant la fonction biologique ou biochimique. Souvent, le composé en question est un médicament candidat. Cette mesure quantitative indique quelle quantité d'un médicament ou d'autres substances (inhibiteur) est nécessaire pour inhiber un processus biologique donné (ou composante d'un processus, à savoir une enzyme, cellulaire, récepteurs des cellules ou des micro-organismes) de moitié. Elle représente la concentration d'une substance nécessaire pour 50% d'inhibition *in vitro* (Moulin *et al.* 2002).

CL₅₀ : c'est la demi-Concentration létale, une grandeur utilisée au cours de ce travail pour apprécier la toxicité larvaire réalisée *in vitro* sur *Artémia salina*.

IS : A partir des valeurs provenant des tests antitrypanosomiens et des tests de toxicité larvaire, on peut accéder à la valeur de l'index de sélectivité (IS). L'index de sélectivité est le rapport de la quantité de substance nécessaire pour tuer 50% de larves de crevettes sur la quantité de la même substance nécessaire pour inhiber 50% des parasites de trypanosome. Autrement dit, c'est le rapport de la demi-concentration létale sur la demi-concentration inhibitrice d'une substance ($IS = LC_{50}/IC_{50}$). Lorsque l'index de sélectivité d'une substance est inférieur à l'unité, la toxicité de cette dernière est plus considérable que son activité antitrypanosomienne. Par contre, quand la valeur de l'index de sélectivité est supérieure à l'unité, cette substance est plus antiparasitaire que toxique (Tiuman *et al.* 2005, De Lima *et al.* 2012). A partir d'une certaine valeur de l'IS nettement supérieure à un, on parle d'une bonne sélectivité de la substance sur les parasites.



Matériel et méthodes

3.1 . Cadre d'étude

- ❖ Les extractions et les héli-synthèses ont été réalisées dans le Laboratoire de Chimie Organique Physique et de Synthèse (LaCOPS) au département de chimie de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (U.A.C), (BENIN).
- ❖ Les diverses analyses spectrométriques et les tests antiparasitaires ont été effectués dans les Laboratoires de Chimie Pharmaceutique de l'Ecole de Pharmacie et de Pharmacologie de l'Université Catholique de Louvain en BELGIQUE.
- ❖ Les tests de toxicité larvaire ont été réalisés dans le Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) annexe de Porto-Novo (BENIN).
- ❖ Les tests de toxicité aiguë ont été effectués dans le Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie des Substances Naturelles de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé (TOGO).

3.2 . Extraction et analyse chimique des HE

3.2.1 . Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon schoenanthus* et *Eucalyptus citriodora*. Ces plantes ont toutes été identifiées à l'herbier National du Bénin (tableau 2). (Voir certificat d'identification en annexe).

Tableau 2 : N° d'identification, nom scientifique et famille des plantes étudiées

N° Identification	Nom scientifique	Famille
AA 6433/HNB	<i>Eucalyptus citriodora</i> HOOK.	Myrtaceae
AA 6434/HNB	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Poaceae
AA 6435/HNB	<i>Cymbopogon schoenanthus</i> (L.) Spreng.	Poaceae

Les feuilles de *Cymbopogon schoenanthus* ont été récoltées au jardin botanique de l'Université d'Abomey-Calavi. Les feuilles d'*Eucalyptus citriodora* sont aussi récoltées dans l'Université d'Abomey-Calavi aux alentours de L'Ecole Polytechnique (EPAC). Les feuilles de *Cymbopogon citratus* sont les seules à être récoltées hors de l'université sur les rives du lac Nokoué à Abomey-Calavi (fig. 16). Toutes les récoltes sont effectuées entre 8 heures et 10 heures dans la matinée, pendant des périodes où on suppose que les feuilles seraient moins hydratées (généralement en décembre ou en janvier). Les extractions ont lieu juste après les récoltes.



C. schoenanthus

E. citriodora

C. citratus

Figure 16 : Matériel végétal

3.2.2 . Extraction des huiles essentielles

La variante de l'hydrodistillation utilisée est la distillation à vapeur saturée. Les extractions sont toujours réalisées à partir de 500 g de matériel végétal. Une verrerie adaptée a été mise en place permettant à la fois la circulation de l'eau et de l'HE sous forme gazeuse et aqueuse. Ces manipulations ont été rendues possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clevenger amélioré (fig. 17). Il est constitué d'un élévateur surmonté d'une chauffe ballon dans lequel se trouve le générateur de vapeur. Ce dernier contient le ballon qui est relié au matériel végétal contenu dans l'extracteur. Le réfrigérant qui se retrouve au-dessus de l'ensemble permet de refroidir la vapeur afin d'obtenir l'eau florale et l'huile essentielle. Le chauffage dure 3

heures après l'apparition des premières gouttes. 15 minutes après l'arrêt du chauffage, on recueille l'HE qui surnage par décantation.

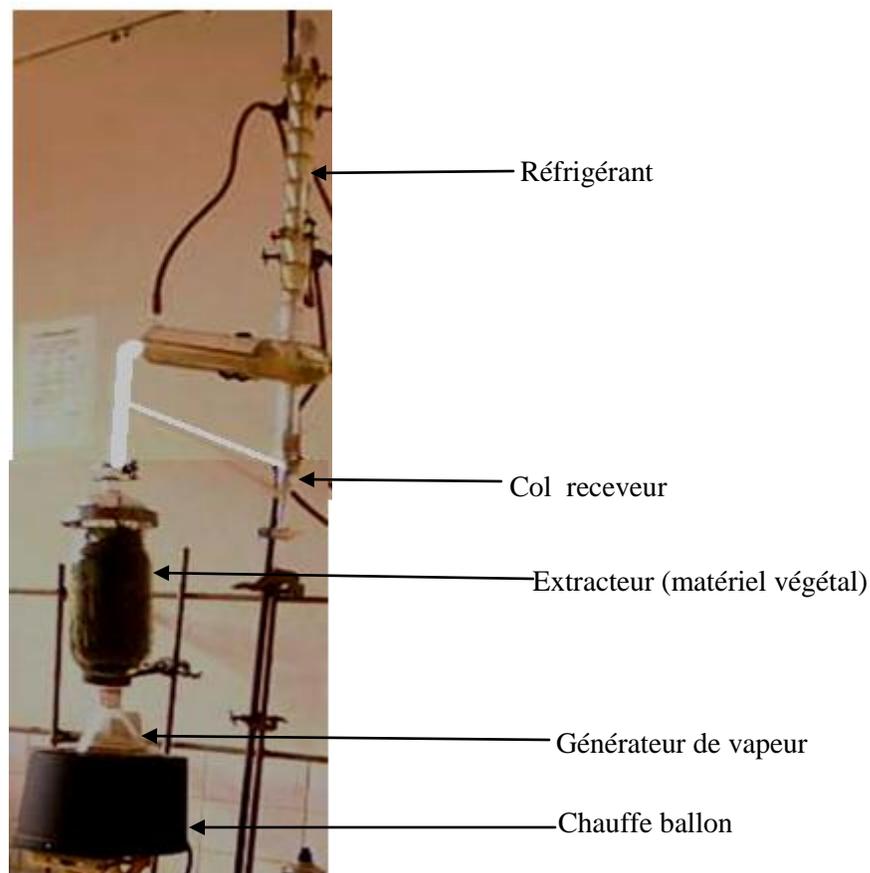


Figure 17: Appareil d'extraction de type Clevenger amélioré

3.2.3 . Calcul du rendement

Après l'extraction des HE, les rendements sont évalués par la formule suivante :

$$R (\%) = (MH/Mv) * 100$$

MH = Masse d'huile essentielle en g,

Mv = Masse de matériel végétal en g

A partir de 500 g de feuilles fraîches de *Cymbopogon citratus*, 7,4 g d'huile essentielle ont été extraits. Dans le cas de *Cymbopogon schoenanthus*, 12,5 g d'huile essentielle ont été extraits à partir de 500 g de matériel végétal. A partir de 500 g de feuilles fraîches de *Eucalyptus citriodora* 21,5 g d'huile essentielle ont été également extraits. Ces rendements sont explicités dans la partie Résultats et discussion.

3.2.4 . Analyse chimique des HE

3.2.4.1 . Analyse en chromatographie phase gazeuse par détection à ionisation de flamme (CPG-FID)

L'analyse est réalisée sur un FOCUS GC équipé d'une colonne capillaire CP Wax 52 CB (J&W Scientific Column de Agilent Technologies, N° US1670726A, USA) de dimension 15 x 0,25 mm avec 0,25 µm de diamètre interne. Les échantillons sont injectés en mode splitless (volume injecté 1µl, température à l'entrée : 260°C, débit du split : 10ml/min, temps du splitless : 0,80 min). La température du four est programmée de la façon suivante : température initiale 50°C suivie d'un gradient de 6°C/min juste qu'à 250°C puis d'un palier isotherme de 250°C pendant 5min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,2ml/min. La température du détecteur FID est de 260°C. Les données sont enregistrées et traitées avec le logiciel ChromCard.

3.2.4.2 . Analyse CPG couplée avec la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Dans le but de confirmer la spécificité et la sélectivité de la méthode CPG, des analyses CPG-SM ont été réalisées sur un TRACE GC 2000 séries (ThermoQuest, Rodano, Italy), équipé d'un autosampler AS2000 (ThermoQuest. Le système GC est couplé à un spectromètre de masse de type Trace SM TheroQuest) opérant en mode d'impact électronique. La même colonne capillaire (DB-XLB) est utilisée avec les mêmes conditions d'injection, de débit de l'hélium et de programmation de la température du four. La température de couplage du GC est de 260°C. L'énergie des électrons est de 70 eV et la température de couplage du GC est de 260°C. Les données sont enregistrées et

analysées avec le logiciel Xcalibur 1.1 (ThermoQuest). Les spectres de masse des pics dans les huiles essentielles sont analysés et comparés aux composés de référence.

3.2.4.3 . Identification des composés

Pour identifier chaque pic donc chaque composé, il faut calculer l'indice de rétention correspondant. Or, pour un même composé, l'indice de rétention qui est une grandeur caractéristique du composé diffère suivant le type de colonne. En effet, dans une colonne polaire, les composés sont retenus plus longtemps sur la phase stationnaire, ils auront donc un temps de rétention beaucoup plus grand ; tandis que dans une colonne apolaire, l'élution est approximativement fonction de la température d'ébullition du composé.

Les renseignements sur les deux types de colonnes sont complémentaires parce qu'il peut arriver que sur une même colonne deux composés différents aient le même indice de rétention.

Les indices de rétention des divers constituants sont calculés après injection de l'huile essentielle avec un mélange d'alcane linéaires sur les deux colonnes.

Dans le cas d'une analyse en programmation de température, l'indice de rétention linéaire ou indice de Kowats (IK) est donné par la formule suivante :

$$IK = 100n + \frac{TR(X) - TR(Cn)}{TR(Cn + 1) - TR(Cn)} \times 100$$

Où $TR(X)$ est le temps de rétention du composé inconnu

$TR(Cn)$ est le temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone

$TR(Cn+1)$ est le temps de rétention de l'hydrocarbure à $n+1$ atomes de carbone

X est le composé inconnu étant élué entre Cn et $Cn + 1$

Les indices expérimentaux sont comparés à ceux de la littérature ainsi qu'à ceux de la banque de données.

(Adams *et al.* 2001).

3.3 . Hémi-synthèse

3.3.1 . Matériel d'hémi-synthèse et d'identification des molécules

3.3.1.1. Matériel d'hémi-synthèse

Les huiles essentielles extraites à partir des plantes citées plus haut (paragraphe 3.2.1.) ont servi de substrats dans les diverses réactions d'hémi-synthèse. Au cours de ces réactions, doivent respectivement réagir *in situ*, les composés carbonylés tels que la pipéritone, le citral (néral et géranial) et le citronellal des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*, de *Cymbopogon citratus* et d'*Eucalyptus citriodora* (fig. 18).

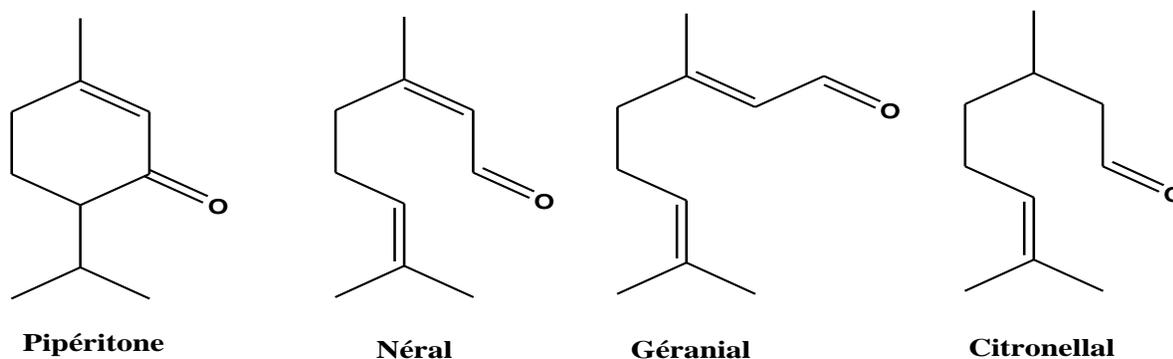


Figure 18 : Structure des composés carbonylés majoritaires des huiles essentielles utilisées

Les réactifs utilisés sont commercialisés par la société ACROS ORGANICS et la société ALDRICH. Ce sont : le chlorhydrate de semicarbazide, le thiosemicarbazide, le 2-méthyl thiosemicarbazide, le 4-méthyl thiosemicarbazide, le 4-phényl semicarbazide le 4-phényl thiosemicarbazide), la triéthylamine et l'acide chlorhydrique (fig. 19).

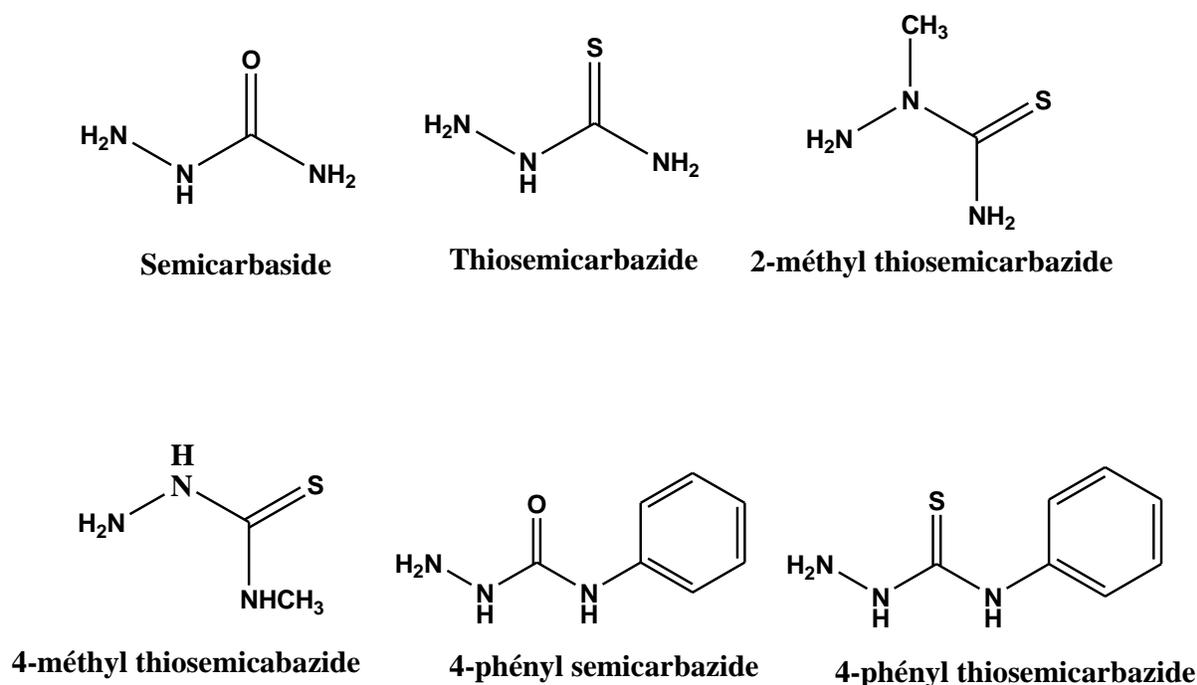


Figure 19 : Structures des réactifs utilisés

3.3.1.2. Matériel d'identification et de détermination des molécules

Les points de fusion des thiosemicarbazones ont été pris avec un appareil de type banc de Köfler puis un appareil de type fusionometer *electrothermal 1A 9000* et n'ont pas été corrigés. Les méthodes spectrométriques couramment rencontrées en chimie sont : la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet-visible, la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (SM) etc. Les différentes informations que l'on peut tirer des spectres IR, UV, SM, RMN permettent de confirmer ou de déterminer les structures des composés analysés (Silverstein *et al.* 2007). Les spectres infrarouge ont été enregistrés avec un spectrophotomètre infrarouge de type Perkin-Elmer FTIR 286. Les fréquences d'absorption sont exprimées en cm^{-1} . Les spectres RMN ont été enregistrés avec un spectrophotomètre de type Bruker 500 dans le chloroforme deutérié (CDCl_3) ou le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO- d_6). L'enregistrement se fait à 400 MHz pour la RMN ^1H à 100 MHz pour la RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au TMS

(triméthylsilane) pris comme référence interne. Les spectres de masse en introduction directe ont été réalisés sur un spectromètre de masse à trappe d'ions LCQ Finnigan® équipé d'une interface ICPA et contrôlé par le logiciel Xcalibur. Cette technique a permis de déterminer les masses molaires moléculaires et de confirmer la pureté des produits de synthèse.

3.3.2 . Mécanismes de réaction

Trois mécanismes sont possibles selon la littérature. Les mécanismes proposés comportent chacun deux étapes : une étape d'addition et une étape d'élimination.

- 1^{er} mécanisme : Selon Vollhardt *et al.* 2003.

Dans ce mécanisme, le thiosemicarbazide réagit directement sur le carbonyle (étape d'addition); l'acide intervient dans l'étape d'élimination (fig. 20).

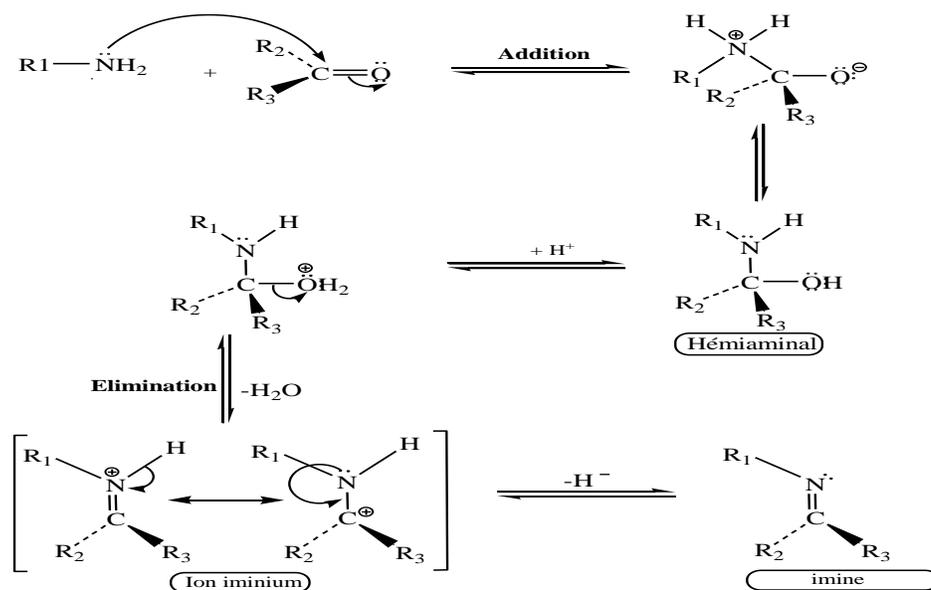


Figure 20: Mécanisme de formation des thiosemicarbazones selon Vollhardt

- 2^{ème} mécanisme : Proposé par Allinger *et al.* 1985 (fig. 21).

A ce niveau, c'est plutôt l'acide qui réagit d'abord avec le composé carbonyle pour donner un intermédiaire qui sera attaqué par le thiosemicarbazide dans l'étape d'addition.

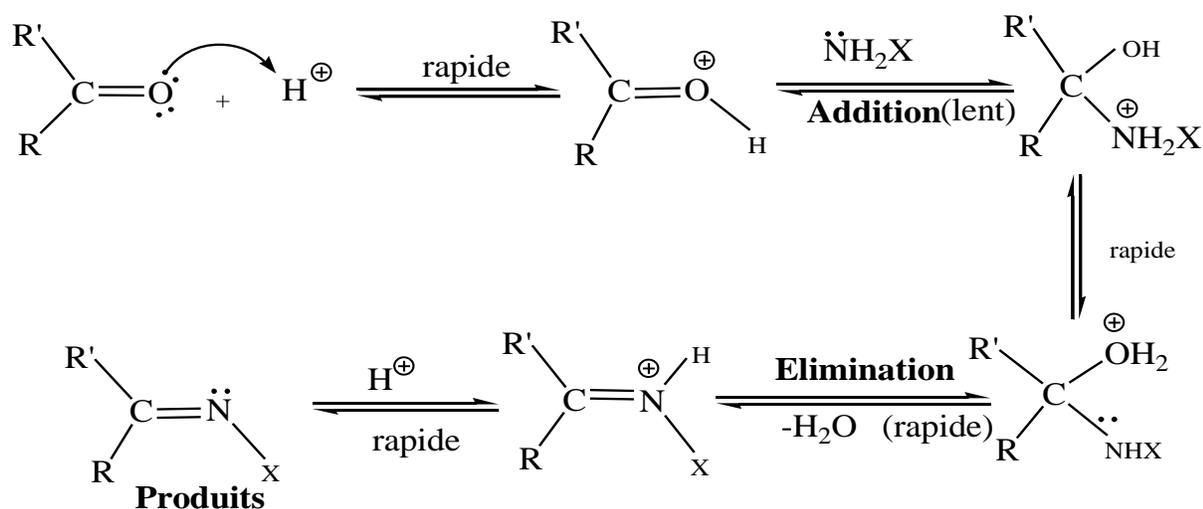


Figure 21: Mécanisme de formation des thiosemicarbazones selon Allinger.

- 3^{ème} mécanisme : Selon Carey *et al.* 2003 (fig. 22).

Dans le dernier mécanisme, l'étape d'addition passe par un état de transition concerté avec transfert de proton.

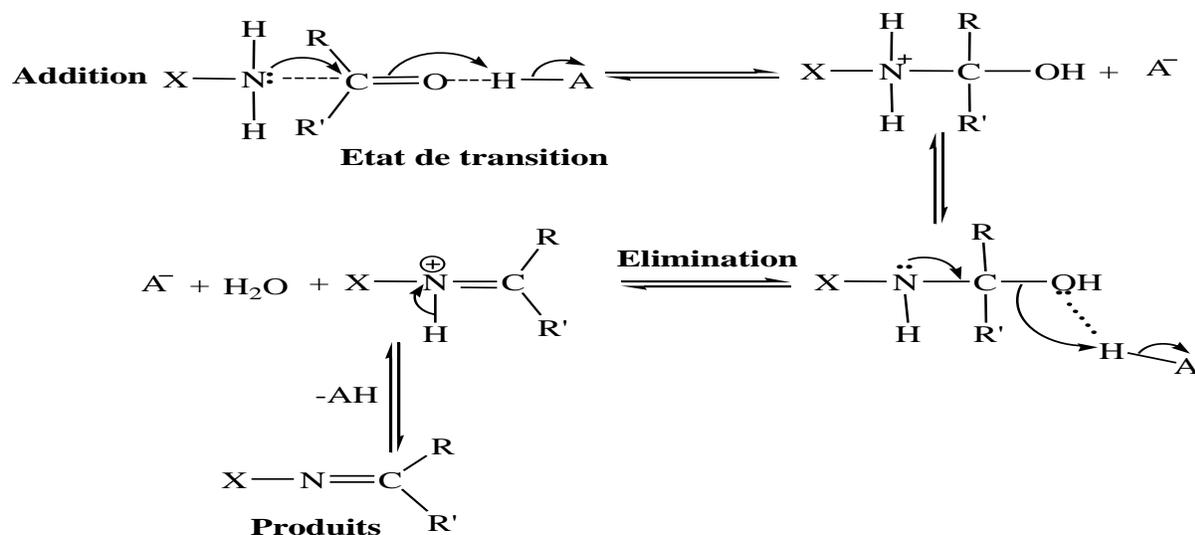


Figure 22: Mécanisme de formation des thiosemicarbazones selon Carey.

Les « imines » (oximes, semicarbazones, thiosemicarbazones, carbazones) dont l'azote porte un groupement électronégatif sont en général stables (Allinger *et al.* 1985). Chacun de ces dérivés est stabilisé par résonance grâce à la délocalisation d'une paire électronique libre de l'azote voisin de l'atome d'azote de l'imine. Cette délocalisation fait diminuer la charge δ^+ de l'atome de carbone de la double liaison de l'imine et augmente l'énergie de la bande de valence BV, ce qui la rend moins sensible à une attaque nucléophile (Allinger *et al.* 1985). Ainsi, l'équilibre de cette condensation est constamment déplacé dans le sens de la formation de l'« imine », ce qui permet à la réaction de se poursuivre jusqu'au bout.

Lorsque l'« imine » est préparée à partir d'une cétone dissymétrique, cette imine peut se trouver sous forme d'un mélange d'isomères E et Z (*anti* et *syn*), exactement comme un alcène (Carey *et al.* 2003). Mais contrairement aux isomères géométriques des alcènes, ceux des imines sont assez instables et s'interconvertissent rapidement à température ambiante. En revanche, les isomères géométriques des oximes, semicarbazones, thiosemicarbazones, ... sont stables et peuvent même être séparés.

3.3.3 . Méthodes de Synthèse

3.3.3.1. Citralthiosemicarbazones

Les semicarbazones thiosemicarbazones du citral ont été hémi-synthétisées en une seule étape. Au cours de cette réaction d'hémi-synthèse, l'huile a été considérée comme étant constituée de 100% de citral. La réaction est équimolaire. Mais cette huile ne contenant que 70,13% de citral, il y a donc un léger excès de réactif (semicarbazide ou thiosemicarbazide) qui sera éliminé au cours des recristallisations. La méthode de synthèse utilisée pour les semicarbazones s'apparente à celle décrite par Fatondji *et al.* en 2010. Cette méthode est amplement explicitée dans sa thèse de Doctorat (Fatondji *et al.* 2011). Celle utilisée pour les thiosemicarbazones est similaire à la méthode de Du *et al.* en 2002.

➤ *Citralsemicarbazone 1a*

A un mélange sous agitation de 0,001 mol d'HE de *C. citratus* (152 mg) dissoute dans 1,5 mL d'éthanol à 95° et 0,001 mol de chlorhydrate de semicarbazide (111,5 mg) dissous dans 1 mL d'eau, on ajoute deux gouttes de triéthylamine (Fatondji et al. 2010). Après l'apparition des cristaux, on poursuit l'agitation pendant une heure. Le précipité est ensuite filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol (fig. 23).

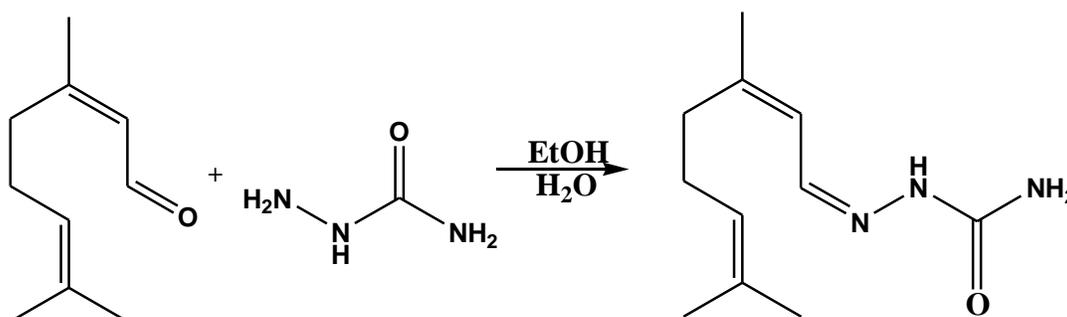


Figure 23: Equation de réaction de synthèse de la citralsemicarbazone

➤ *Citralthiosemicarbazone 2a*

On prépare un mélange de 0,001 mol d'huile de *C. citratus* (152 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95° et 0,001 mol de thiosemicarbazide (91 mg) dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1N. Le mélange des deux solutions est maintenu sous agitation à température ambiante jusqu'à l'obtention des cristaux de thiosemicarbazone. L'agitation est maintenue pendant une heure. Le précipité est ensuite filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol.

➤ *Citral-2-méthyl-3-thiosemicarbazone 3a ; citral-4-méthyl-3-thiosemicarbazone 4a*
citral-4-phényl-3-semicarbazone 5a ; citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone 6a

0,001 mol de thiosemicarbazide substitué (105 mg de 2-méthyl-3-semicarbazide, 105 mg de 4-méthyl-3-thiosemicarbazide, 151 mg 4-phényl-3-semicarbazone ou 167 mg 4-phényl-3-thiosemicarbazide) sont dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1N. Dans

chaque cas de réaction, le réactif dissous est ajouté à 0,001 mol d'huile de *C. citratus* (152 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95°. Le mélange sous agitation se prend en masse. La masse se disperse peu à peu en donnant des cristaux. L'agitation est poursuivie jusqu'à l'obtention des cristaux. Le précipité obtenu dans chaque cas est filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol (fig. 24).

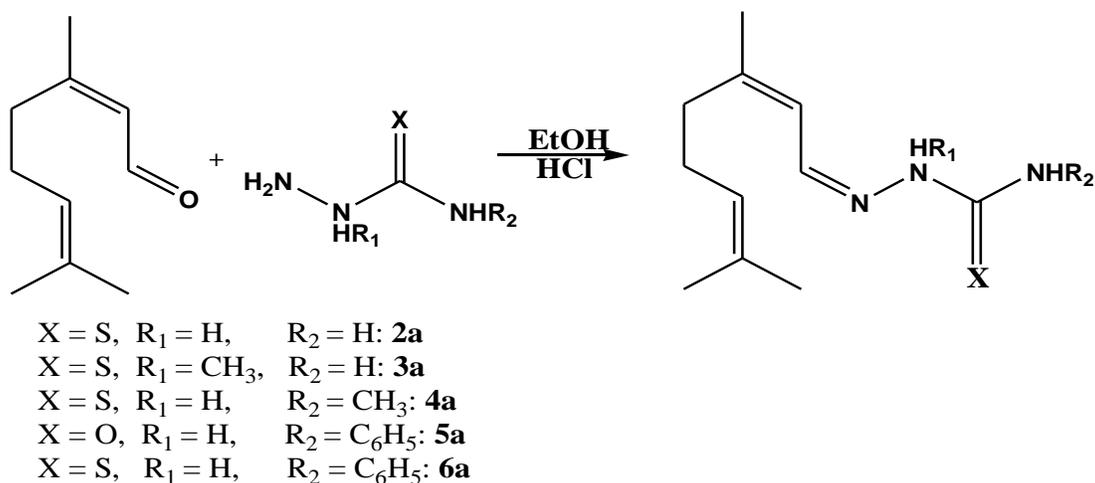


Figure 24: Equation de réaction de la formation des citralthiosemicarbazones substituées

3.3.3.2. Pipéritonethiosemicarbazones

Les semicarbazones et thiosemicarbazones de la pipéritone ont aussi été hémi-synthétisées en une seule étape comme dans le premier cas. Dans cette partie, la réaction mole à mole n'a pas donné un bon rendement. Nous avons donc pensé à une réaction faisant intervenir 0,002 mol d'huile essentielle de *C. schoenanthus* pour 0,001 mol de réactif. Il faut noter que les temps de réaction sont plus longs. Il a fallu chauffer le milieu à 50°C dans certains cas pour avoir un temps de réaction acceptable. Au cours de la synthèse des thiosemicarbazones de la pipéritone, on voit très souvent des gouttes d'huiles surnager le mélange réactionnel. Il faut alors ajouter goutte à goutte de l'éthanol jusqu'à ce que la solution soit limpide. Les cristaux sont chaque fois refroidis dans un bain de glace avant leur filtration.

➤ *Pipéritonesemicarbazone 1b*

On met sous agitation 0,002 mol d'huile (304 mg) et 0,001 mol de chlorhydrate de semicarbazide (111,5 mg) préalablement dissous respectivement dans 1,5 ml d'éthanol à 95° et 1 ml d'eau. Deux gouttes de triéthylamine sont ajoutées au mélange après une minute d'agitation. Le mélange sous agitation est porté à une température de 50°C pendant 15 minutes. On laisse l'agitation continuer à température ambiante. L'agitation est poursuivie pendant 1 heure après l'apparition des cristaux. Le précipité recueilli est filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol. La figure 25 indique l'équation globale de la réaction.

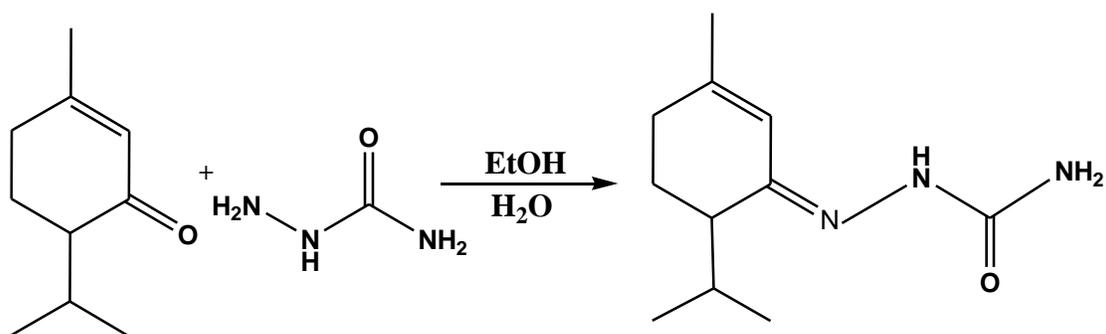


Figure 25: Equation de réaction de la formation de la pipéritonesemicarbazone

➤ *Pipéritonethiosemicarbazone 2b*

On prépare un mélange de 0,002 mol d'huile de *C. schoenanthus* (304 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95° et 0,001 mol de thiosemicarbazide (91 mg) dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1N. Ce mélange est maintenu sous agitation jusqu'à l'obtention des cristaux de thiosemicarbazone. L'agitation est aussi maintenue pendant une heure. La réaction a lieu à température ambiante. Le précipité est ensuite filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol (fig. 25).

➤ *Pipéritone-4-phényl-3-semicarbazone 3b*, *pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone 4b*

0,001 mol de thiosemicarbazide substitué (151 mg 4-phényl-3-semicarbazide ou 167 mg 4-phényl-3-thiosemicarbazide) est dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1N. Dans chaque cas, le réactif dissous est ajouté à 0,002 mol d'huile de *C. schoenanthus* (304 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95°. Le mélange sous agitation est porté à une température de 50°C. Si le mélange est trouble, il faut ajouter goutte à goutte de l'éthanol jusqu'à ce qu'il soit limpide. Les cristaux apparaissent quelques minutes plus tard. On poursuit l'agitation à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité obtenu dans chaque cas est filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol. L'équation des réactions est résumée à la figure 26.

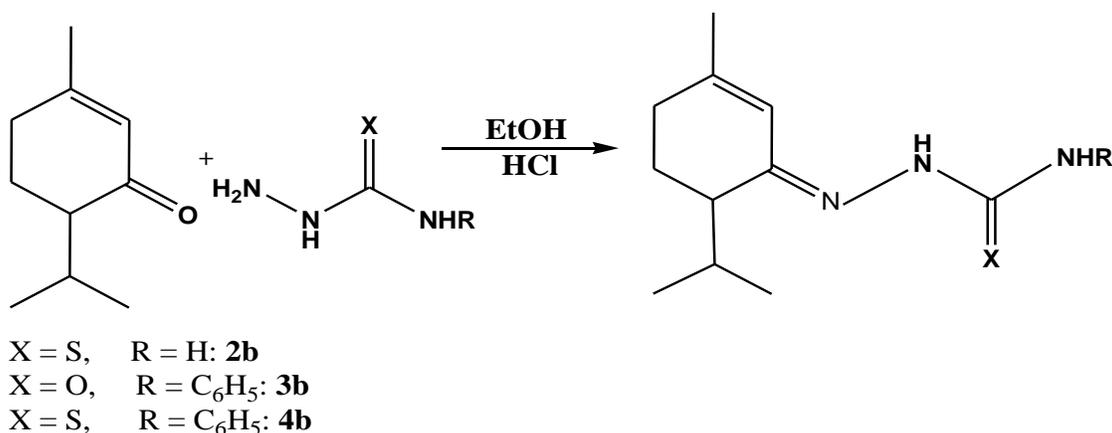


Figure 26: Equation de réaction de la formation des pipéritonethiosemicarbazones substituées

3.3.3.3. Citronellalthiosemicarbazones

Les semicarbazones et thiosemicarbazones du citronellal ont également été synthétisées en une seule étape. La réaction est encore moins rapide. Il faut aussi utiliser 0,002 mol d'huile essentielle de *C. schoenanthus* pour 0,001 mol de réactif pour avoir des rendements acceptables en composés thiosemicarbazones. Les temps de réaction observés sont également plus longs. La température de réaction est autour de 50°C pour les composés

1c, **2c** et **4c**. Mais il a fallu élever cette température à 90°C pour le composé **3c**. Les cristaux sont refroidis au réfrigérateur pendant environ 1 h avant leur filtration.

➤ *Citronellalsemicarbazone 1c*

A un mélange sous agitation de 0,002 mol d'huile de *E. citrodora* (308 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95° et 0,001 mol de chlorhydrate de semicarbazide (111,5 mg) dissous dans 1 ml d'eau, on ajoute deux gouttes de triéthylamine après une minute d'agitation. La température du mélange est portée à 50°C. Après l'apparition des cristaux au bout de quelques minutes, on poursuit l'agitation pendant 1 heure à 50°C. Le précipité est refroidi pendant 1 heure au réfrigérateur avant d'être filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol (fig. 27).

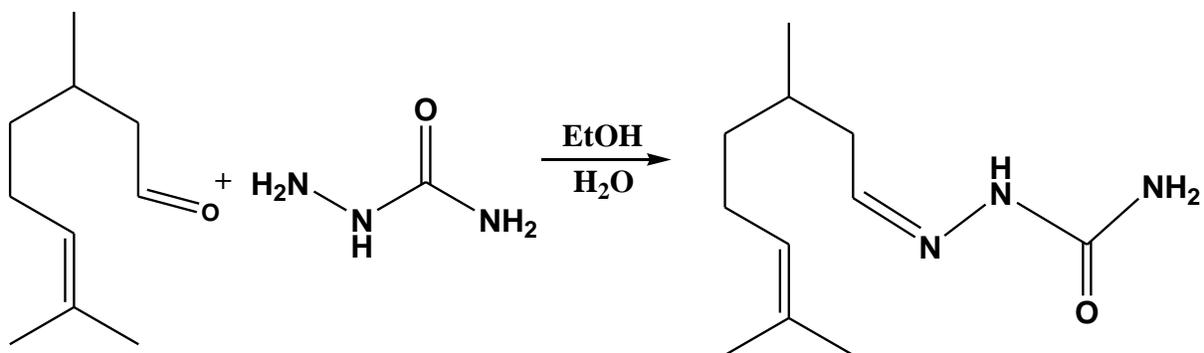


Figure 27: Equation de réaction globale de synthèse de la citronellalsemicarbazone (**1c**)

➤ *Citronellalthiosemicarbazone 2c*, *Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone 4c*

On prépare un mélange de 0,002 mol d'HE de *E. citrodora* (308 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95° et 0,001 mol de thiosemicarbazide (91 mg) dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1N. Ce mélange porté à une température de 50°C est maintenu sous agitation jusqu'à l'obtention des cristaux de thiosemicarbazone au bout de quelques minutes. L'agitation est ensuite maintenue à la température ambiante pendant une heure. Le précipité est refroidi, filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé puis recristallisé dans l'éthanol.

Le protocole de synthèse du Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone **4c**, est le même que celui du citronellalthiosemicarbazone.

➤ *Citronellal-4-phényl-3-semicarbazone 3c*

151 mg de 4-phényl-3-semicarbazide sont dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1N. Le réactif dissous est ajouté à 0,002 mol d'huile d'*E. citrodora* (308 mg) dissoute dans 1,5 ml d'éthanol à 95°. Le mélange est agité à 90°C pendant 15 minutes. Le mélange étant légèrement trouble, il faut ajouter goutte à goutte de l'éthanol jusqu'à ce qu'il soit limpide. L'agitation est poursuivie pendant 1 heure. La solution refroidie au réfrigérateur donne des cristaux. Les cristaux sont filtrés, lavés à l'eau distillée, séchés, pesés puis recristallisés dans l'éthanol (fig. 28).

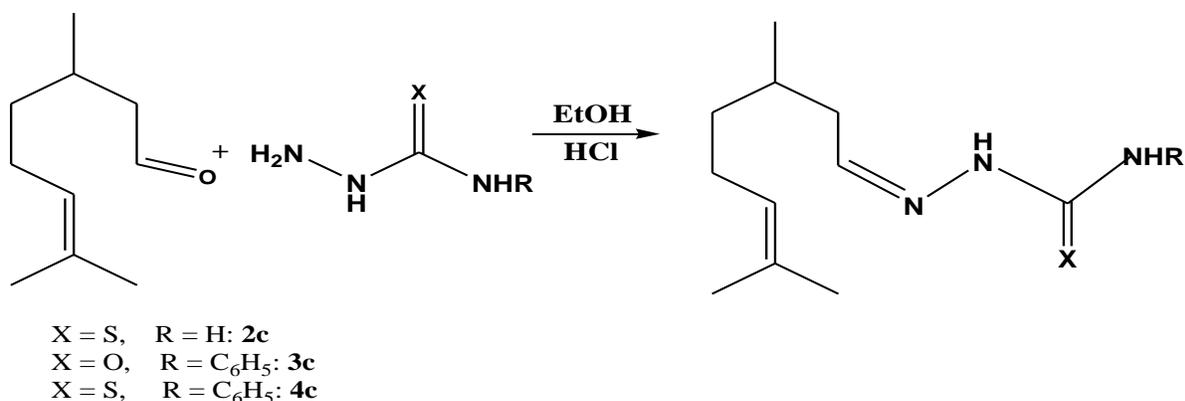


Figure 28: Equation de réaction globale de synthèse des thiosemicarbazones du citronellal.

3.3.3.4. Recristallisation

Plusieurs méthodes conduisent à la purification d'une molécule. On peut citer la recristallisation, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide à pression atmosphérique et sous pression. La recristallisation est la méthode de purification utilisée au cours de ce travail.

C'est une méthode de purification adaptée aux composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle s'utilise même sur de petites quantités mais n'est pas utilisable

avec les huiles et d'autres composés liquides. Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer.

3.3.3.5. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Cette technique nous a permis de suivre l'évolution de la réaction et la pureté des composés après la recristallisation.

3.4 . Biologie

3.4.1. Matériel animal

Les tests antitrypanosomiens sont réalisés sur la souche 427 de *Trypanosoma brucei brucei* (fig. 29).

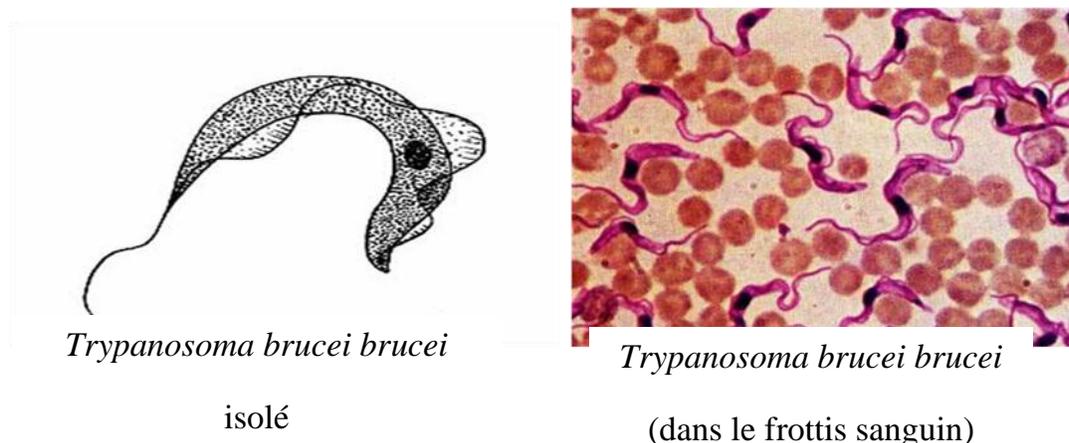


Figure 29 : *Trypanosoma brucei brucei*

Artemia salina (LEACH) est le matériel biologique utilisé lors de l'évaluation de la toxicité larvaire des molécules.

Le dernier test réalisé sur les rats de type « Wistar » (fig. 30) a permis d'évaluer la toxicité aiguë des substances les plus sélectives.



Figure 30 : Rats de type « Wistar »

3.4.2. Méthodes de réalisation des tests biologiques

3.4.2.1. *Evaluation de l'activité trypanocide*

Ce test est réalisé *in vitro* selon le protocole de LILIT. Ce protocole a été décrit par Brun *et al.* en 1994 puis amélioré par Rüz *et al.* en 1997.

Les trypanosomes sont dilués jusqu'à la densité cellulaire adéquate. La densité cellulaire est adaptée pour qu'après 72 heures d'incubation dans les puits de contrôle, les cellules soient à la fin de la phase de croissance logarithmique (*Trypanosoma brucei rhodesiense*: 4×10^4 tryps/ml, *Trypanosoma brucei brucei*: 5×10^4 tryps/ml). La densité de trypanosomes est ajustée par un appareil de comptage : l'hémocytomètre. Par plaque, 2ml du stock de trypanosomes seront utilisés. 50 μ l du milieu à température ambiante sont ajoutés dans chaque puits à l'exception des puits extrêmes et la colonne 11 (colonne 2 à 10 de la rangée B à G). 75 μ l de milieu contenant deux fois la plus forte concentration de composés (solution stock II) sont mis dans les puits de la colonne 11 pour être testés (composé N°1 dans les rangées B, C, D et composé N°2 dans les rangées E, F, G).

Trois séries de dilutions sont préparées avec une multipipette (6 canaux sont nécessaires). 25µl des 6 puits de la colonne 11 sont prélevés puis transférés dans la colonne 10. Le mélange est par la suite agité. La dilution de droite à gauche est poursuivie jusqu'à addition de 25µl de la colonne 5 à la colonne 4. Après le mélange, les 25µl restants sont éliminés (volume total dans chaque puits = 50µl à ce stade). Les puits dans les colonnes 2 et 3 servent de puits de contrôle (sans addition de composé). 50µl de suspension de trypanosomes sont ajoutés dans les puits des rangées C, D, E, F des colonnes 2 à 11 ; puis 50µl du milieu sans trypanosome dans les rangées B et G des mêmes colonnes. Ces puits servent de contrôle à blanc.

Après incubation pendant 72 heures à 37 ° C, avec 5% de CO₂, les plaques sont observées au microscope inversé pour déterminer la CMI (concentration minimale inhibitrice): concentration la plus faible de composés à laquelle aucun trypanosome à morphologie et motilité normales comparativement aux puits de contrôle ne peut être observé. Des informations supplémentaires peuvent être enregistrées telles que l'insolubilité du composé, la contamination microbienne, etc.

On ajoute dans chaque puits 10µl de colorant fluorescent *Bleu Alamar* qui peut être dilué 1:1 dans une solution tampon saline de phosphate et incubé encore pendant 4 heures à 37°C.

On lit la plaque avec un lecteur de plaques de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Les données peuvent être transférées dans un programme graphique (Excel) et les valeurs IC₅₀ peuvent être évaluées par interpolation linéaire (modèle de feuille Excel).

3.4.2.2. *Evaluation de la toxicité sur Artémia salina*

Le test est réalisé sur des larves de crevettes de saumure (*Artémia salina* LEACH) selon la méthode de Michael *et al.* en 1956 et reprise par Vanhaecke *et al.* en 1981 puis par Grésil *et al.* en 1983. Les œufs d'*Artémia salina* sont incubés dans de l'eau de mer jusqu'à éclosion de jeunes larves après 48 heures. 2 mL d'une solution de concentration 4 mg/mL de chaque composé ont été préparés dans le DMSO. En dehors du tube contenant

la solution initiale, on dispose de 9 autres tubes dans lesquels il y a chaque fois 1mL d'eau de mère. A partir de 1 mL de la solution initiale, on réalise une dilution successive dans les 9 tubes. On obtient à la fin une série de 10 solutions de concentrations comprises entre 4000 µg/mL à 7,81 µg/mL. Les solutions d'huiles essentielles sont aussi préparées dans les mêmes conditions. 16 larves de crevette sont ensuite introduites dans chaque solution. Toutes les solutions ainsi que des solutions témoins ne contenant les dilutions successives de DMSO sont laissées sous agitation pendant 24 heures. Le comptage sous microscope du nombre de larves mortes dans chaque solution permet d'évaluer la toxicité de la substance. Dans le cas où l'on constate des décès dans le milieu témoin, les données sont corrigées par la formule d'Abbott :

$$\% \text{décès} = [(\text{test} - \text{témoin}) / \text{témoin}] \times 100$$

Les données (dose-réponse) sont transformées par logarithme et la LC₅₀ est déterminée par une régression linéaire dans le logiciel Excel.

3.4.2.3. *Evaluation de la toxicité aiguë sur les rats wistars*

L'étude de la toxicité aiguë est réalisée sur des rats mâles et femelles adultes, de type «Wistar ». Le protocole expérimental est effectué conformément aux lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) et de la FDA (Food and Drug Administration). Les animaux sont répartis dans des cages placées dans l'animalerie de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé (Togo). Les animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture (régime standard). Les rats sont marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater à leurs conditions de vie pendant au moins cinq jours avant l'expérience. Les animaux ont été tous pesés avant l'expérimentation.

➤ *Détermination des doses létales*

L'OCDE recommande d'administrer la substance à des animaux répartis en plusieurs groupes et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité

s'échelonnant entre 0 et 100 %. Les doses administrées doivent être comprises entre 5 mg/kg et 5 g/kg de poids corporel pour permettre de situer les substances testées sur l'échelle comparative de toxicité des substances chimiques de Hodge et Sterner, 1949 (OCDE. 2001).

Le premier groupe constitué de 4 lots de 3 rats auxquels on a administré des doses successives de 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg /kg, 750 mg/kg du citral thiosemicarbazone. Dans le cas du citral 4-phényl thiosemicarbazone ce sont des doses respectives de 250 mg/kg, 500 mg /kg, 750 mg/kg, 1000 mg/kg et 2000 mg/kg qui ont été administrées à 5 lots de 3 rats chacun. L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* préparée à des doses croissantes de 1ml/kg (889 mg/ml), 2ml/kg (1778 mg/ml), 3 ml/kg (2667 mg/ml), 4 ml/kg (3556 mg/ml) et 5 ml/kg (4445 mg/ml) est également administrée à 5 lots de 3 rats.

Le lot témoin est constitué de trois rats. Ces derniers ont reçu de l'huile de maïs utilisée comme véhicule des substances administrées.

Après administration des différentes substances, les rats sont observés pendant 14 jours, plusieurs fois par jour. L'observation des animaux est basée sur les paramètres tels que la variation du poids de l'animal, l'apparence physique externe ; le changement du comportement ; les réponses comportementales aux stimuli externes (ex. : bruit, variation de l'intensité lumineuse), l'agressivité, l'ingestion de nourriture, les troubles de l'équilibre etc.

➤ *Dosage des paramètres biochimiques*

6 lots de 5 rats dont les poids varient entre 120 et 198 g ont été constitués et répartis dans 6 cages. Ces derniers sont mis à jeun 14 h avant l'expérimentation (de 18 h à 8 h) afin de permettre une bonne assimilation du produit. Les doses létales des substances ont été préparées dans l'huile de maïs où elles sont restées en parfaite suspension. Le sang de chaque rat est prélevé dans un tube à essai avant et 24 h après administration des produits.

Les rats sont anesthésiés dans un bocal contenant du coton imbibé d'éther. A l'aide d'un tube capillaire le sang est prélevé à coté de l'œil. Il est recueilli dans un tube à essai puis mis au réfrigérateur pendant 15 à 30 mn. Après 15 mn de centrifugation, le sérum est prélevé à l'aide d'une micropipette puis conditionné dans un tube. Ce sérum servira au dosage des paramètres biochimiques. (CCPA. 1993, OCDE. 2000).

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$.

IV

Résultats et discussion

4.1. Etude des huiles essentielles

4.1.1. Extraction

4.1.1.1. Rendement en huile essentielle de *C. citratus*

Le rendement en huile essentielle des feuilles de *C. citratus* au Bénin est de l'ordre de 1,5% (Nonviho *et al.* 2010). Aussi, il serait utile de souligner qu'il n'y a pas de variation significative de ce rendement lorsqu'on passe d'une région à une autre (Owolabi *et al.* 2009, Koba *et al.* 2009, Barbosa *et al.* 2008). Dans le présent travail, les huiles ont été extraites à partir de matériel végétal frais. L'état du matériel végétal justifierait donc la légère diminution du rendement observé au cours de ce travail par rapport aux travaux antérieurs (Nonviho *et al.* 2010). Selon qu'on passe du matériel végétal frais au matériel végétal séché, le rendement en huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon citratus* peut varier de façon significative (Barbosa *et al.* 2008). Ce rendement dépend donc énormément de l'état du matériel végétal.

4.1.1.2. Rendement en huile essentielle de *C. schoenanthus*

Les observations sur le rendement en huile essentielle de cette plante sont similaires à celles soulignées plus haut (Nonviho *et al.* 2010). La remarque fondamentale à ce niveau est liée au fait que ce rendement peut varier de façon significative quand on passera d'une région à une autre (Onadja *et al.* 2007).

4.1.1.3. Rendement en huile essentielle de *Eucalyptus citriodora*

Le rendement en huile essentielle *d'Eucalyptus citriodora* évalué au cours de cette étude se retrouve dans la marge de rendements obtenus par Moudachirou *et al.* en 1999 au cours de leurs travaux sur la même plante.

En général, le rendement en huile essentielle des feuilles *d'E. citriodora* au Bénin est nettement supérieur à celui observé dans plusieurs autres régions (Silou *et al.* 2009,

Batish *et al.* 2006, Abd El-Mageed *et al.* 2011). Cette plante en plus de ses nombreuses vertus, pourrait donc être exploitée au Bénin pour son huile essentielle.

La connaissance de la composition chimique d'une huile essentielle est très importante puisqu'elle permet d'orienter son usage ultérieur. Ce sont les raisons qui nous ont motivé à analyser les HE extraite au cours de ce travail.

4.1.2. Analyse chimique des huiles essentielles

4.1.2.1. *Analyse chimique de l'huile essentielle de C. citratus*

Il ressort de l'analyse de l'HE de *Cymbopogon citratus*, que le citral (72,91 %) est le composé majoritaire. C'est un mélange de deux isomères : le néral (31,26%) et le géraniol (41,65%) (tableau 3). Le pourcentage de géraniol est plus important que celui de néral. Ce constat peut s'expliquer par le fait que le géraniol est l'isomère E généralement plus stable que l'isomère Z qui est le néral. On note également la présence d'autres composés comme le myrcène (8,18%), le géraniol (6,35%), l'acétate de géranyle (2.56%) etc. qui sont en pourcentages non négligeables (tableau 3) dans cette huile. Ces résultats confirment ceux des travaux antérieurs sur l'analyse chimique de cette HE (Nonviho *et al.* 2010). Les légères différences peuvent s'expliquer par les facteurs comme : le temps de récolte, le lieu de récolte, le mode de séchage et le temps d'extraction, l'âge et le stade végétatif sont autant de facteurs qui influencent fortement la composition chimique de l'HE d'une plante (Kpadonou *et al.* 2012, Bourkhiss *et al.* 2009, Barbosa *et al.* 2008).

Tableau 3 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*

<i>Composés</i>	<i>IK</i>	<i>Pourcentages (%)</i>
6-méthyl-hept-5-èn-2-one	987,5	0,59
myrcène	991,3	8,18
δ-2 carène	998,7	0,28
(Z)-β-ocimène	1037	0,18
(E)-β-ocimène	1047	0,11
myrcène<6,7>époxyde	1092	0,24
périllène	1098	0,07
linalol	1100	0,62
β-pinène-oxyde	1106	0,06
menth-3-èn-9-ol	1150	0,22
citronellal	1153	0,30
iso néral	1162	1,02
iso géranial	1181	1,45
nérol	1225	0,29
citronellol	1229	0,20
néral	1242	31,26
géraniol	1253	6,35
géraniol	1273	41,65
acide nérique	1317	0,27
citronellyl formate	1335	0,62
acide géranique	1352	0,96
acétate de géranyle	1377	2,56
β-caryophyllène	1421	0,07
(E)-β-farnésène	1433	0,08
oxyde de caryophyllène	1584	0,10
Total		97,73

IK : Indice de Kowats

4.1.2.2. Analyse chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus*

De l'analyse chimique de l'huile essentielle de *C. schoenanthus*, il ressort que la pipéritone (68,2 %) est le composé majoritaire. Cette huile contient également des composés comme la d-2-carène (19,38%) et le limonène (3,16%) en proportions non négligeables. En dehors de ces composés, beaucoup d'autres sont observés, mais seuls ceux dont les

pourcentages sont supérieurs à 0,1 % ont été mentionnés dans le tableau 4. Ces résultats confirment ceux obtenus dans les travaux antérieurs (Koba *et al.* 2004, Nonviho *et al.* 2010).

Tableau 4 : Composition chimique de l'huile essentielle de *C. schoenanthus*

Composés	IK	Pourcentage (%)
myrcène	991	0,18
δ-2-carène	1000	19,38
p-cymène	1025	0,13
limonène	1030	3,16
(Z)-β-ocimène	1036	0,19
(E)-β-ocimène	1047	0,13
(Z) menth-2-èn-1-ol	1126	1,02
(E) menth-2-èn-1-ol	1144	0,68
citronellal	1153	0,12
α-terpinéol	1196	1,29
trans pipéritol	1210	0,37
eucarvone	1249	0,22
pipéritone	1262	68,20
β-élémente	1390	0,21
β-caryophyllène	1421	0,40
élémol	1548	1,20
butyrate d'éranyle	1553	0,30
oxyde de carayophyllène	1584	0,20
γ-eudesmol	1632	0,20
α-cadinol	1656	0,53
Total		98,74

IK : Indice de Kowats

4.1.2.3. Analyse chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*

Comme dans les cas précédents, L'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* également utilisée dans ce travail a été aussi analysée. Cette analyse révèle que le citronellal (67,5 %) est le composé majoritaire (Tableau 5). L'isopulégol (11,95%), l'iso-isopulégol (3,56%), le citronellol (8,68%), l'acétate de citronellyle (1,56%), le β-caryophyllène (1,82%) etc. sont aussi des constituants de cette huile (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*

Noms des composés	IK	Pourcentages (%)
isobutyrate d isobutyle	925,3	0,12
α-pinène	940,9	0,18
β-pinène	979,6	0,41
δ-2-carène	998,1	0,57
limonène	1029	0,24
1,8-cinéole	1033	0,37
bergamal	1054	0,21
linalol	1100	0,57
isopulégol	1151	8,39
citonellal	1158	67,50
iso-isopulégol	1162	3,56
néo-iso-isopulégol	1172	0,61
néo-isopulégol	1181	0,17
α-terpinéol	1196	0,15
citronellol	1228	8,68
pipéritone	1256	0,59
géranial	1268	0,10
acétate de citronellyle	1348	1,56
eugénol	1351	0,53
β-élémane	1389	0,13
acétate de phenylethyle	1392	0,17
β-caryophyllène	1421	1,82
α-humulène	1457	0,10
germacrène-D	1482	0,12
oxyde de caryophyllène	1583	0,17
Total		97,02

IK : Indice de Kowats

Ce résultat confirme celui de certains auteurs sur *E. citriodora* du Bénin (Sohounhloue *et al.* 1996). D'autres sont parvenus à la conclusion selon laquelle le temps de récolte, la durée de séchage, d'extraction et le lieu de récolte influencent de façon significative le pourcentage des différents constituants de l'HE de *E. citriodora* (Moudachirou *et al.* 1999).

La manipulation des huiles, en particulier celles contenant des molécules volatiles comme les aldéhydes, nécessite assez de délicatesse à cause de l'instabilité de ces molécules. Ces

aldéhydes s'oxydent facilement en acide dans certaines conditions (lumière, chaleur etc.) (Elgendy *et al.* 2008, Ouédraogo *et al.* 2009).

4.1.3. Activité antitrypanosomienne des HE

Le test antitrypanosomien réalisé selon le protocole de LILIT, a révélé que l'HE de *C. citratus* inhibe fortement les parasites de trypanosomes ($IC_{50} = 6,80 \mu\text{g/mL}$). Les activités antitrypanosomiennes des HE de *C. schoenanthus* et d'*E. citriodora* sont plutôt modérées avec des valeurs IC_{50} respectives de 16,74 et 17,96 $\mu\text{g/mL}$ (tableau 11). Ce ne serait pas inutile de rappeler que ces trois HE, très bien connues n'ont jamais été testées auparavant sur *Tbb* au Bénin. Vu l'activité de l'HE de *C. citratus* sur ces parasites, on peut conclure que ce travail apporte un plus dans la lutte contre cette maladie redoutable qu'est la trypanosomose. Cependant les données concernant la toxicité de ces HE sont fondamentales pour une meilleure appréciation de cette activité.

4.1.4. Toxicité larvaire des HE

Les huiles essentielles de *C. citratus*, de *C. schoenanthus* et d'*E. citriodora* ont indiqué les valeurs LC_{50} respectives de 78 $\mu\text{g/ml}$, 107 $\mu\text{g/ml}$ et 106 $\mu\text{g/ml}$ au cours de ces tests de toxicité (tableau 6). Toutes les huiles ont chacune, une valeur LC_{50} supérieure à 30 $\mu\text{g/ml}$. Selon la littérature, elles sont peu toxiques (Meyer *et al.* 1982).

Tableau 6 : Propriétés pharmacologiques des HE

	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
HE de <i>C. citratus</i>	78	6,80	11,47
HE de <i>C. schoenanthus</i>	107	16,74	6,39
HE d'<i>E. citriodora</i>	106	17,96	5,90

Ce ne serait pas inutile de mentionner dans cette partie, la corrélation observée entre l'activité antitrypanosomienne et la toxicité des huiles. En effet, l'huile la plus active sur les parasites est la plus toxique. Celle qui a la plus faible activité est la moins toxique. L'activité des huiles essentielles étudiées croit donc avec leur toxicité (tableau 6).

4.1.5. Index de sélectivité

La valeur de l'index de sélectivité de l'HE de *C. citratus* sur les parasites de trypanosomes est la plus élevée (IS = 11,47). L'HE de *Cymbopogon citratus* est donc l'huile la plus sélective. Quoique les activités des HE de *C. schoenanthus* (IS = 6,39) et de *E. citriodora* (IS = 5,90) soient modérées, on constate quand même une certaine sélectivité de ces huiles. La bonne sélectivité de l'HE de *C. citratus* a orienté la suite de ce travail vers l'étude de sa toxicité aiguë.

4.1.6. Toxicité aiguë de l'HE de *C. citratus*

Au cours des études toxicologiques de cette HE, plusieurs réactions ont été notées chez les rats. Une diminution du poids des animaux est observée à partir de la dose de 2 mL/kg. Cette diminution s'accroît avec l'augmentation de la dose. Il n'y a pas eu d'observation particulière chez les rats ayant pris la dose de 1 mL/kg (889 mg/ml). Tous les rats ayant consommé cette huile (les survivants) ont passé plus de temps à s'abreuver durant les 14 jours d'expérimentation.

Les rats ayant consommé une faible dose de l'huile essentielle ont eu un gain de poids le lendemain de l'expérience (reste à savoir si les poids de ces rats n'ont pas été influencés par la masse d'eau qu'ils consomment). La dose de 1 mL/kg constitue donc la dose sans effet toxique observable. Ceux ayant consommé des doses supérieures ou égales à 2 mL/kg ont perdu légèrement de poids. La dose de 4 mL/kg a induit un cas de décès. Elle constitue donc la dose minimale mortelle. Les rats auxquels a été administrée une dose de 5 mL/kg de cette huile sont tous morts. La dissection de ces animaux après leur décès a

montré des lésions sur les parois de leurs intestins. En effet, la dissection de tous les animaux le 14^{ème} jour révèle la présence de ces lésions intestinales à partir d'une dose de 2 mL/kg. Cette réaction serait certainement due à l'agressivité de l'huile essentielle (Fandohan *et al.* en 2008). Le citral contenu dans cette huile pourrait entre autre, être à l'origine de cette agressivité (Hoberman *et al.* 1989). On a même remarqué une déformation des contenants en plastique qui ont été en contact avec cette huile au cours des expérimentations. La courbe traduisant le pourcentage de décès par rapport à la dose reçue a permis de déterminer la dose létale de cette huile qui est de 4.25 mL/kg (fig. 31). Cette huile en tant qu'une substance liquide est peu toxique selon l'échelle adoptée par l'OCDE en 2001.

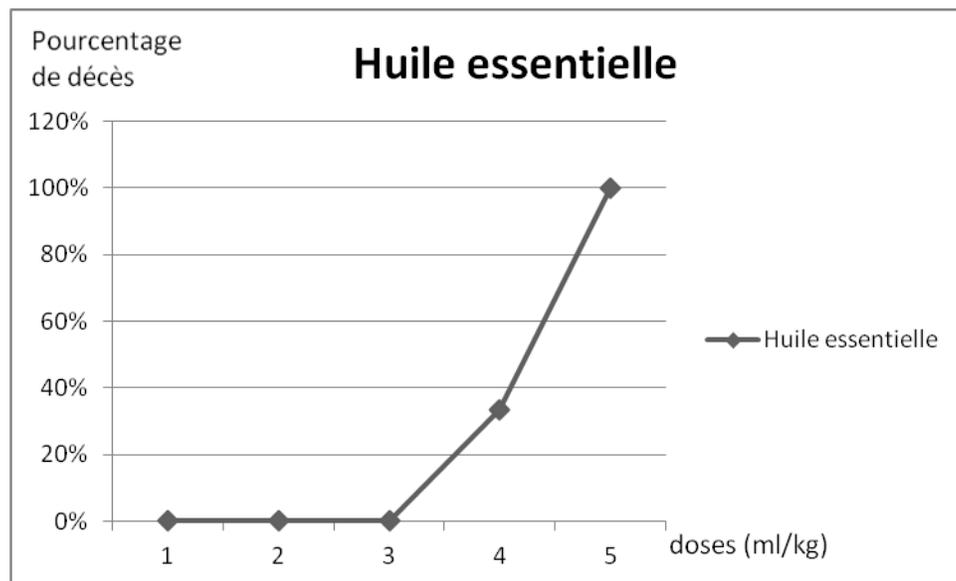


Figure 31 : Pourcentage de décès par rapport à la dose d'huile essentielle

4.1.7. Conclusion

Les plantes étudiées ont des rendements acceptables en HE. Toutes les études pharmacologiques menées dans cette partie convergent vers la bonne sélectivité de l'HE de *C. citratus* sur *Trypanosoma brucei brucei*. Mais certains facteurs sont à prendre en compte. En effet, la composition chimique de ces HE peut changer sous l'influence de plusieurs facteurs. On sait également que la modification de la composition chimique

d'un médicament aussi minime soit-elle peut fortement influencer l'activité de ce dernier. Ces HE sont aussi très riches en composés carbonylés très oxydables et volatils. Leur agressivité sur les muqueuses, les parois de l'estomac et de l'intestin a été aussi décrite (Morton *et al.* 1981, Fandohan *et al.* 2008). On pourrait en partie, attribuer l'activité de ces huiles à la présence des composés majoritaires et penser à les séparer. Mais les composés carbonylés sont aussi dermocaustifs et agressifs (Hoberman *et al.* 1989, Gaworski *et al.* 1992, Lalko *et al.* 2008). On pense que ces composés seraient à la base de l'agressivité des huiles. Du coup, leurs usages en industrie pharmaceutique passent surtout par l'élaboration d'autres composés moins agressifs (Dawson *et al.* 1994). Dans notre cas, nous avons alors pensé contourner nombre de ces facteurs défavorables à l'usage interne de ces HE dans le traitement de la trypanosomose en réalisant *in situ* une série de thiosemicarbazones à partir des composés carbonylés contenus dans ces HE. L'avantage de ce travail est lié au fait que les semicarbazones et thiosemicarbazones peuvent être administrés oralement ou par voie parentérale (Feun *et al.* 2002).

4.2. Hémi-synthèse

A partir des composés carbonylés, plusieurs familles des molécules peuvent être synthétisées. C'est le cas des oximes, des hydrazones, des semicarbazones et thiosemicarbazones, des carbazones, etc. Dans ce travail, on s'est intéressé à des molécules de semicarbazones et de thiosemicarbazones. Plusieurs travaux récents font cas de leur importance en chimie pharmaceutique (Opletalová *et al.* 2008). Elles sont obtenues par une réaction de condensation entre un composé carbonylé et un semicarbazide ou un thiosemicarbazide. Ces molécules sont de petites tailles et leurs hydrates ou complexes sont solubles dans l'eau. La méthode conduisant à leur formation à partir des carbonylés d'huiles essentielles est une originalité qui, à notre connaissance, n'a été rapportée nulle part ailleurs.

4.2.1. Propriétés physiques des semi et thiosemicarbazones de la série A

La série A est constituée des molécules de semicarbazones et thiosemicarbazones hémi-synthétisées *in situ* dans l'huile essentielle de *C. citratus*. Les rendements de réaction dans cette série sont compris entre 70 et 91 % (tableau 7). Cette réaction est réalisée mol à mol en considérant que l'HE de *C. citratus* contient 100% de citral. Mentionnons que le citral semicarbazone a une couleur blanche tandis que les couleurs des autres composés tendent du jaune clair au jaune orangé. Ceci pourrait s'expliquer par la substitution de l'atome d'oxygène par l'atome de soufre (couleur jaune). L'augmentation des liaisons conjuguées dans les molécules N-phényles substituées pourraient aussi expliquer l'augmentation de la coloration. De toutes les molécules de la série A hémi-synthétisées, seule la synthèse du composé **2a** a été rapportée dans la littérature à partir du citral commercial (Tarasconi *et al.* 2000). A notre connaissance, c'est au cours de ce travail que les composés **3a**, **4a**, **5a** et **6a** ont été synthétisés pour la première fois.

Tableau 7 : Propriétés physiques des semi et thiosemicarbazones de la série A.

N°	Noms	Formules brutes	M (g/mol)	Points de fusion (°C)	Rendement (%)
1a	Citralsemicarbazone	C ₁₁ H ₁₉ ON ₃	209,04	120	79
2a	citralthiosemicarbazone	C ₁₁ H ₁₉ SN ₃	225,10	105	83
3a	Citral-2-méthyl-3-thiosemicarbazone	C ₁₂ H ₂₁ SN ₃	239	79	73
4a	Citral-4-méthyl-3-thiosemicarbazone	C ₁₂ H ₂₁ SN ₃	239,20	102	80
5a	Citral-4-phényl-3-semicarbazone	C ₁₇ H ₂₃ ON ₃	285,19	78	81
6a	Citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone	C ₁₇ H ₂₃ SN ₃	301,10	82	91

4.2.2. Propriétés physiques des semi et thiosemicarbazones de la série B

A partir de l'huile essentielle de *C. schoenanthus* quatre semicarbazones et thiosemicarbazones ont été hémi-synthétisées *in situ*.

Les pipéritonethiosemicarbazones sont obtenues avec des rendements compris entre 56% et 87% (tableau 8). Dans la série B, avant d'obtenir des rendements acceptables, il a fallu utiliser deux moles de substrat pour une mole de réactif. On pourrait déduire de cette situation, que le citral (aldéhyde) dans l'huile essentielle de *C. citratus* est plus réactive que la pipéritone (cétone) dans l'HE de *C. schoenanthus*. Le pourcentage de citral dans l'HE de *C. citratus* est supérieur à celui de la pipéritone dans l'HE de *C. schoenanthus*. Ce fait pourrait aussi expliquer la réactivité observée dans cette HE. Les composés **1b** et **3b** sont de couleur blanche tandis que les composés **2b** et **4b** sont de couleur jaune. Aucune littérature ne fait cas de l'existence des molécules de la série B. On pense que les pipéritone thiosemicarbazones hémi-synthétisées au cours de ce travail font donc partie des molécules qui font l'originalité de cette thèse.

Tableau 8 : Propriétés physiques des semicarbazones et thiosemicarbazones de la série B

N°	Noms	Formules brutes	M (g/mol)	Points de fusion (°C)	Rendement (%)
1b	Pipéritonesemicarbazone	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O	209,04	196	56
2b	Pipéritonethiosemicarbazone	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ S	225.04	163	67
3b	Pipéritone-4-phényl-3-semicarbazone	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O	285.06	165	71
4b	Pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ S	301.03	120	87

4.2.3. Propriétés physiques des semi et thiosemicarbazones de la série C

Le composé carbonylé ciblé dans l'HE d'*E. citriodora* est le citronellal. Quatre composés ont été aussi obtenus à partir de cet aldéhyde.

La citronellalsemicarbazone **1c**, la citronellalthiosemicarbazone **2c**, la citronellal-4-phényl-3-semicarbazone **3c** et la citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone **4c** sont les

thiosemicarbazones qui proviennent de l'HE d'*E. citriodora*. Ces molécules ont été hémi-synthétisées dans des conditions similaires à celles des molécules de la série B. Le citronellal dans l'HE d'*E. citriodora* a été moins réactif que le citral et la pipéritone. Cette réactivité qui diminue du citral à la pipéritone, puis de la pipéritone au citronellal pourrait s'expliquer comme nous l'avons mentionné par le pourcentage de ces carbonyles dans les HE (tableaux 8, 9 et 10). Toutes les molécules hémi-synthétisées *in situ* dans cette huile essentielle sont de couleur blanche. Les réactions dans cette huile ont eu lieu avec des rendements compris entre 48 % et 77 %. La synthèse de la citronellalthiosemicarbazone a été rapportée dans la littérature (Tarasconi *et al.* 2000). Mais aucune littérature ne fait cas de l'existence des molécules **3c** et **4c**. A notre connaissance, c'est au cours de ce travail qu'elles ont été synthétisées pour la première fois. Les structures et les caractéristiques physiques de ces molécules sont mentionnées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Propriétés physiques des semicarbazones et thiosemicarbazones de la série C

N°	Structures	Formules brutes	M (g/mol)	Points de fusion (°C)	Rendements (%)
1c	Citronellalsemicarbazone	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O	211,17	83	48
2c	citronellalthiosemicarbazone	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ S	227,0	178	67
3c	Citronellal-4-phényl-3-semicarbazone	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O	287,27	120	58
4c	Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ S	303,15	143	77

4.2.4. Détermination des structures

- Spectres IR des molécules de la série A

Les spectres IR de ces composés montrent des bandes avec des épaulements ou deux bandes avec des fréquences de vibration très proches. Cela peut faire penser à la présence

des thiosemicarbazones des deux isomères de la citralthiosemicarbazones du néral et thiosemicarbazones du géranial).

En général, les fréquences de vibration des liaisons N-H du groupe NH₂ sont les plus élevées. Pour chaque groupe NH₂ nous avons deux fréquences de vibration. La non équivalence des protons sur l'azote d'un amide primaire est provoquée par la rotation entravée autour du lien C-N à cause de la contribution de la forme de résonance (fig. 32) (Silverstein *et al.* 2007).

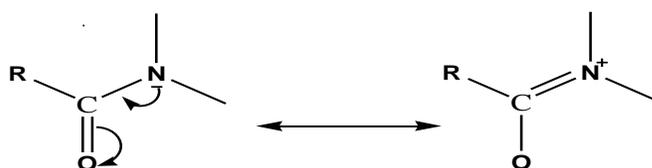


Figure 32: Caractère π de la liaison CN

Dans le cas de la 4-méthyl-3-thiosemicarbazone et de la 4-phényl-3-thiosemicarbazone, la deuxième valeur de NH₂ disparaît selon que l'hydrogène est remplacé par le méthyle ou le phényle. Les fréquences de vibration suivantes sont celles de la liaison N-H secondaire. Elles sont comprises entre 3280 cm⁻¹ et 3165 cm⁻¹.

La substitution de l'hydrogène par le méthyle sur cet azote conduit à l'absence de cette fréquence de vibration chez la 2-méthyl-3-thiosemicarbazone. La fréquence de vibration du groupe -CH₃ est également présente et se situe entre 3028 cm⁻¹ et 3158 cm⁻¹. La fonction carbonyle (C=O) des semicarbazones indique une fréquence de vibration autour de 1661 cm⁻¹ qui est absente dans les différentes thiosemicarbazones présentant plutôt au niveau du groupe C=S une fréquence de déformation des thioamides comprise entre 836 cm⁻¹ et 857 cm⁻¹. La présence du groupe C=N autour de 1600 cm⁻¹ nous rassure quand à la formation des molécules de semicarbazones et de thiosemicarbazones. Les valeurs des fréquences de vibration correspondantes aux différentes fonctions du composé **2a** sont similaires à celles trouvées dans la littérature (Tarasconi *et al.* 2000), (tableau 10).

Tableau 10 : Fréquence de vibration des fonctions du composé **2a** d'après littérature

	IR (cm ⁻¹) de la Citral thiosemicarbazone			
	(-NH ₂)	(-NH-)	(CN)	(CS)
Littérature (Tarasconi <i>et al.</i> 2000) (300 MHz, CDCl ₃)	3381 et 3264	3161	1641	835
Travaux (400 MHz, CDCl ₃)	3373 et 3271	3165	1643	836

- Spectres IR des molécules de la série B

Dans les spectres IR des semicarbazones, les fréquences de vibration comprises entre 1671 et 1685 cm⁻¹ indiquent la présence de la fonction C=O. Au niveau des thiosemicarbazones, on observe plutôt des fréquences de déformation correspondant à la fonction C=S. Leurs valeurs sont comprises entre 831 et 853 cm⁻¹. En dehors de ces bandes caractéristiques, on observe également, les fréquences de vibrations de la liaison –NH- comprises entre 3145 et 3323 cm⁻¹. Les fréquences de vibration de la fonction –NH₂ apparaissent aussi autour de 3445 et 3535 cm⁻¹.

- Spectres IR des molécules de la série C

La fonction C=O caractérisant les semicarbazones du citronellal apparaît en IR entre 1684 et 1668 cm⁻¹. On note également les fréquences de déformations liées à la fonction C=S au niveau des thiosemicarbazones du citronellal. Leurs valeurs sont comprises entre 979 et 878 cm⁻¹. Les spectres de tous les composés montrent des bandes caractéristiques de la fonction C=N entre 1600 et 1576. Les fréquences de vibration de la fonction -NH₂ sont les plus élevées et se retrouvent entre 3639 et 3481 cm⁻¹. La présence de l'amine secondaire est aussi mentionnée dans tous les composés aux environs de 3100 cm⁻¹. Ces valeurs sont aussi confirmées par la littérature (tableau 11).

Tableau 11 : Fréquence de vibration des fonctions du composé 2c d'après littérature

IR (cm ⁻¹) de la Citronellal thiosemicarbazone				
	(-NH ₂),	(-NH-)	(C=N)	(C=S)
Littérature (Tarasconi <i>et al.</i> 2000)	3407 et 3261	3162	1595	928 et 820
Travaux	3534 et 3445	3177	1576	979

- RMN ¹H des molécules de la série A

Le déplacement chimique de l'hydrogène de l'amine secondaire est plus élevé dans tous les cas comme l'indique la littérature (tableau 12). Le déblindage de cet hydrogène peut s'expliquer par la présence des deux groupes électro-attracteurs (C=O, C=S) qui entourent l'azote le portant. De façon prévisible, on note une absence de déplacement chimique de cet hydrogène au niveau de la citral-2-méthyl thiosemicarbazone puisque ce dernier est remplacé par un groupe méthyle. Les deux hydrogènes de l'azote terminal indiquent toutes les fois deux différents déplacements chimiques comme au niveau des spectres IR. Les déplacements chimiques des protons éthyléniques se trouvent entre 5,95 ppm et 4,8 ppm. Ceux des radicaux méthyles ont leur déplacement entre 1,7 ppm et 2,3 ppm. Le groupe méthyle qui substitue l'hydrogène des atomes d'azote est fortement déblindé et se retrouve entre 3,2 ppm et 3,7 ppm.

Tableau 12 : Déplacements chimiques des protons du composé 2a d'après littérature

RMN ¹ H du Citral thiosemicarbazone			
	=NNH-	-CH=N	-NH ₂
Littérature (Tarasconi <i>et al.</i> 2000) (300 MHz, CDCl ₃)	10,48	7,94	7,03 et 6,77
Travaux (400 MHz, CDCl ₃)	10,2	7,9	7,1 et 7,2

- RMN ^1H des molécules de la série B

Comme dans le cas des thiosemicarbazones du citral, le proton de l'azote en position 2 est le plus déblindé et son déplacement chimique se situe entre 8,6 et 9,3 ppm. Les protons de l'azote terminal sont aussi déblindés et présentent chacun un pic. Leurs valeurs sont comprises entre 6,8 et 8,9 ppm. Le proton vinylique est aussi déblindé et son déplacement chimique se retrouve entre 5,6 et 6,2 ppm. Les protons aromatiques ont des déplacements chimiques autour de 7,1 et 7,7 ppm. Les protons méthyliques, éthyléniques sont aussi présents sur ces spectres.

- RMN ^1H des molécules de la série C

Comme dans les cas précédents, le proton du groupe =NNH- est le plus déblindé avec δ compris entre 9,7 et 8,2 ppm, puis le proton du groupe -CH=N- avec un déplacement chimique compris entre 7,3 et 7,9 ppm. Ensuite viennent les protons de l'azote terminal qui sont un peu moins déblindés (déplacements chimiques entre 7,0 et 7,7 ppm). Ces résultats sont proches des travaux de Tarasconi *et al.* (tableau 13). Le proton vinylique est également présent avec un déplacement chimique entre 4,2 et 5,2 ppm. Les spectres fournissent également des informations sur les protons des groupes méthyliques et éthyléniques.

Tableau 13 : Déplacements chimiques des protons du composé 2c d'après littérature

	RMN ^1H du Citronellal thiosemicarbazone		
	=NNH-	-CH=N	-NH ₂
Littérature (Tarasconi <i>et al.</i> 2000) (300 MHz, CDCl ₃)	9,76	7,29	7,05 et 6,38
Travaux (400 MHz, CDCl ₃)	9,5	7,3	7,0 et 7,1

- RMN ^{13}C des molécules de la série A

A la lecture des spectres RMN ^{13}C , on remarque souvent la présence de deux pics de déplacement chimique très proches pour chaque atome de carbone. Ce qui confirme l'existence des semicarbazones et des thiosemicarbazones des deux isomères du citral.

Les carbones des groupes C=O (autour de 155 ppm) et C=S (autour de 178 ppm) sont les plus déblindés. Les déplacements chimiques des carbones vinyliques se retrouvent entre 141 à 120 ppm, les méthylènes allyliques de 40 à 30 ppm et les groupes méthyles de 26 à 17 ppm. Les aromatiques sont également présents et se retrouvent entre 122 et 132 ppm.

- RMN ^{13}C des molécules de la série B

Les semicarbazones sont souvent caractérisées par le déplacement chimique du carbone du groupe C = O (δ entre 154 et 158 ppm). Dans les thiosemicarbazones, le carbone du groupe C=S est le plus déblindé avec δ compris entre 178 et 182 ppm. Le déplacement chimique du carbone du groupe C = N se situe entre de 142 et 145 ppm. Les carbones du groupes vinylique, éthylique, méthylique sont aussi présents et se retrouvent respectivement aux environs de 128, 28, 16 ppm. Les carbones aromatiques des N-phényl thiosemicarbazones substituées sont aussi mentionnés et se retrouvent entre 120 et 134 ppm.

- RMN ^{13}C des molécules de la série C

En RMN ^{13}C , le pic du groupe C=O des semicarbazones est très remarquable avec un déplacement chimique entre 157 et 158 ppm. Celui correspondant au groupe C=S des thiosemicarbazones apparait entre 178 et 182 ppm. Le groupe C=N est également présent entre 143 et 146 ppm.

Toutes les analyses spectrométriques effectuées sur les molécules donnent d'amples informations en ce qui concerne leurs structures et ces valeurs sont proches de celles de la littérature.

Les objectifs fixés au début de ce travail sont partiellement atteints, puisque des molécules de thiosemicarbazones ont pu être hémi-synthétisées *in situ* dans chacune de ces huiles et caractérisées.

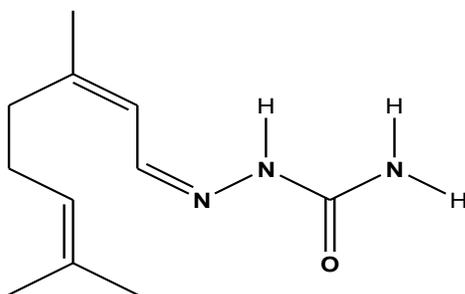
- Spectrométrie de masse des molécules de la série A

Il existe très peu de différence entre les masses calculées et les masses trouvées. Cela confirme l'obtention des composés.

4.2.2.1. Caractéristiques spectrométriques des molécules de la série A

Les structures et les caractéristiques spectrométriques en spectrométrie de masse (SM), en infrarouge (IR), en RMN ^1H et ^{13}C des semicarbazones et thiosemicarbazones hémi-synthétisées sont mentionnées ci-dessous.

Citralsemicarbazone (**1a**)



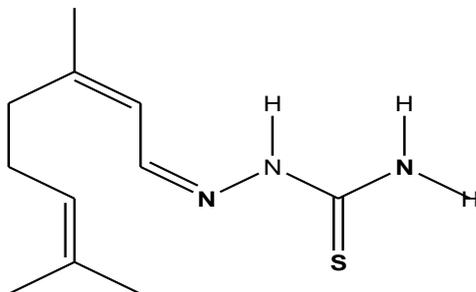
SM : $[\text{MH}]^+$ calculée : 210,15 $[\text{MH}]^+$ trouvée : 210,04.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3429 (NH_2); 3310 (NH); 1661 (C=O); 1598 (C=N); 1598 (C=C).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 154 (C=O); 147 (C=N); 140, 121 (C=C); 39, 26 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 23; 24 et 18 (CH_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 1,3 (d, 3H, $-\text{CHCH}_3$); 1,4 et 1,5 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,1 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2$); 4,9 (m, 1H, $-\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$); 5,9 (d, 1H, $=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}-$); 7,6 et 7,7 (s, 2H, $-\text{NH}_2$); 7,1 (d, 1H, $=\text{CHCH}=\text{N}$); 9,8 et 9,9 (s, 1H, $=\text{NNH}-$).

Citralthiosemicarbazone (**2a**)

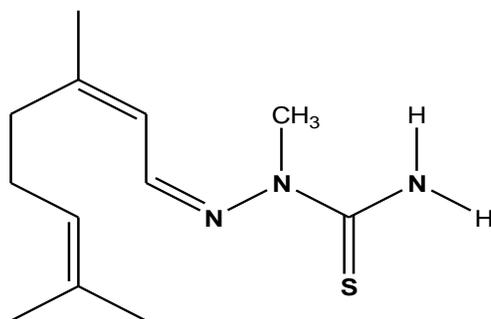


SM : $[\text{MH}]^+$ calculée : 226,13 $[\text{MH}]^+$ trouvée : 226,10.

IR ν (NaCl , cm^{-1}): 3373 et 3271 (NH_2); 3165 (NH); 1643 ($\text{C}=\text{N}$); 1609 ($\text{C}=\text{C}$) ; 836 ($\text{C}=\text{S}$). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 100MHz) $\delta(\text{ppm})$: 178 ($\text{C}=\text{S}$); 142 ($\text{C}=\text{N}$) ; 139 et 121 ($\text{C}=\text{C}$) ; 31 et 27 (CH_2-CH_2); 25; 22 et 19 (CH_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 1,6 (d, 3H, $-\text{CHCH}_3$); 1,7, et 1,8 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,2 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2$); 5,1 (m, 1H, $-\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$); 5,9 (d, 1H, $=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}-$); 7,1 et 7,2 (s, 2H, $-\text{NH}_2$); 7,9 (d, 1H, $=\text{CHCH}=\text{N}$); 10,2 (s, 1H, $=\text{NNH}-$).

Citral-2-méthyl-3-thiosemicarbazone (**3a**)



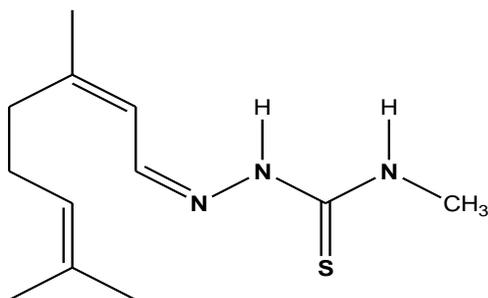
SM : $[MH]^+$ calculée : 240,15 $[MH]^+$ trouvée : 240,09.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3427 et 3251 (NH_2); 1642 (C=N); 1586 (C=C) ; 857 (C=S).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 181(C=S) ; 140 (C=N); 135 et 121 (C=C) ; 40 et 33 (CH_2-CH_2); 26 (NCH_3); 18; 23 et 24 (CH_3).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400MHz), δ (ppm): 1,6 (d, 3H, $-CHCH_3$); 1,7 et 1,8 (s, 6H, $-C(CH_3)_2$); 2,2 (m, 4H, $-H_2C-CH_2$); 3,6(s, 3H, NCH_3) ; 5 (m, 1H, $-CH=(CH_3)_2$); 5,9 et 6,1 (d, 2H, $=CH-CH=N-$); 7,2 (d, 1H, $=CHCH=N$); 7,6 (s, 2H, $-NH_2$).

Citral-4-méthyl-3-thiosemicarbazone (**4a**)



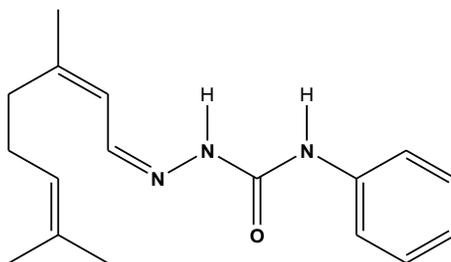
SM : $[MH]^+$ calculée : 240,15 $[MH]^+$ trouvée : 240,2.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3424 (NH); 3275 (NH); 1639 (C=N); 1544 (C=C) ; 855 (C=S).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) $\delta(\text{ppm})$: 179 (C=S); 143 (C=N) ; 134 , 122 (C=C) ; 40 ; 32 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) ; 25 (NCH_3); 17, 22, 24 (CH_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 1,6 (d, 3H, $-\text{CHCH}_3$); 1,7 et 1,8 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,1 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C-CH}_2$); 3,1(s, 3H, NHCH_3) ; 5 (m, 1H, $-\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$); 5,8, (d, 1H, $=\text{CH-CH=N-}$); 7,2 (m, 1H, $-\text{NHCH}_3$) ; 7,8 (t, 1H, $=\text{CHCH=N}$); 9,9 (s, 1H, $=\text{N-NH-}$).

Citral-4-phényl-3-semicarbazone (**5a**)

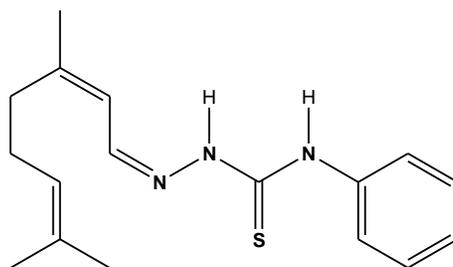


SM : $[\text{MH}]^+$ calculée : 286,18 $[\text{MH}]^+$ trouvée : 286,19.

IR ν (NaCl , cm^{-1}): 3662 (NHPh); 3443 (NH) ; 1693 (C=O) ; 1594 (C=N); 1539 (C=C).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) $\delta(\text{ppm})$: 153 (C=O); 145 (C=N) ; 131 et 125 (C=C) ; 119, 120, 122 (aromatiques); 38 et 30 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) ; 23 (NCH_3); 17 ; 22 et 23 (CH_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 1,7 (d, 3H, $-\text{CHCH}_3$); 1.8 et 1.9 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,1 et 2,2 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C-CH}_2$) ; 5,1 (m, 1H, $-\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$); 6 (d, 1H, $=\text{CH-CH=N-}$); 7 ; 7,3 et 7,5 (aromatiques) 7,8 (d, 1H, $=\text{CHCH=N}$); 8 (s, 1H, $-\text{NHPh}$) ; 9,8 (s, 1H, $=\text{NNH-}$).

Citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone (**6a**)

SM : $[MH]^+$ calculée : 302,16 $[MH]^+$ trouvée : 302,10.

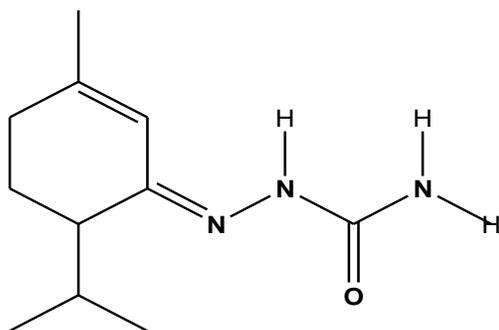
IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3418 (-NHPH); 3280 (NH) ; 1644 (C=N); 1595 (C=C) ; 855 (C=S).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 181 (C=S); 140 (C=N); 135 ; 121(C=C) ; 121, 122, 124 (aromatiques); 40 ; 35 ; 23 ; 18 (CH_3).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400MHz), δ (ppm): 1,5 (d, 3H, - $CHCH_3$); 1,7, et 1,8 (s, 6H, - $C(CH_3)_2$); 2,1 (m, 4H, - H_2C-CH_2) ; 5,1 (m, 1H, - $CH=(CH_3)_2$); 5,9 (d, 1H, = $CH-CH=N-$); 7,1 ; 7,2 ; 7,5 (aromatiques) 7,9 (d, 1H, = $CHCH=N$); 9,1 (s, 1H, -NHPH) ; 10,4 (s, 1H, = $NNH-$).

4.2.2.1. Caractéristiques spectrométriques des molécules de la série B

Les structures et les caractéristiques spectrométriques des molécules de la série B sont mentionnées ci-dessous.

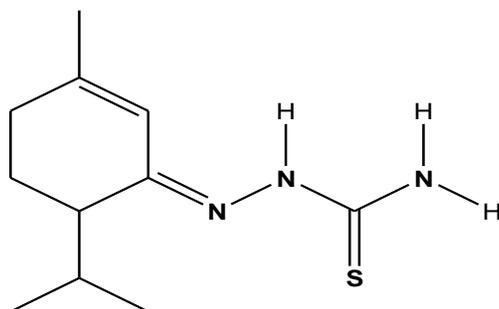
Pipéritonesemicarbazone (**1b**)

SM : $[MH]^+$ calculée : 210,0 $[MH]^+$ trouvée : 210,04.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3530 et 3440 (NH_2); 3145 (NH); 1576 (C=N); 1671 (C=O); 1471 et 1375 (C=C).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 156 (C=O); 145 (C=N); **132** et **128** ($H_2CC=CC=N$); **41** et **36** ($-CH-CH(CH_3)_2$); **39**; 34 (CCH_2-CH_2CH); 31 ($-CH_3$); 19 et 21 ($C(CH_3)_2$).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400MHz), δ (ppm): 1,2 et 1,3 (d, 6H, $-C(CH_3)_2$); 1,9 (s, 3H, $-CH_3$); 2,2 et 2,3 (m, 4H, $2CH_2$); 2,4 (m, 1H, $-CH(CH_3)_2$); 2,5 (m, 1H, $N=CCH-$); 5,6 (s, 1H, $C=CH$); 6,8 et 6,9 (s, 2H, $CSNH_2$); 8,8 (s, 1H, $=NNH-$).

Pipéritonethiosemicarbazone (**2b**)

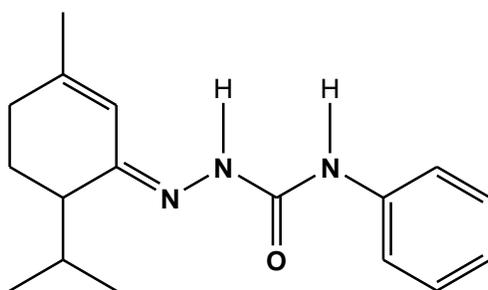
SM : $[MH]^+$ calculée : 226,13 $[MH]^+$ trouvée : 226,04.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3587 et 3523, (NH_2); 3261 (NH); 1606 (C=N); 1495 et 1476 (C=C); 831 (C=S).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 178 (C=S); 145 (C=N); **121** et 118 ($-H_2CC=CC=N$); **43** et 29 ($-CH-CH(CH_3)_2$); **40** et 28 (CCH_2-CH_2CH); 25 ($-CH_3$); 21 et 19 ($C(CH_3)_2$).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400MHz), δ (ppm): 0,9 et 1,0 (d, 6H, $-C(CH_3)_2$); 1,7 (s, 3H, $-CH_3$); 1,6 et 1,9 (m, 4H, $2CH_2$); 2,2 (m, 1H, $-CH(CH_3)_2$); 2,3 (m, 1H, $-CHC=N$); 6,1 (s, 1H, $C=CH$); 7,1 et 7,2 (s, 2H, $CSNH_2$); 8,6 et 8,8 (s, 1H, $=NNH-$).

Pipéritone-4-phenyl-3-semicarbazone (**3b**)



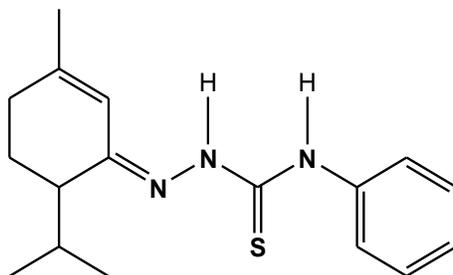
SM : $[MH]^+$ calculée : 286,18 $[MH]^+$ trouvée : 286,06.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3607 ($-NHPh$); 3198 (NH); 1685 (C=O); 1602 (C=N); 1499 et 1447 (C=C).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 155 (C=O); 142 (C=N); **132** et 122 ($-H_2CC=CC=N$); **40**; 25 ($-CH-CH(CH_3)_2$); **32** et 25 (CCH_2-CH_2CH); 24 ($-CH_3$); 20 et 19 ($C(CH_3)_2$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 0,9 et 1,1 (d, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,6 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2 et 2,1 (m, 4H, 2CH_2); 2,2 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,4 (m, 1H, $\text{N}=\text{CCH}$); 5,6 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$); 7,1; 7,3 et 7,5 (H aromatiques) ; 8,3 (s, 1H, CSNH); 9,1; (s, 1H, $=\text{NNH}-$).

Pipéritone-4-phenyl-3-thiosemicarbazone (**4b**)



SM : $[\text{MH}]^+$ calculée : 302,16 $[\text{MH}]^+$ trouvée : 302,03.

IR ν (NaCl , cm^{-1}): 3522 ($-\text{NHPh}$); 3323 (NH); 1591 ($\text{C}=\text{N}$); 1539 et 1487 ($\text{C}=\text{C}$); 853 ($\text{C}=\text{S}$).

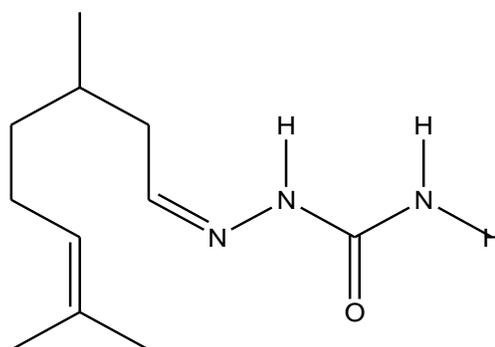
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) $\delta(\text{ppm})$: 182 ($\text{C}=\text{S}$); 144 ($\text{C}=\text{N}$); **130** et 123 ($-\text{H}_2\text{CC}=\text{CC}=\text{N}$) ; **43** et 29 ($-\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); **39** et 27 ($\text{CCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}$); 22 ($-\text{CH}_3$); 20 et 19 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 0,8 et 1,1 (d, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,6 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2,1 et 2,4 (m, 4H, 2CH_2); 2,3 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,4 (m, 1H, $\text{N}=\text{CCH}-$); 6,1 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$); 7,2; 7,3 et 7,7 (H aromatiques) ; 8,8 (s, 1H, CSNH); 9,3 (s, 1H, $=\text{NNH}-$).

4.2.2.2. Caractéristiques spectrométriques des molécules de la série C

Comme dans les cas précédents, les analyses spectrométriques ont permis de confirmer les structures des thiosemicarbazones du citronellal.

Citronellalsemicarbazone (1c)

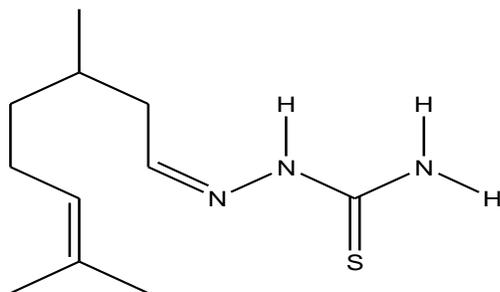


SM : $[MH]^+$ calculée : 212,17 $[MH]^+$ trouvée : 212,17.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3594 et 3481 (NH_2); 3182 (NH); 1668, (C=O); 1578 (C=N); 1518 et 1449 (C=C).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 158 (C=O); 146 (C=N); 122 et **128** ($H_2CC=C(CH_3)_2$); **35** et 37 ($CHCH_2CN$); **23** et 34 ($HCCH_2CH_2C=$); 20 ($-CH_3$); 27 et 28 ($=C(CH_3)_2$).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400MHz), δ (ppm): 1,0 (d, 3H, $-CHCH_3$); 1,3, et 1,4 (s, 6H, $-C(CH_3)_2$); 1,6 (m, 2H, $-CH_2CH$); 1,9 (m, 2H, $-CH_2CH=$); 2,2 (m, 1H, $-CHCH_2$); 2,6 (t, 2H, $-CH_2CH=N$); 4,3 (t, 1H, $-CH=C(CH_3)_2$); 6,8 (t, 1H, $-CH=N$); 7,2 et 7,4 (s, 2H, $-NH_2$); 8.2 (s, 1H, $=NNH-$).

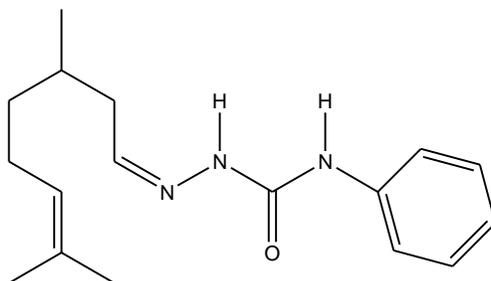
Citronellalthiosemicarerbazone (**2c**)


SM : $[MH]^+$ calculée : 228,15 $[MH]^+$ trouvée : 228,00.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3534 et 3445 (NH_2); 3177 (NH); 1576 (C=N); 1483 et 1459, (C=C); 979 (C=S).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) δ (ppm): 178 (C=S); 144 (C=N); 126 et **128** ($H_2CC=C(CH_3)_2$); **38** et 39 ($CHCH_2CN$); **23** et 38 ($HCCH_2CH_2C=$); 22 ($-CH_3$); 30 et 31 ($=C(CH_3)_2$).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400MHz), 1.6 (d, 3H, $-CHCH_3$); 1.9, et 1.9 (s, 6H, $-C(CH_3)_2$); 1.6 (m, 2H, $-CH_2CH$); 2,2 (m, 1H, $-CHCH_2$); 2,5 (m, 2H, $-CH_2CH=$); 3.5 (t, 2H, $-CH_2CH=N$); 5.2 (t, 1H, $-CH=C$); 7.0 et 7,1 (s, 2H, $-NH_2$); 7.3 (t, 1H, $-CH=N$); 9.5 (s, 1H= $NNH-$).

 Citronellal-4-phenyl-3-semicarbazone (**3c**)


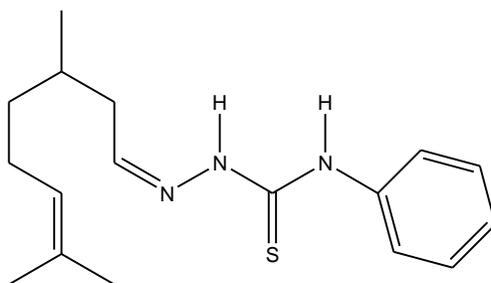
SM : $[MH]^+$ calculée : 288,2 $[MH]^+$ trouvée : 288,27.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3529 (NHPH); 3200 (NH); 1684 (C=O); 1594 (C=N); 1500 et 1446 (C=C).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 158 (C=O); 143 (C=N); 130 et **134** ($\text{H}_2\text{CC}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$); **33** et 40 (CHCH_2CN); **24** et 26 ($\text{HCCH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 18 ($-\text{CH}_3$); 25 et 26 ($=\text{C}(\text{CH}_3)_2$); les aromatiques : 125 ; 126 ; 128 et 134.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), 1,1 (d, 3H, $-\text{CHCH}_3$); 1.6 et 1.8 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}$); 2,2 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2$); 2.2 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$); 2,8 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{N}$); 4.2 (t, 1H, $-\text{CH}=\text{C}$); 7,2; 7,3 et 7,5 (H aromatiques) 7.7 (s, 1H, $-\text{NHPH}$); 7.9 (t, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$); 8.6 (s, 1H= NNH -).

Citronellal-4-phenyl-3-thiosemicarerbazone (**4c**)



SM : $[\text{MH}]^+$ calculée : 304,18 $[\text{MH}]^+$ trouvée : 304,15.

IR ν (NaCl, cm^{-1}): 3528 ($-\text{NHPH}$); 3181 (NH); 1600 et 1590 (C=N); 1498 et 1458 (C=C); 878 (C=S).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 183 (C=S); 142 (C=N); 133; **138** ($\text{H}_2\text{CC}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$); **34** et 40 (CHCH_2CN); **24** et 27 ($\text{HCCH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 18 ($-\text{CH}_3$); 25 et 26 ($=\text{C}(\text{CH}_3)_2$); les aromatiques : 124 ; 126 ; 128 et 130.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), 1,7 (d, 3H, $-\text{CHCH}_3$); 1,8, et 1,8 (d, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,9 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}$); 2,3 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2$); 2,8 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$); 3,4 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{N}$); 4,6 (t, 1H, $-\text{CH}=\text{C}$); 7,1; 7,3 et 7,4 (H aromatiques) 7,6 (s, 1H, $-\text{NHPh}$); 7,8 (t, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$); 9,7 (s, 1H, $=\text{NNH}-$).

4.3. Tests biologiques

4.3.1. Activités antitrypanosomiennes des thiosemicarbazones

Les masses des molécules de synthèse sont connues. Après la détermination des demi-concentrations inhibitrices (IC_{50}) en $\mu\text{g/mL}$, on peut accéder à la valeur de cette dernière en micromolaire (μM). Cette unité est de plus en plus utilisée dans la littérature pour exprimer l'activité des molécules pures. L'échelle utilisée dans le présent travail pour apprécier les propriétés antitrypanosomiennes des molécules obtenues, est celle adoptée par Du *et al.* en 2002 puis Fujii *et al.* en 2005. Selon ces auteurs une molécule de thiosemicarbazone est trypanocide, lorsque sa valeur IC_{50} est inférieure ou égale à $10 \mu\text{M}$. Lorsque cette valeur est comprise entre $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$, la molécule est considérée comme un agent antitrypanosomien modéré. Quand la valeur de l' IC_{50} est supérieure à $100 \mu\text{M}$, la semicarbazone ou la thiosemicarbazone possède une activité faible ou nulle (Du *et al.* 2002, Fujii *et al.* 2005).

La suramine naphthylurée hexasulfonée est utilisée fréquemment comme médicament antitrypanosomien et plus récemment pour le traitement de certaines tumeurs malignes (Lindman *et al.* 1994, Villalona-Calero *et al.* 2008). Cette molécule a servi de référence au cours des tests antitrypanosomiens et a donné une valeur IC_{50} de $0,11 \mu\text{g/mL}$ (soit $0,085 \mu\text{M}$ en raison de sa masse molaire moléculaire élevée $1297,28 \text{ g/mol}$).

Les demi-Concentrations Inhibitrices (IC_{50}) des molécules testées au cours de ces tests sont mentionnées dans le tableau 14. A notre connaissance aucune des molécules hémi-

synthétisées dans ce travail n'a été testée auparavant sur les parasites de trypanosomes. La citral thiosemicarbazone ainsi que la citronellal thiosemicarbazone dont les synthèses avaient été effectuées à partir du citral et du citronellal purs commerciaux ont été utilisés contre la prolifération des cellules de leucémie (Tarasconi *et al.* 2000).

Tableau 14 : Activité antitrypanosomienne des semi et thiosemicarbazones

Composés	IC ₅₀ (µM)*	Activités
Semi et thiosemicarbazones de la série A		
Citralsemicarbazone 1a	234,64	Faible
Citralthiosemicarbazone 2a	7,61 ± 0,63	Trypanocide
Citral-2-méthyl-3-thiosemicarbazone 3a	60,87 ± 4,7	Modérée
Citral-4-méthyl-3-thiosemicarbazone 4a	172,84	Faible
Citral-4-phényl-3-semicarbazone 5a	18,10 ± 0,15	Modérée
Citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone 6a	1,96 ± 0,28	Trypanocide
Semi et thiosemicarbazones de la série B		
Pipéritonesemicarbazone 1b	478,47	Faible
Pipéritonethiosemicarbazone 2b	74,58 ± 2,63	Modérée
Pipéritone-4-phényl-3-semicarbazone 3b	10,90 ± 1,1	trypanocide
Pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone 4b	8,63 ± 0,33	trypanocide
Semi et thiosemicarbazones de la série C		
Citronellal-semicarbazone 1c	473,93	faible
Citronellalthiosemicarbazone 2c	440,53	faible
Citronellal-4-phényl-3-semicarbazone 3c	57,26 ± 0,66	modérée
Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone 4c	19,63 ± 2,33	modérée

(µM)* = micromol/l ou micromolaire

En nous basant sur l'échelle décrite précédemment, il apparaît que les composés **2a** ($IC_{50} = 7,61 \mu M$) et **6a** ($IC_{50} = 1,96 \mu M$), **3b** ($IC_{50} = 10,90 \mu M$) et **4b** ($IC_{50} = 8,63 \mu M$) sont trypanocides.

Au nombre des composés possédant une activité modérée, on cite les semicarbazones et thiosemicarbazones **3a** ($IC_{50} = 60,87 \mu M$), **5a** ($IC_{50} = 18,10 \mu M$), **2b** ($IC_{50} = 74,58 \mu M$), **3c** ($IC_{50} = 57,26 \mu M$) et **4c** ($IC_{50} = 19,63 \mu M$).

La citral Semicarbazone **1a** ($IC_{50} = 234 \mu M$), la citral-4-méthyl-3-thiosecarbazone **4a** ($IC_{50} = 172,84 \mu M$), la pipéritonesemicarbazone **1b** ($IC_{50} = 478,47 \mu M$), la citronellalsemicarbazone **1c** ($IC_{50} = 473,93 \mu M$) et la citronellalthiosemicarbazone **2c** ($IC_{50} = 440,53 \mu M$) n'ont pratiquement pas d'effet sur ces parasites.

4.3.2. Relation structure-activité

Certains auteurs ont observé que l'activité biologique des thiosemicarbazones était aussi liée à leur capacité à former des complexes stables avec des cations de métaux de transition tels que le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre ou le zinc (Chaston *et al.* 2003, Opletalová *et al.* 2008). La tendance de ces métaux à se complexer selon ces auteurs est plus forte avec le soufre mais faible avec l'oxygène. Ceci semble également expliquer la forte activité des thiosemicarbazones par rapport aux semicarbazones (Chandra *et al.* 2008, Fatondji *et al.* 2011).

Par ailleurs, on remarque une diminution de l'activité antitrypanosomienne lorsqu'on passe des dérivés thiosemicarbazones du citral (série A) à ceux de la pipéritone puis du citronellal (série C). La même corrélation est observée pour les HE correspondantes. La substitution d'un hydrogène par un groupe méthyle diminue l'activité. La présence et l'augmentation de l'effet mésomère dans la molécule accroît plutôt l'activité trypanocide (fig. 33).

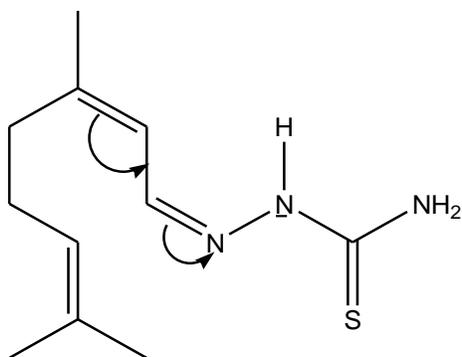


Figure 33: Mésonérie impliquant la chaîne carbonée du composé carbonylé

Ceci est particulièrement frappant quand on remplace un hydrogène du groupe $-NH_2$ par un noyau aromatique (fig. 34).

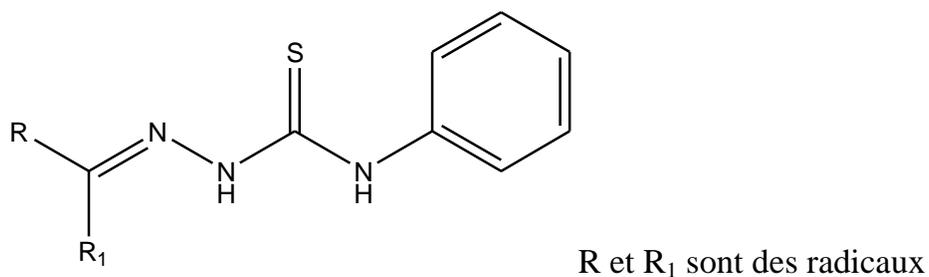


Figure 34: N-phényl thiosemicarbazone

La réduction de la double $C=C$ diminue aussi l'activité (Fatondji *et al.* 2011, Fudji *et al.* 2002). Il en va ainsi lorsqu'on passe du citral au citronellal (fig. 35).

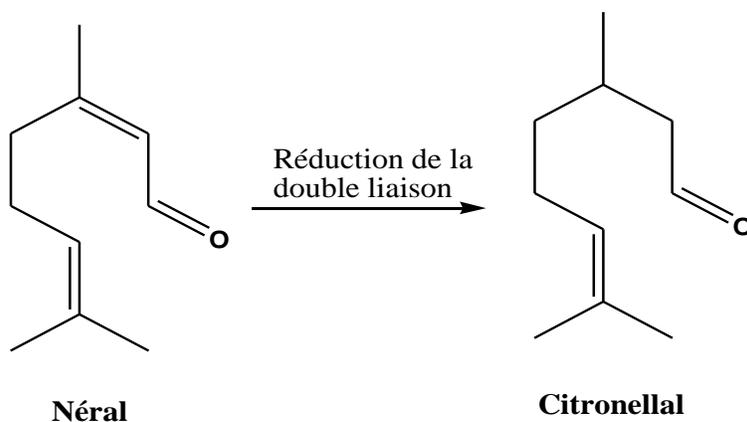


Figure 35: Réduction de double liaison

Retenons dans cette partie qu'à partir d'un mélange de composés, nous sommes parvenus à hémi-synthétiser de composés purs doués d'excellentes activités antitrypanosomiennes.

Toutefois, la mise au point d'activité *in vitro* d'une molécule n'est qu'une première étape d'une étude d'un médicament candidat efficace. Pour être utile, un médicament doit non seulement provoquer l'effet désiré sur son récepteur cible isolé, mais il doit être biodisponible aux sites d'activité. Nous avons utilisé les règles d'analyse de Lipinski pour apprécier théoriquement les capacités pharmacologiques des molécules hémi-synthétisées.

4.3.3. « Règle des cinq » de Lipinski

La façon dont un médicament interagit avec les différentes barrières dans l'organisme est la pharmacocinétique. Ainsi la biodisponibilité d'un médicament (la mesure dans laquelle il atteint son site d'action considéré d'habitude comme la circulation générale) dépend à la fois de la dose administrée et de sa pharmacocinétique (Lipinski *et al.* 1997).

La notion de pharmacocinétique fait intervenir celle de lipophilie, un facteur déterminant pour prédire l'ampleur de la perméabilité membranaire. La lipophilie est souvent en corrélation avec le coefficient de partage de la substance utilisée. Elle peut être étudiée par le logarithme (base 10) de son coefficient de partage (p) entre une phase lipidique et une phase aqueuse. La substance est d'autant plus lipophile que $\log P$ est positif (Ungell *et al.* 1998).

Les propriétés concernant la pharmacocinétique doivent donc être optimisées pour aboutir à une molécule d'intérêt médicinal. D'après les principes énoncés par Christopher Lipinski et regroupés sous le nom de « règle des cinq de Lipinski », une substance sera peu absorbée ou pénétrera difficilement si :

1. Sa masse moléculaire est supérieure à 500 g/mol

2. Elle possède plus de 5 donneurs de liaisons hydrogènes (somme des groupements OH et NH)
3. Elle possède plus de 10 accepteurs de liaisons hydrogène (atomes N et O)
4. Sa valeur de $ClogP$ est supérieure à 5 :

Le $logP$ est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants (coefficient de partage octanol/eau). C'est en fait le logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. $logP = \log (C_{oct}/C_{eau})$. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. La lettre C qui précède $logP$ signifie simplement qu'elle a été calculée.

Les médicaments candidats auxquels s'applique la proposition 1 seront vraisemblablement peu solubles et ne traverseront que difficilement les membranes cellulaires ; Ceux conformes aux règles 2 et/ou 3 seront sans doute trop polaires pour franchir les membranes cellulaires ; Et ceux qui répondent à la règle 4 seront peu solubles en solution aqueuse et donc incapables d'atteindre la surface des membranes (Lipinski *et al.* 1997).

Selon Christopher Lipinski, si une molécule de thiosemicarbazone respecte trois des quatre règles citées ci-dessus, elle peut être un bon candidat en pharmacologie. Les critères de Lipinski des molécules sont regroupés dans le tableau 15.

Tableau 15: « Règle des cinq » de Lipinski des composés

Critères	Masses molaires	<i>Clog P</i>	Nombre d'hydrogènes donneurs	Nombre d'hydrogènes accepteurs	Nombre de critères respectés
Composés	< 500	< 5	< 5	< 10	
1a	209	3,62	3	4	Tout
2a	225	3,36	3	3	Tout
3a	239	3,72	2	3	Tout
4a	239	4,28	2	4	Tout
5a	285	5,07	2	3	Trois
6a	301	5,45	2	3	Trois
1b	209	3,75	3	4	Tout
2b	225	4,18	3	3	Tout
3b	285	6,06	2	4	Trois
4b	301	5,47	2	3	Trois
1c	211	3,70	3	4	Tout
2c	227	3,44	3	3	Tout
3c	287	5,15	2	4	Trois
4c	303	6,27	2	3	Trois

Les composés hémi-synthétisés au cours de ce travail respectent au moins trois des critères de la « règle des cinq de Lipinski ». Ces molécules pourraient constituer de bons candidats médicaments. La forte activité trypanocide des N-phényles substitués serait liée à la diminution du nombre d'hydrogène donneur. Ce qui diminuerait la polarité de ces molécules et en conséquence, augmenterait leur lipophilie (Lipinski *et al.* 1997). Ainsi pour le même composé carbonylé, lorsque nous passons des thiosemicarbazones du citral (**2a**), de la pipéritone (**2b**) et du citronellal (**2c**) aux 4-phényl-3-thiosemicarbazones de ces mêmes molécules (**6a**, **4b**, **4c**), nous observons une augmentation de la lipophilie (*ClogP*), entraînant une augmentation de l'activité antitrypanosomienne (tableau 16).

Tableau 16: Lipophilie et activité antitrypanosomienne des thiosemicarbazones et 4-phényl-3-thiosemicarbazones

Composés	<i>ClogP</i>	IC ₅₀ (µM)
Citralthiosemicarbazone (2a)	3,36	7,61
Citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone (6a)	5,45	1,96
Pipéritonethiosemicarbazone (2b)	4,18	74,58
Pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone (4b)	5,47	8,63
Citronellal-thiosemicarbazone (2c)	3,44	440,33
Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone (4c)	6,27	19,63

Comme les HE ne sont pas de molécules pures, il serait difficile d'évaluer les critères de la « règle des cinq de Lipinski ». Théoriquement, on a une idée sur l'activité *in vitro* des HE sur les parasites, mais pas d'idée concrète par rapport à leur biodisponibilité.

4.3.4. Tests de toxicité sur les larves de crevette

Ce test nous renseigne non seulement sur la sélectivité des molécules sur les parasites, mais aussi sur cytotoxicité de ces molécules (Santos Pimenta *et al.* 2003).

Certains auteurs ont longtemps travaillé sur la toxicité larvaire des thiosemisemicarbazones et la molécule de référence utilisée est le lapachol. Son LC₅₀ est de 281 µM. Lorsque le test sur les larves de crevette donne une valeur LC₅₀ inférieure à 281 µM, la molécule est active sur les larves de crevette. Quand cette valeur est supérieure à 281 µM, la molécule est non active sur les larves (Santos Pimenta *et al.* 2003).

Les valeurs correspondantes à la toxicité des thiosemicarbazones sont mentionnées dans le tableau 17.

Tableau 17 : Activité sur les larves de crevettes

Composés	LC ₅₀ (µM)	activité
Citralsemicarbazone 1a	420,39± 1,5	Non actif
Citralthiosemicarbazone 2a	390,22	Non actif
Citral-2-méthyl-3-thiosemicarbazone 3a	“	“
Citral-4-méthyl-3-thiosemicarbazone 4a	275,36	Non actif
Citral-4-phényl-3-semicarbazone 5a	101,7 ± 2,44	Modérément actif
Citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone 6a	70,70 ± 1,79	actif
Pipéritonsemicarbazone 1b	373,20	Non actif
Pipéritonethiosemicarbazone 2b	86,66 ± 0,99	actif
Pipéritone-4-phényl-3-semicarbazone 3b	85,52 ± 2,35	actif
Pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone 4b	32,22 ± 0,79	actif
Citronellalsemicarbazone 1c	462,08	Non actif
Citronellalthiosemicarbazone 2c	121,14 ± 1,33	Modérément actif
Citronellal-4-phényl-3-semicarbazone 3c	45,05 ± 1,25	actif
Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone 4c	96,53 ± 2,33	actif

Parmi les composés de la série A, seuls les composés **5a** et **6a** présentent une activité sur les larves de crevettes. Les autres sont non actifs (tableau 17). En dehors du composé **1b**, les trois autres composés de la série B sont actifs sur les larves (tableau 17). La situation relevée au niveau des composés de la série B se retrouve chez les composés de la série C. Le composé **1c** est le seul non actif dans cette série (tableau 17).

Il est à remarquer en général que les semicarbazones de toutes les séries sont non actives sur les larves de crevettes. De toutes les molécules, les 4-phényles thiosemicarbazones sont les plus actives. Comme dans le cas des HE, les composés les plus actifs sur les larves de crevette apparaissent aussi plus actifs sur les parasites de trypanosomes. La relation lipophilie-activité précédemment décrite est également observée pour l'activité larvaire. La 4-phényl-3-thiosemicarbazone plus lipophile pour un composé carbonyle

donné, est également plus active sur les larves de crevettes que la thiosemicarbazone non substituée correspondante (tableau 18)

Tableau 18 : Lipophilie et activité larvaire des thiosemicarbazones et 4-phényl-3-thiosemicarbazones

Composés	<i>ClogP</i>	LC ₅₀ (µM)
Citralthiosemicarbazone (2a)	3,36	390,22
Citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone (6a)	5,45	70,70
Pipéritonethiosemicarbazone (2b)	4,18	86.66
Pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone (4b)	5,47	32.22
Citronellalthiosemicarbazone (2c)	3,44	121,14
Citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone (4c)	6,27	96,53

4.3.5. Toxicité larvaire et activité antitumorale

Ce test ouvre de bonnes perspectives en ce qui concerne l'éventuelle activité antitumorale des composés. Selon la littérature, il existe une bonne corrélation entre l'activité des composés sur les larves de crevettes et l'activité cytotoxique des composés sur les cellules 9PS et 9KB (carcinome nasopharyngien humain) (Pelka *et al.* 2000), les cellules A-549 du carcinome pulmonaire et les cellules HT-29 du carcinome du côlon (Carballo *et al.* 2002).

D'une part, Meyer *et al.* suggèrent que certaines substances liquides peuvent être actives sur des cellules cancéreuses lorsque leur CL₅₀ est inférieure à 30 µg/ml (Meyer *et al.* 1982). Aucune des HE étudiées n'auraient donc d'activité sur ces cellules puisque leur LC₅₀ est supérieur à 30 µg/mL.

D'autre part, Santos Pimenta *et al.* ont en 2003 prouvé qu'il existe une corrélation entre l'activité des thiosemicarbazones sur *Artemia salina* et l'activité cytotoxique des mêmes

molécules sur les cellules cancéreuses. Ils sont arrivés à la conclusion selon laquelle plus un composé est actif sur les larves de crevette, plus il serait efficace dans la lutte contre la prolifération de ces cellules tumorales. Leurs études sont faites par rapport à un composé de référence qui est le lapachol ($LC_{50} = 281 \mu\text{M}$). Tous les composés ayant donc leur LC_{50} nettement inférieure à cette valeur pourraient être dotés d'activité antitumorale (Santos Pimenta *et al.* 2003). Sous réserve des tests de cytotoxicité qu'on effectuera sur les cellules tumorales, on peut déjà retenir que les composés **6a**, **2b**, **3b**, **4b**, **3c**, **4c** peuvent avoir une activité cytotoxique.

Il serait insuffisant de parler d'activité antitrypanosomienne ou de toxicité larvaire sans associer ces deux notions à l'index de sélectivité qui sera calculé dans le paragraphe suivant.

4.3.6. Index de sélectivité (IS)

L'index de sélectivité (IS) est la valeur qui permet de mieux appréhender l'activité d'une substance sur un germe donné. Les index de sélectivité des thiosemicarbazones sont indiqués dans le tableau 19.

Tableau 19 : Index de sélectivité des semicarbazones et thiosemicarbazones

Composés	LC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	(IS = LC ₅₀ /IC ₅₀)
1a	420.39	234,64	1.79
2a	390.22	7,61	51.27
4a	275.36	172,84	1.59
5a	101,7	18,10	5,61
6a	70.70	1,96	36.07
HE (<i>C. citratus</i>)	78 µg/mL	6,80 µg/mL	11,47
1b	373.20	478,47	0.78
2b	86.66	74,58	1.16
3b	85.52	10,90	7,84
4b	32.22	8,63	3,73
HE (<i>C. schoenanthus</i>)	107 µg/mL	16,74 µg/mL	6,39
1c	462,08	473,93	0,97
2c	121,15	440,53	0,27
3c	45,05	57,26	0,79
4c	96,53	19,63	4,92
HE (<i>E. citriodora</i>)	106 µg/mL	17,96 µg/mL	5,90

Toutes les thiosemicarbazones issues de l'HE de *C. citratus* sont sélectives sur les parasites étudiés. Les sélectivités des composés **2a** (IS = 51,27) et **6a** (IS = 36,07) sont très prononcées et nettement plus fortes que celle de l'huile de départ (IS = 11,47). Dans la série de la pipéritone, les sélectivités des composés **2b**, **3b** et **4b** sont aussi remarquables mais moins significatives que dans les cas précédents. Parmi ces composés, **3b** (IS = 7,84) a une sélectivité plus forte que celle de l'huile de départ (IS = 6,39). Un seul composé provenant de l'huile essentielle d'*E. citriodora* s'est montré sélectif sur *Trypanosoma brucei brucei*. Il s'agit du composé **4c**. Mais l'huile demeure dans ce cas plus sélective que les composés. En dépit de l'activité modérée de certaines molécules, on

remarque toutefois que 10 composés sont quand même sélectifs sur les parasites de trypanosomes.

4.3.7. Conclusion

Parmi les molécules hémi-synthétisées, certaines se sont montrées beaucoup plus sélectives que les huiles de départ **2a**, **6a**, **3b**. Cette sélectivité chez les molécules **2a** et **6a** est très impressionnante. Ces deux molécules sont très prometteuses dans la lutte contre les maladies parasitaires les plus redoutables du genre *Trypanosoma* spécifiques à l'Afrique. A partir de ces huiles, nous avons pu obtenir des composés purs plus actifs et plus sélectifs que les substrats de départ. L'hypothèse selon laquelle certaines semicarbazones et thiocarbazones provenant de ces huiles seraient douées d'activité est bien vérifiée. Certains composés peuvent également être candidats dans la lutte anticancéreuse (**6a**, **2b**, **3b**, **4b**, **3c**, **4c**). Dans le but d'avoir une idée sur l'agressivité des composés les plus sélectifs, il serait donc très utile de poursuivre ce travail sur les études toxicologiques de ces molécules. Dans le même cadre, l'HE la plus sélective sera également étudiée.

4.4. Etudes toxicologiques

4.4.1 . Toxicité aiguë (Doses létales)

Les molécules **2a** et **6a** ont particulièrement retenu notre attention à cause de leur forte sélectivité sur les parasites de trypanosomes. Afin de garantir l'innocuité de ces composés destinés à l'homme, nous avons commencé par évaluer leur toxicité aiguë sur des animaux de laboratoire (rats de type « Wistar »). Ces études toxicologiques ont été aussi faites sur l'HE la plus sélective (*C. citratus*). Toutes les substances ont été administrées aux rats par voie orale selon le protocole décrit plus haut (CCPA. 1993, OCDE. 2000, Jennison *et al.* 2000).

4.4.1.1 . Citralthiosemicarbazone (2a)

De façon globale, les rats de ce lot ont connu une légère diminution de poids les six premiers jours après administration des différentes doses de composé. Ceux ayant reçu une faible dose de ce composé ne manifestent pas des signes particuliers. Des cas de décès ont été enregistrés à partir d'une dose de 250 mg/kg dès le lendemain de l'expérience.

La dose létale de ce composé a été déterminée à partir de la courbe traduisant le pourcentage de décès par rapport à la dose reçue (fig. 36).

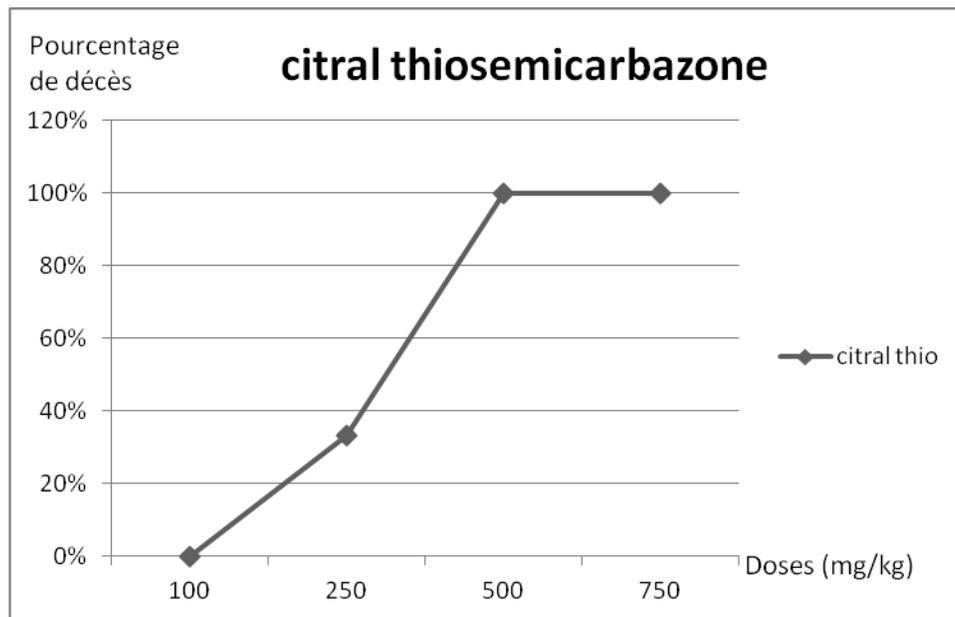


Figure 36 : pourcentage de décès par rapport à la dose du citral thiosemicarbazone

La valeur de la dose létale est de 315 mg/kg. La Dose Minimale Mortelle (DMM) de ce composé a été également déterminée. C'est en effet la dose qui tue un animal du lot traité après la consommation du produit. Sa valeur est de 250 mg/kg. La dose de 100 mg/kg n'a pas d'effet significatif chez les rats durant les 14 jours d'expérience. Elle constitue donc la dose sans effet toxique observable (Ahmed *et al.* 2010). Selon l'échelle de toxicité, ce produit en tant que composé pur est moyennement toxique (OCDE. 2000, Jennison *et al.*

2000). Il peut donc être utilisé à faible dose contre les affections parasitaires compte tenu de son activité trypanocide très importante.

4.4.1.2 . Citral-4-Phényl-3-thiosemicarbazone

Il n'y a pas eu de remarque particulière chez les rats de ce lot. Une légère diminution du poids le lendemain de l'expérience est observée chez les rats ayant reçu la dose de 2000 mg/kg (tableau 20).

Tableau 20 : Evolution des poids moyens des animaux après administration de différentes doses du citral 4-Phényl thiosemicarbazone 6a

Poids moyens (g)									
Lot	Dose (mg/kg)	J0	J1	J3	J5	J7	J9	J11	J14
6a	250	175 ± 11	166 ± 9	174 ± 8	182 ± 10	189 ± 8	194 ± 6	192 ± 8	198 ± 9
	500	145 ± 8	144 ± 11	142 ± 9	148 ± 9	156 ± 10	162 ± 10	165 ± 5	171 ± 4
	750	142 ± 5	131 ± 4	138 ± 7	145 ± 8	152 ± 7	157 ± 7	164 ± 8	170 ± 9
	1000	135 ± 9	129 ± 6	132 ± 4	138 ± 7	147 ± 6	152 ± 4	155 ± 2	164 ± 2
	2000	124 ± 10	96 ± 11	101 ± 10	107 ± 9	115 ± 8	123 ± 8	129 ± 4	137 ± 1

Un gain de poids dès le surlendemain de l'expérience est aussi observé chez les rats ayant reçu des doses < 2000 mg/kg. La dose létale de ce composé est supérieure à 2000 mg/kg. Selon l'échelle de toxicité, ce composé est très peu toxique (OCDE. 2000, Jennison *et al.* 2000). Cette absence de toxicité est très encourageante et prometteuse en ce qui concerne la recherche de composé non onéreux dans le domaine pharmaceutique.

Contrairement aux rats ayant consommé l'HE de *C. citratus*, après dissection des animaux ayant reçu diverses doses de ces molécules, aucune lésion ne se remarque sur leurs parois intestinales. Ce résultat est très encourageant puisqu'on est à la recherche de molécules non agressives.

De façon prévisible, aucun signe particulier ne s'observe chez les rats témoins ayant reçu l'huile de maïs.

4.4.2 . Toxicité aiguë (Tests biochimiques)

Les tests sur les paramètres biochimiques permettent de déterminer les effets des substances administrées sur les fonctions hépatiques et rénales. Une élévation du taux des enzymes liées à ces fonctions après administration des substances, peut survenir lorsque le foie ou le rein subit des dommages. Les paramètres biochimiques dosés au cours de ce travail sont : l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT), la phosphatase alcaline (PAL), la bilirubine, la créatinine, les protéines totales. La dose létale de chaque substance a été administrée à un lot de cinq rats selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.4.2.3.

4.4.2.1. Alanine aminotransférase (ALAT)

L'ALAT, est une enzyme produite par les cellules du foie (hépatocytes). Le taux d'ALAT contenu dans le sang augmente lorsque les hépatocytes sont endommagés ou détruits à un rythme plus élevé qu'à la normale (Wejstal *et al.* 1988). Les drogues, l'alcool, les toxines, les virus et d'autres substances causent des dommages aux cellules hépatiques qui peuvent contribuer à l'élévation des taux d'ALAT. La mort des cellules du foie cause également une augmentation des taux d'ALAT. Les niveaux d'ALAT sont souvent utilisés pour évaluer le degré d'inflammation et de dommage au foie à n'importe quel moment dans la progression de la maladie (Wejstal *et al.* 1988). Ce ne serait donc pas intéressant qu'un produit utilisé lors du traitement d'une maladie provoque son augmentation de façon démesurée. Dans notre cas, aucune augmentation significative du taux de cette enzyme n'est notée chez les rats aux quels on a administré les produits de synthèse issus de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* (fig. 37).

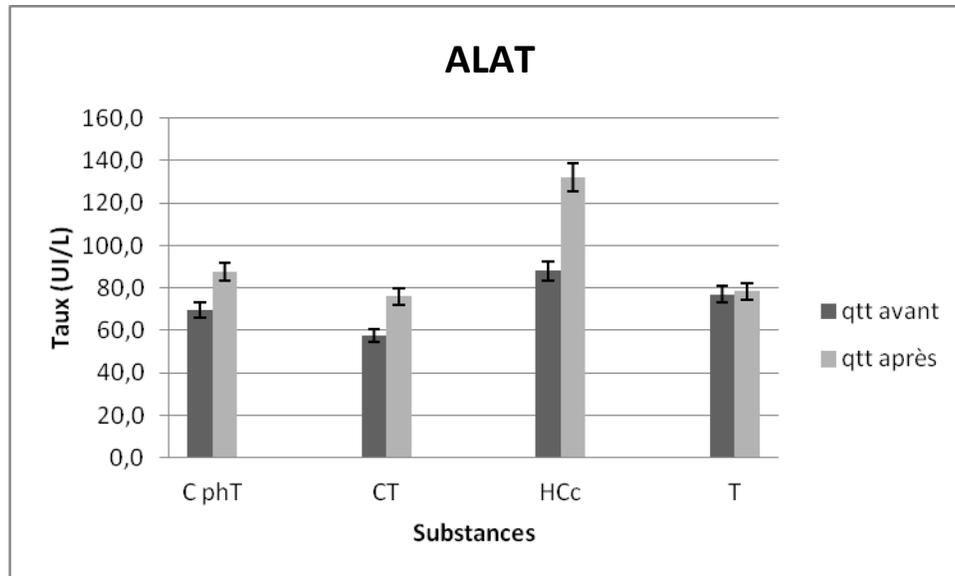


Figure 37 : Taux d'ALAT avant et après administration des composés

CphT = Citral-4-Phényl-3-thiosemicarbazone

CT = Citralthiosemicarbazone

HCc = huile essentielle de *C. citratus*

T = Témoin

La seule augmentation significative ($P < 0,05$) est notée chez les rats ayant consommé l'huile essentielle. De façon prévisible ce taux est demeuré invariant chez les rats témoins ayant consommé l'huile de maïs.

4.4.2.2. Aspartate aminotransférase (ASAT)

L'aspartate aminotransférase (ASAT), est une enzyme similaire à l'ALAT mais qui n'est pas présente de façon spécifique dans le foie. Cette enzyme est aussi présente dans d'autres organes comme le muscle et le cœur. Dans bien des cas d'inflammation du foie, les niveaux d'ALAT et d'ASAT sont élevés (Piton *et al.* 1998). Les observations précédentes sont pratiquement les mêmes par rapport à la variation du taux d'ASAT dans le sérum sanguin (fig. 38).

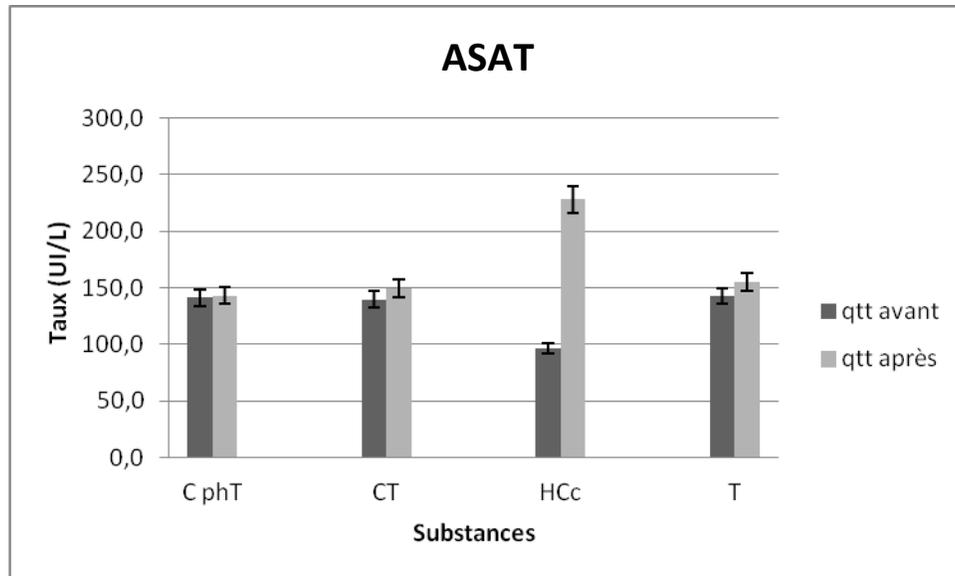


Figure 38: Taux d'AST avant et après administration des composés

La variation demeure très significative ($P < 0,05$) chez les rats ayant consommé l'huile essentielle. Cette variation est négligeable dans les autres cas.

4.4.2.3. Phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline est une enzyme produite dans les voies biliaires et les os, et elle se retrouve dans le foie. Son niveau augmente en présence d'une hépatite, d'une cirrhose et d'autres maladies. Certains médicaments peuvent également faire augmenter son niveau.

Dans ce travail, on remarque une augmentation significative des taux de PAL chez les animaux ayant consommé le citral 4-phényl-3-thiosemicarbazone. L'augmentation est modérée chez les rats ayant consommé le citral thiosemicarbazone et l'huile essentielle. Il n'y a pas de différence significative de ce taux chez les rats témoins (fig. 39).

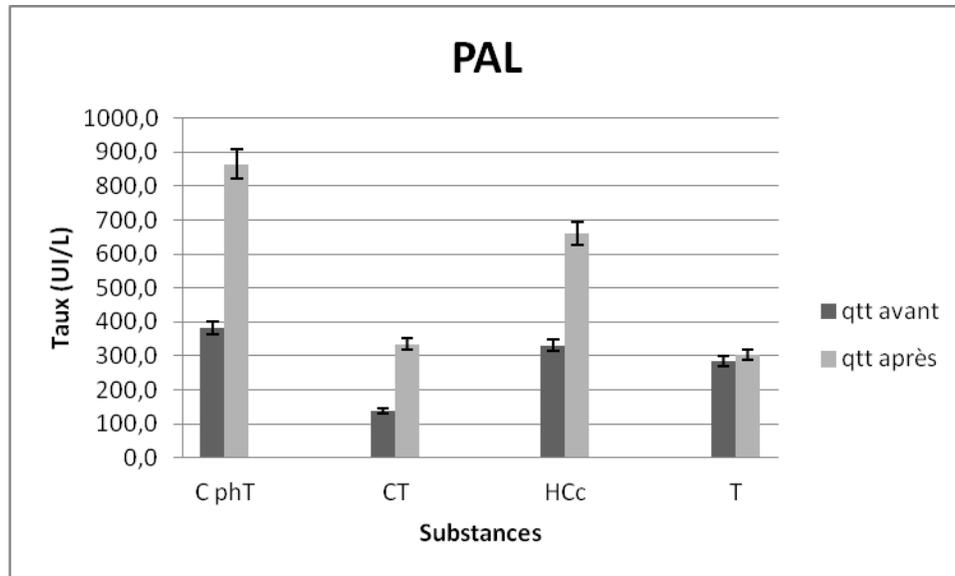


Figure 39 : Taux de PAL avant et après administration des composés

Cette augmentation n'est pas très inquiétante dans la mesure où certains médicaments induisent le même effet (Teeter *et al.* 2004). Il faut aussi expliquer que la dose administrée à ces rats est très forte (2000 mg/kg).

4.4.2.4. Bilirubine

La bilirubine est le principal produit résultant de la dégradation des vieux globules rouges. Les globules rouges libèrent de l'hémoglobine, la portion « hème » est par la suite décomposée en bilirubine. Lorsque la fonction hépatique est endommagée, comme dans le cas d'une hépatite aiguë ou de la phase finale d'une maladie du foie, la bilirubine s'accumule dans le sang et entraîne le jaunissement de la peau et des yeux. Aucune différence significative n'est notée 24 h après l'administration des produits. Les variations sont toutes modérées (fig. 40).

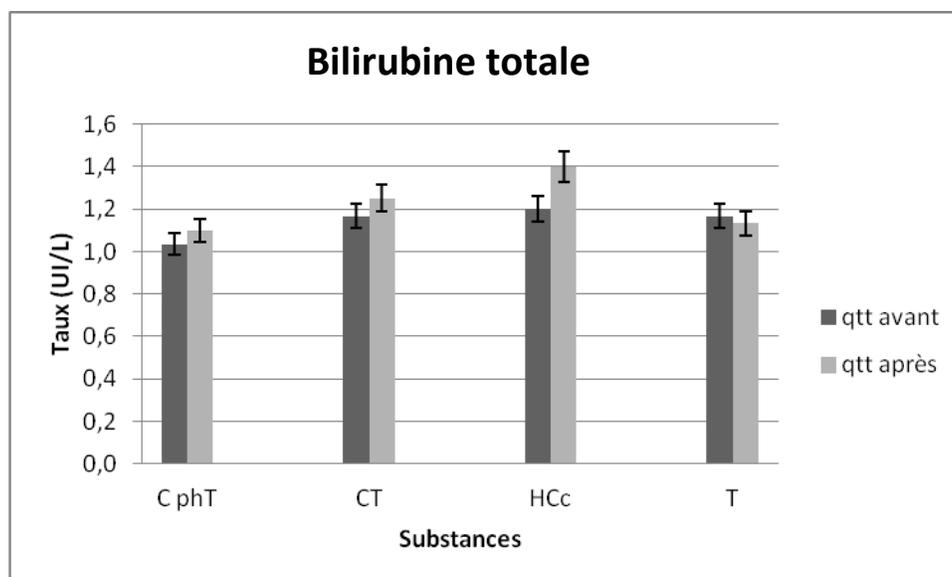


Figure 40 : Taux de bilirubine avant et après administration des composés

4.4.2.5. Créatinine

Les fonctions rénales sont mesurées par des tests de laboratoires qui comprennent l'azote uréique du sang, la créatine et l'acide urique. Dans ce travail, c'est le taux de créatinine seul qui sera dosé. La teneur du sang en créatine est la mesure la plus répandue de la fonction rénale. Après administration des produits, Les reins jouent un rôle essentiel dans l'élimination des déchets organiques et dans la régularisation de la pression artérielle. Tout déséquilibre dans le fonctionnement rénal peut mettre la vie en danger (Sirwal *et al.* 2004). L'huile essentielle n'a pas d'effet significatif sur le taux de créatinine dans le sérum sanguin. Le citral thiosemicarbazone et le citral 4-phényl-3-thiosemicarbazone ont par contre provoqué une légère augmentation (pas significative) du taux de cette enzyme (fig. 41). Rappelons toujours que c'est la dose de 2000 mg/kg qui est utilisée dans le cas du composé **6a**.

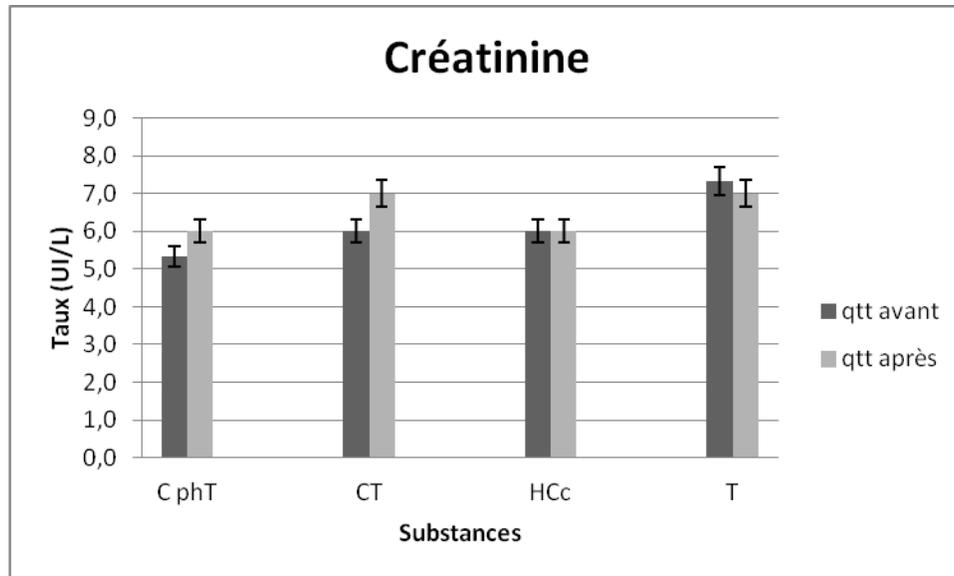


Figure 41 : Taux de créatinine avant et après administration des composés

4.4.2.6. Protéines totales

Une légère diminution du taux de protéines totales survient chez les rats ayant consommé les substances. Mais on remarque une élévation de ce taux chez les rats témoins. On peut lier cette augmentation à l'absence de perturbation des différents organes (fig. 42).

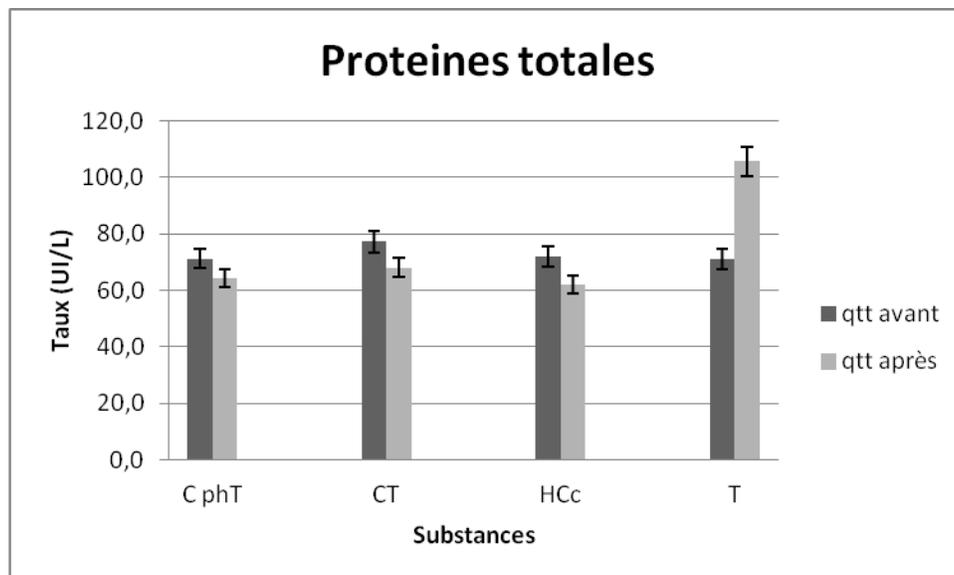


Figure 42 : Taux de protéine avant et après administration des composés

Les taux d'ASAT, d'ALAT et de PAL sont significativement élevés ($P > 0.05$) chez les rats ayant reçu une dose de 4.25 mL/kg d'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*. Le taux de créatinine malgré la dose élevée d'huile est resté invariant. A l'inverse, la variation du taux de créatinine est un peu plus importante avec les composés purs. Nous retenons qu'à forte dose, ces composés pourraient affecter le fonctionnement des reins. Mais chez l'huile essentielle c'est plutôt les fonctions hépatiques qui risquent d'être affectées à forte dose.

4.4.3 . Conclusion

A l'issue de ce travail, il apparaît clairement que toute substance qu'elle soit naturelle ou synthétique peut devenir dangereuse au delà d'une dose donnée. C'est le cas de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* et des composés thiosemicarbazones qui en découlent. On remarque toutefois que l'utilisation d'une très forte dose d'huile essentielle pourrait affecter le fonctionnement du foie. Mais elle n'a pas d'effet significatif sur le fonctionnement des reins. Contrairement à cet effet de l'huile, le composé 2a utilisé à forte dose pourrait affecter le fonctionnement rénal. Le fonctionnement du foie n'est pratiquement pas affecté. Les composés 2a et 6a n'induisent aucune lésion intestinale chez les rats.



Conclusion générale et perspectives

C. citratus, *C. schoenanthus* et *E. citriodora* sont des plantes couramment utilisées en Afrique pour le bien-être des populations. Ces plantes contiennent des HE riches en composés carbonylés. L'analyse chimique de ces HE montre 72,91% de citral (aldéhyde) pour l'HE de *C. citratus*, 68,20% de pipéritone (cétone) pour *C. schoenanthus* et 67,50% de citronellal (aldéhydes) pour l'HE de *E. citriodora*.

Le test antitrypanosomien des HE réalisé sur *Trypanosoma brucei brucei* a révélé l'activité trypanocide de l'HE de *C. citratus* ($IC_{50} = 6,80 \mu\text{g/mL}$). Les activités antitrypanosomiennes des HE de *C. schoenanthus* ($IC_{50} = 16,74 \mu\text{g/mL}$) et d'*E. citriodora* ($IC_{50} = 17,96 \mu\text{g/mL}$) sont plutôt modérées. A partir des tests de toxicité larvaire, on n'a pu constater la bonne sélectivité de l'HE de *C. citratus* ($IS = 11,47$).

Les composés carbonylés contenus dans ces huiles ont été utilisés *in situ* dans l'hémi-synthèse de 14 molécules de semicarbazones et thiosemicarbazones qui ont été caractérisées par diverses analyses spectrométriques IR, SM, RMN ^1H et ^{13}C . A notre connaissance, un tel travail n'avait encore été jamais entrepris et plusieurs composés obtenus n'ont jamais été décrits dans la littérature.

Quatre composés à savoir la citralthiosemicarbazone **2a** ($IC_{50} = 7,61 \mu\text{M}$), la citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone **6a** ($IC_{50} = 1,96 \mu\text{M}$), la pipéritone-4-phényl-3-semicarbazone **3b** ($IC_{50} = 10,90 \mu\text{M}$) et la pipéritone-4-phényl-3-thiosemicarbazone **4b** ($IC_{50} = 8,63 \mu\text{M}$) ont montré des activités trypanocides impressionnantes. Cinq de ces composés ont plutôt révélé des activités modérées. Il s'agit de la citral-2-méthyl-3-thiosemicarbazone **3a** ($IC_{50} = 60,87 \mu\text{M}$), de la citral-4-phényl-3-semicarbazone **5a** ($IC_{50} = 18,10 \mu\text{M}$), de la pipéritonethiosemicarbazone **2b** ($IC_{50} = 74,58 \mu\text{M}$), de la citronellal-4-phényl-3-semicarbazone **3c** ($IC_{50} = 57,26 \mu\text{M}$) et de la citronellal-4-phényl-3-thiosemicarbazone **4c** ($IC_{50} = 19,63 \mu\text{M}$). La citralsemicarbazone **1a** ($IC_{50} = 234 \mu\text{M}$), la citral-4-méthyl-3-thiosemicarbazone **4a** ($IC_{50} = 172,84 \mu\text{M}$), la pipéritonesemicarbazone **1b** ($IC_{50} = 478,47 \mu\text{M}$), la citronellalsemicarbazone **1c** ($IC_{50} = 473,93 \mu\text{M}$) et la

citronellalthiosemicarbazone **2c** ($IC_{50} = 440,53\mu M$) n'ont pratiquement pas d'effet sur ces parasites.

Parmi les semicarbazones et thiosemicarbazones issues de l'HE de *C. citratus*, les sélectivités des composés **2a** (IS = 51,27) et **6a** (IS = 36,07) sont les plus prononcées et sont nettement plus fortes que celle de l'huile de départ (IS = 11,47). Dans la série de la pipéritone, le composé **3b** (IS = 7,84) est le plus sélectif. Cette sélectivité est plus forte que celle de l'huile dont il dérive (IS = 6,39). Un seul composé provenant de l'huile essentielle d'*E. citriodora* s'est montré sélectif sur *Trypanosoma brucei brucei* (molécule **4c**).

Des études toxicologiques réalisées sur les substances les plus sélectives, il ressort que la citral-4-phényl-3-thiosemicarbazone **6a** est très peu toxique. La citralthiosemicarbazone **2a** et l'HE de *C. citratus* sont moyennement toxiques. Mais cette huile à partir d'une dose de 2 mL/kg cause des lésions sur les parois de l'intestin des rats utilisés. Ces lésions sont absentes chez les rats qui ont consommé diverses doses des composés **2a** et **6a**. Autrement dit, ces composés sont tolérés par les parois intestinales. L'étude des paramètres biochimiques révèle que les doses létales des substances n'ont pas d'effet significatif sur le foie et les reins. Mais une très forte dose du composé **2a** pourrait affecter le fonctionnement rénal. C'est le cas contraire chez l'huile qui, à une dose très élevée affecterait les fonctions hépatiques.

D'après la corrélation qui existe entre la toxicité larvaire des composés et leur activité cytotoxique sur des cellules tumorales, certains composés pourraient être aussi candidats dans la lutte anticancéreuse.

A partir donc des HE souvent instables et d'usage interne agressif, peuvent être réalisés des composés hémi-synthétiques purs de petites tailles, non agressifs et pourvus d'excellentes activités biologiques. Ce travail apporte à partir de nos ressources endogènes un plus dans le domaine de la chimie pharmaceutique moderne. La démarche adoptée au cours de ce travail nous a non seulement permis de valoriser un nouvel axe de

recherche dans le domaine des huiles essentielles, mais elle nous a également conduit vers l'obtention de nouvelles molécules.

Au vu des résultats obtenus, Il serait donc très intéressant de:

- réaliser les complexes métalliques des composés actifs afin de les rendre hydrosolubles pour d'autres études biologiques.
- Déterminer les propriétés pharmacologiques des composés majoritaires purs de chacune des HE.
- réaliser les tests de cytotoxicité sur des cellules tumorales pour confirmer l'activité anticancéreuse des molécules candidates.
- poursuivre les études toxicologiques sur les substances les plus sélectives en déterminant leurs toxicités subaiguë et chronique.
- déterminer les doses efficaces des substances les plus sélectives à partir des études *in vivo*.

VI

Références bibliographiques

- 1) **Abbott WS** (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*18:265.
- 2) **Abd El-Mageed AA, Osman AK, Tawfik AQ, Mohammed HA** (2011). Chemical Composition of the Essential Oils of four *Eucalyptus* Species (Myrtaceae) from Egypt. *Research Journal of Phytochemistry.* 5(2): 115-122.
- 3) **Abe S, Sato Y, Inouye S** (2003). Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Jap. J. Med. Mycol.* 44: 285-91.
- 4) **Academie des sciences** (2006). Sciences et pays en développement. *Sous la direction de Francois Gros. EDP Sciences, Paris, RST No 21.*
- 5) **Adams RP** (2001) Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. *Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation.*
- 6) **Adebayo CO, Aderiye BL** (2010). Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. *Research Journal of Microbiology.* 5: 1070-1082.
- 7) **Adio AM, König WA** (2005). Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenioides*. *Phytochem.* 66: 599-609.
- 8) **AFNOR.** L'agence Française de Normalisation, Recueil des normes françaises, Huiles essentielles. 3^{ème} édition. Paris : AFNOR, 1989.
- 9) **Afrasiabi Z, Sinn E** (2004). Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1 ; Synthésis, Structural, Spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. *Inorg. Chem. Acta.* 357: 271.
- 10) **Aggarwal N, Aggarwal R, Mishra P, Jain JS, Bansal SK, Jha KK** (2008). Design and Evaluation of Semicarbazones and Thiosemicarbazones as Novel Anticonvulsants. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents).* 8(1): 26-28.
- 11) **Ahmed FZB, Merzouk H, Bouanane S, Benkalfat NB, Merzouk SA, Mulengi JK, Narce M** (2010). Évaluation de la toxicité aiguë de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat Wistar. *Ann. Toxicol. Anal.* 22(3): 115-121.
- 12) **Al-Ghamdi SS, Al-Ghamdi AA, Shammah AA** (2007). Inhibition of Calcium Oxalate Nephrotoxicity with *Cymbopogon Schoenanthus* (Al-Ethkher). *Drug Metabolism Letters.* 1: 241-244.
- 13) **Allinger NL, Carva M, Johnson C, De Jongh D, Lebel N, Stevens C** (1985). Chimie organique édition Mcgraw-Hill. Volume 1 page 504.
- 14) **AL-Magboul AZ, Farouk A, Bashir AK, Salih AM** (1985). Antibacterial activity of Sudanese plants used in folkloric medicine (III). *Fitoterapia.* 56: 195-200.
- 15) **Alzate O, Djego A, Mier M, Gonzalo I, Afanador K, Durango R, Diego L, Garcia P, Carlos M** (2009). Evaluation of phytotoxicity and antifungal activity against *collectotrichum acutatum* of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*, lemongrass (*cymbopogon citratus*), and their main

- constituents. *Vitae*. 16(1): 116-125.
- 16) **Askonas BA, Bancroft GJ** (1984). Interaction of African trypanosomes with the immune system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 307: 41-50.
 - 17) **Atouguia J, Costa J** (1999). Therapy of human African trypanosomiasis: current situation. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 94: 221-224.
 - 18) **Atta AH, Alkofahi A** (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *J. Ethnopharmacol.* 60(2): 117-124.
 - 19) **Atyat A** (1995). Production and Processing of Medical and Aromatic Plants in the Arab world. Sakhiat Al-Jaziaar, Karloun Spire Building P.O.Box 11-5460, Beirut, Lebanese Republic, Arab Institution for Studies and Publishing.
 - 20) **Ayédoun MA** (1995). *Contribution à la connaissance chimique des Huiles Essentielles de plantes aromatiques du Bénin en vue de leur valorisation*. Thèse de doctorat, Université Nationale du Bénin.
 - 21) **Baba-Aissa F** (2000). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.
 - 22) **Balasegaram M, Harris S, Checchi F, Ghorashian S, Hamel C, Karunakarab U** (2006). Melarsoprol versus eflornithine for treating late-stage Gambian trypanosomiasis in the Republic of the Congo. *Bulletin of the World Health Organization.* 84: 783-791.
 - 23) **Bansod S, Rai M** (2008). Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences.* 3 (2): 81-88.
 - 24) **Barbosa LCA., Pereira UA, Martinazzo AP, Maltha CRA, Teixeira RR, de Castro Melo E** (2008). Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. *Molecules.* 13: 1864-1874.
 - 25) **Bardeau F** (1976). La médecine par les fleurs. *Laffont éd.* 100-120.
 - 26) **Barr A, Chapman J, Smith N, Beveridge M** (1988). Traditional Bush Medicines, An Aboriginal Pharmacopoeia. *Greenhouse Publications.* 167: 116-117.
 - 27) **Barros LA, Yamanaka AR, Silva LE, Vanzeler MLA, Braum DT, Bonaldo J** (2009). *In vitro* larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecaecum* sp (Nematoda: Anisakidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (10): 918-920.
 - 28) **Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore Z, Traore SA** (2001). Composition chimique et activités antibactériennes des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *cymbopogon proximus* (stapf.) et *d'ocimum canum* (sims). *Pharm. Méd. Trad. AF.* 11: 37-51.
 - 29) **Batish DR, Singh HP, Setia N, Kaur S, Kohli RK** (2006). Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Z.*

- Naturforsch C.* 61(7-8): 465-71.
- 30) **Baudoux D** (2001). *L'aromathérapie - Se soigner par les huiles essentielles*, Atlantica.
 - 31) **Bavin EM, Rees RJW, Robson JM, Seiler M, Seymour DE, Suddaby D** (1950). The tuberculostatic activity of some thiosemicarbazones. *J. Pharm. Pharmacol.* 2: 764-72.
 - 32) **Bedi GS, Tonzibo ZF, Boti B, Chopard C, Mahy JP, N'guessan YT** (2003). Anti-inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of *ocimum gratissimum*, *eucalyptus citriodora* and *cymbopogon giganteus* inhibited lipoxygenase I-1 and cyclooxygenase of pghs. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 17(2): 191-197.
 - 33) **Belaiche P** (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. tome I, Ed. Maloine SA, p.136.
 - 34) **Ben-Arye E, Dudai N, Eini A, Torem M, Schiff E, Rakover Y** (2011). Treatment of Upper Respiratory Tract Infections in Primary Care: A Randomized Study Using Aromatic Herbs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Med.* 2011: 690346.
 - 35) **Bernadet M** (2000). *Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*, Editions Dangles.
 - 36) **Biot C, Pradines B, Sergeant M, Gut J, Rosenthal PJ, Chibale K** (2007). Design, synthesis, and antimalarial activity of structural chimeras of thiosemicarbazone and ferroquine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6434.
 - 37) **Blanco MM, Costa CARA, Freire AO, Santos JGG, Costa M** (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine.* 16: 265–270.
 - 38) **Boelaert M, Meheus F, Robays J, Lutumba P** (2010). Socio-economic aspects of neglected diseases: sleeping sickness and visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 104 (7): 535-542.
 - 39) **Boochird C Flegel MW** (1982). *In vitro* antifungal activity of Eugenol and Vanillin against *candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Can.J. Microbiol.* 28: 1235-1241.
 - 40) **Borzelleca JF** (2000). Paracelsus: Herald of Modern Toxicology. *Toxicol. Sci.* 53(1): 2-4.
 - 41) **Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhssine M, Chaouch A, Satrani B** (2009). Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions.* 20(1) : 44-48.
 - 42) **Bremness L** (1998). *Les plantes aromatiques et Médicinales*. Bordas Editions.
 - 43) **Brian ML** (1995). The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA). p.57-148.
 - 44) **Brockman RW, Sidwell RW, Arnett G, Shaddix S** (1970). Heterocyclic thiosemicarbazones: correlation between structure, inhibition of ribonucleotide reductase, and inhibition of DNA viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133: 609-14.

- 45) **Brockman RW, Thomson JR, Bell MJ, Skipper HE** (1956). Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer Res.* 16: 167-70.
- 46) **Bronner U, Doua F, Ericsson O, Gustafsson LL, Miézan TW, Rais M, Rombo L** (1991). Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in Cote d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 608-611.
- 47) **Bruneton J** ((1999). Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 2^{ième} éd. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France.
- 48) **Burri C, Nkunku S, Merolle A, Smith T, Blum J, Brun R** (2000). Efficacy of a new, concise schedule for melarsoprol in treatment of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a randomised trial *Lancet.* 355: 1419-1425.
- 49) **Burri C, Brun R** (2003). Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol. Res.* 90 (1): 49-52.
- 50) **Caffrey CR, Hansell E, Lucas KD, Brinen LS, Alvarez HA, Cheng J, Gwaltney SL, Roush WR, Stierhof YD, Bogyo M, Steverding D, McKerrow JH** (2001). Active site mapping, biochemical properties et subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Mol. Biochem. Parasitol.* 118: 61-73.
- 51) **Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos DCA** (2002). Comparison between two brine shrimp assays to detect invitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2(17): 2-17.
- 52) **Carey F, Sundberg R** (2007). Advanced organic chemistry. 5^{ème} édition part A: structure page 651.
- 53) **Cassella S, Cassella J, Smith I** (2002). Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophytes infection. *Int. J. Aromatherapy.* 12(1): 2-15.
- 54) **Cattand P** (2001). L'épidémiologie de la trypanosomiase humaine africaine : une histoire multifactorielle complexe. *Med. Trop.* 61: 313-322.
- 55) **Cavalcanti ESB, de Morais SM, Lima MAA, Santana EWP** (2004). Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(5): 541-544.
- 56) **CCPA** (1993). Conseil Canadien de Protection des Animaux, Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. *Ottawa.* 1: 232-256.
- 57) **Chadwick DJ, Marsh J** (Eds). (1990). Bioactive compounds from plants. CIBA foundation symposium 154. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- 58) **Chandra S, Tyagi M** (2008). Spectroscopic and biochemical studies of chromium(III) and manganese(II) complexes with p-vanillin containing thiosemicarbazone and semicarbazone ligands. *Journal of the Indian Chemical Society.* 85(1): 42-47.

- 59) **Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, Richardson DR** (2003). Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin. Cancer Res.* 9: 402–414.
- 60) **Cheel J, Theoduloz C, Rodriguez J, Schmeda-Hirshmann G** (2005). Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *J. Agric. Food Chem.* 53: 2511-2517.
- 61) **Cheel J, Theoduloz C, Rodriguez J, Shemeda-Hirshmann G** (2005). Free radical scavengers and antioxidant from lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 2511- 2517.
- 62) **Chen J, Huang Y, Liu G** (2004). The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197: 40-8.
- 63) **Choudharya A, Sharma R, Nagar M** (2011). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of mixed ligand complexes of Co (II) and Cu (II) with N, O/S donor ligands and amino acids. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1(6): 172-187.
- 64) **Clayden, Greeves, Wren, Wothers** ; *Chimie organique*, de Boeck 1ère édition, (2003) Page 349.
- 65) **Clevenger JF** (1928). *J. Ann. Pharm. Assoc.* 17(4): 346.
- 66) **Conseil de l'Europe**, Pharmacopée Européenne 1, Maisonneuve S.A. Editions, Sainte Ruffine, 1996.
- 67) **Couderc VL** (2001). Toxicité des huiles essentielles, Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.
- 68) **Cowan MM** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 564-582.
- 69) **Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG** (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88(1): 170-175.
- 70) **Cuéllar Cuéllar A, Hussein Yunus R** (2009). Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* IN MBARARA DISTRICT (Uganda). *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 1(2): 240-249.
- 71) **Dahouenon-Ahoussi E, Degnon RG, Adjou ES, Sohounhloué DCK** (2012). Stabilisation de la bière produite à partir de matières amylacées locales (*Sorghum bicolor* et *Musa acuminata*) par adjonction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*. *Journal of Applied Biosciences.* 51: 3596 – 3607.
- 72) **Dawson FA** (1994). The amazing terpenes. *Naval Stores Review* 6-12.
- 73) **De Koning HP** (2001). Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance.

Int. J. Parasitol. 31: 512-522.

- 74) **Dehdashti F, Grigsby PW, Lewis JS, Laforest R, Siegel BA, Welch MJ** (2008). Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by PET with ⁶⁰Cu-labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). *J. Nucl. Med.* 49: 201-5.
- 75) **de Lima JPS, Pinheiro MLB, Santos AMG, Pereira JLS, Santos DMF, Barison A, Silva-Jardim I, Costa EV** (2012). *In Vitro* Atilishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae), *Rev. Virtual Quim.* 4 (6): 692-702.
- 76) **Derwich E, Manar A, Benziane Z, Boukir A** (2010). GC/MS Analysis and *In vitro* Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of *Pistacia lentiscus* Growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal.* 8: 1267-1276.
- 77) **Desenclos JC, De Valk H** (2005). Les maladies infectieuses émergentes: importance en sante publique, aspects épidémiologiques, déterminants et prévention. *Méd. Mal. Infect.* 35: 49-61.
- 78) **Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, Herrenknecht C, Bories C, Hocquemiller R, Fournet A** (2007). Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 112: 7-12.
- 79) **Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW** (2008). Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with ⁶⁰Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis. Colon Rectum.* 51: 1641-8.
- 80) **Dorman HJD, Deans SG** (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* 88: 308-316.
- 81) **Dumas M** (2000). La maladie du sommeil, maladie réémergente. *Bull. Acad. Nat. Méd.* 184: 1867-1885.
- 82) **Duschak VG, Couto AS** (2007). An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* (2): 19-51.
- 83) **Du X, Cuo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, McKerrow JH, Cohen FE** (2002). Synthesis and structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thiosemicarbazones Inhibitions of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. *J. Med. Chem.* 45: 2695-2707.
- 84) **Easmon J, Pürstinger G, Heinisch G** (2001). Synthesis, cytotoxicity, and antitumor activity of copper(II) and iron(II) complexes of (4)N-azabicyclo [3.2.2] nonane thiosemicarbazones derived from acyl diazines. *J. Med. Chem.* 44: 2164-71.
- 85) **Elgendy EM, Khayyat SA** (2008). Oxidation Studies on Some Natural Monoterpenes: Citral, Pulegone, and Camphene. *Russian Journal of Organic Chemistry.* 44 (6): 814-822.
- 86) **EL-Kamali HH, EL-amir MY** (2010). Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of Ethanolic Extracts Obtained from Selected Sudanese Medicinal Plants. *Current Research Journal of Biological Sciences.* 2(2): 143-146.

- 87) **Eozenou P, Jannin J, Ngampo S, Carme B, Tell GP, Schechter PJ** (1989). Essai de traitement de la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense* par l'éflornithine en République Populaire du Congo. *Med. Trop.* 49: 149-54.
- 88) **Fandohan P, Gbenou JD, Gnonlonfin B, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ** (2004). Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52: 6824-9.
- 89) **Fandohan P, Gnonlonfin B, Laleye A, Gbenou JD, Darboux R, Moudachirou M** (2008). Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 46(7): 2493-7.
- 90) **Fatondji HR, Gbaguidi F, Kpoviessi S, Bero J, Chataigne G, Hannaert V, Quetin-Leclercq J, Poupaert J, Accrombessi CG** (2010a). Synthesis, spectrometric characterization and trypanocidal activity of some 1,3,4-thiadiazolines derivatives. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 4(6): 2113-2119.
- 91) **Fatondji HR, Gbaguidi F, Kpoviessi S, Sonounameto E, Lagnika L, Ambaliou S, Mansourou M, Poupaert J, Accrombessi GC** (2010b). Synthèse, Caractérisation et Etude de Propriétés Antimicrobiennes de la Semicarbazone et la Thiosemicarbazone de la Carvone. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* 030 : 11 – 17.
- 92) **Fatondji HR, Gbaguidi F, Kpoviessi S, Bero J, Hannaert V, Quetin-Leclercq J, Poupaert J, Mansourou M, Accrombessi GC** (2011). Synthesis, characterization and trypanocidal activity of some aromatic thiosemicarbazones and their 1,3,4- thiadiazolines derivatives. *African Journal of Pure and Applied Chemistry.* 5(1): 59-64.
- 93) **Fatondji HR** (2011). Synthèse, Caractérisation, Activités Antiparasitaires et Antimicrobiennes de Semicarbazones, Thiosemicarbazones et de leurs Dérivés Thiadiazolines. Thèse de Doctorat unique de l'Université d'Abomey-Calavi, N° : 13-11/FDCA/FAST/UAC.
- 94) **Ferraria MB, Bisceglie F, Buschini A, Franzoni S, Pelosi G, Pinelli S, Tarasconi P, Tavone M** (2010). Synthesis, structural characterization and antiproliferative and toxic bio-activities of copper(II) and nickel(II) citronellal N4- ethylmorpholine thiosemicarbazones. *J. Inorg. Biochem.* 104(2): 199-206.
- 95) **Feun L, Modiano M, Lee K, Mao J, Marini A, Savaraj N, Plezia P, Almassian B, Colacino E, Fischer J** (2002). Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 50(3): 223-229.
- 96) **Flet C** (1984). Les substances naturelles sources de médicaments nouveaux. Ed. Le Moniteur, p.556.
- 97) **Franchomme P** (1981). L'aromatologie à visée anti-infectueuse. *Phytothérapie.* 1:25-47.
- 98) **Franchomme P, Penoel D** (1990). Matière médicale aromatique fondamentale (317-406), livre quatrième, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. R. Jollois Edit., Limoge, p.446.

- 99) **French FA, Blanz EJJ** (1965). The carcinostatic activity of alpha-(N) heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones, Isoquinoline-1-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *Cancer Res.* 25: 1454-8.
- 100) **Fujii N, Mallari JP, Hansell EJ, Mackey Z, Doyle P, Zhou YM, Gut J, Garcia CC, Brousse BN, Carlucci MJ** (2004). Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication in vitro. *Antiviralr. Chem. Chemother.* 14: 99-105.
- 101) **Fujii N, Mallari JP, Hansell EJ, Mackey Z, Doyle P, Zhou YM, Gut J, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Kipli GR** (2005). Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15: 121-123.
- 102) **Gaworski CL** (1992). Developmental toxicity evaluation of inhaled citral in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology.* 30(4): 269-275.
- 103) **Gbogbo KA, Batawila K, Anani K, Prince-David M, Gbéassor M, Bouchet P Akpagana K** (2006). Activité antifongique des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) et *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. (Poaceae) sur des micromycètes influençant la germination du Maïs et du Niébé. *Acta botanica Gallica.* 153 (1) : 115-124.
- 104) **Glinma B, Kpoviessi DSS, Gbaguidi FA, Kapanda CN, Bero J, Quetin-Leclercq J, Moudachirou M, Poupaert J, Accrombessi GC** (2012). Synthesis, Characterization, trypanosomal activities on *Trypanosoma brucei brucei* and toxicity against *Artemia salina* Leach of N(4)-aryl semicarbazones and thiosemicarbazones. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 4(2):1016-1021.
- 105) **Haddouchi F, Lazouni HA, Meziane A, Benmansour A** (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science.* 5(2): 246 – 259.
- 106) **Hajipour AR, Mohammadpoor-Baltork I, Bigdeli M** (1999). A convenient and mild procedure for the synthesis of hydrazones, and semicarbazones from aldehydes or ketones under solvent-free conditions. *J. Chem. Res.* (9): 570-571.
- 107) **Hall IH, Lackey CB, Kistler TD** (2000). Cytotoxicity of copper and cobalt complexes of furfural semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives in murine and human tumor cell lines. *Pharmazie.* 55: 937-41.
- 108) **Hammer KA, Carson CF, Riley TV** (2002). In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemoth.* 50: 195-9.
- 109) **Hahn EH** (1950). Spin Echoes. *Phys. Rev.* 80(4): 580-594.
- 110) **Harkenthal M, Reichling J, Geiss HK, Saller R** (1999). Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput, oil, niaouli oil, manuka oil, Kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie.* 54(6): 460-463.
- 111) **Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM** (2004). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. *Churchill Livingstone, Edinbrugh.* 245–252.

- 112) **Hilo S** (1996). The Medicinal Properties of some Azalea Flora in Arabian Peninsula. Dar Almanar, P.O.Box 1250, Jeddah 21431, Saudi Arabia, Dar Almanar.
- 113) **Hoberman AM** (1989). Oral general reproduction of citral in female rats. *Toxicologist*. 9(1): 271.
- 114) **Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH** (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet*. 373: 1570–1575.
- 115) **Hu W-X, Zhou W, Xia C-N, Wen X** (2006). Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16(8): 2213–2218.
- 116) **Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H** (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47: 565-573.
- 117) **Inouye S, Yamaguchi H, Takizawa T** (2001). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 7: 251-254.
- 118) **Jalilian AR, Rostampour N, Rowshanfarzad P, Shafaii K, Kamali-Dehghan M, Akhlaghi M** (2009). Preclinical studies of [⁶¹Cu]ATSM as a PET radiopharmaceutical for fibrosarcoma imaging. *Acta Pharm*. 59: 45-55.
- 119) **Jeganathan S, Sanderson L, Dogruel M, Rodgers J, Croft S, and Thomas SA** (2011). The Distribution of Nifurtimox Across the Healthy and Trypanosome-Infected Murine Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers, *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 336(2): 506–515.
- 120) **Jennison C, Turnbull BW** (2000). Group Sequential Methods with Application to Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, FL. USA.
- 121) **Jevtović V, Ivković S, Kaisarević S, Kovačević R** (2010). Anticancer activity of new copper(II) complexes incorporating a pyridoxal-semicarbazone ligand. *Contemporary Materials*. 1(2): 133-137.
- 122) **Jevtovic V, Pelosi G, Ianelli S, Kovacevic R, Kaisarevic S** (2010). Synthesis, Structural Studies and Biological Activity of a Dioxovanadium(V) Complex with Pyridoxal Semicarbazone. *Acta Chim. Slo*. 57(2): 363–369.
- 123) **Johnson AW** (2003). Invitation à la chimie organique. Editions De Boeck, Paris Bruxelles.
- 124) **Juergens U, Engelen T, Racké K, Stöber M, Gillissen A, Vetter H** (2004). Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 17(5): 281–287.
- 125) **Kandil O, Radwan NM, Hassan AB, Amer AM, el-Banna HA, Amer WM** (1994). Extracts and fractions of *Thymus Capitatus* exhibit antimicrobial activities. *J. Ethnopharmacol*. 44(1): 19-24.

- 126) **Karunamoorthi K, Ilango K** (2010). Larvicidal activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Croton macrostachyus* Del. against *Anopheles arabiensis* Patton, a potent malaria vector. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 14: 57-62.
- 127) **Kasuga NC, Sekino K, Ishibawa** (2003). Synthesis, crystal structure and antibacterial activity of monomeric 7-coordinate bismuth (III) complexes with tridentate and pentadentate thiosemicarbazones ligands. *J. Inorg. Biochem.* 96(2): 298-310.
- 128) **Kavlock RJ, Allen BC, Faustman EM, Kimmel CA** (1995). Dose-response assessment for developmental toxicity. IV. Benchmark dose for fetal weight changes. *Fundamental Applied Toxicology*. 26 : 211-222.
- 129) **Ketoh GK, Koumaglo HK, Glitho IA** (2005). Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera:Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Stored Prod. Res.* 41(4): 363-371.
- 130) **Ketoh GK, Koumaglo HK, Glitho IA, Huignard J** (2006). Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*. 77(7-8): 506-510.
- 131) **Khadri A., Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Neffati M, Smiti S, Araújo MEM** (2006). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C NMR. *Fitoterapia*. 77: 506-510.
- 132) **Khanuja SPS** (2005). Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.* (Poaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 171-186.
- 133) **Kim JK, Marshall MR, Cornell JA, Preston JF, Wei IC** (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on @sh cubes. *Journal of Food Science*. 60: 1364-1374.
- 134) **Klayman DL, Scovill JP, Brue J** (1984). 2-acethylpyridine thiosemicarbazones derivatives of Acethylisoquinoline as Potential Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* 27: 84.
- 135) **Koba K, Poutouli PW, Raynaud C, Chaumont J-P, Sanda K** (2009). Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo. *Bangladesh J. Pharmacol.* 4: 1-8.
- 136) **Koba K, Sanda K, Raynaud C, Mandin D, Millet J, Chaumont JP** (2003). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L. (DC) Stapf., *C. nardus* L. Rendle et *C. schoenanthus* L. Spreng. *J. Mycol. Méd.* 13 : 175-85.
- 137) **Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene YA, Millet J, Chaumont JP** (2004). Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 148: 202-206.
- 138) **Koca M, Ahmedzade M, Çukurovali A, Kazaz C** (2005). Studies on the Synthesis and Reactivity of Novel Benzofuran-2-yl-[3-Methyl-3-Phenylcyclobutyl] Methanones and their

- Antimicrobial Activity. *Molecules*. 10(7): 747-754.
- 139) **Koch O, Stuttgart G** (1950). Clinical and experimental studies on the effects of thiosemicarbazones. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 210: 409-23.
- 140) **Kowol CR, Berger R, Eichinger R** (2007). Gallium (III) and iron(III) complexes of alpha-N-heterocyclic thiosemicarbazones: synthesis, characterization, cytotoxicity, and interaction with ribonucleotide reductase. *J. Med. Chem.* 50: 1254-65.
- 141) **Kowol CR, Eichinger R, Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Keppler BK** (2007). Effect of metal ion complexation and chalcogen donor identity on the antiproliferative activity of 2-acetylpyridine N,Ndimethyl(chalcogen)semicarbazones. *J. Inorg. Biochem.* 101: 1946-57.
- 142) **Kowol CR, Trondl R, Heffeter P** (2009). Impact of Metal Coordination on Cytotoxicity of 3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone (Triapine) and Novel Insights into Terminal Dimethylation. *J. Med. Chem.* 52: 5032–5043.
- 143) **Kpadonou Kpoviessi BGH, Yayi Ladekan E, Kpoviessi DSS, Gbaguidi F, Yehouenou B, Quetin-Leclercq J, Figueredo G, Moudachirou M, Accrombessi GC** (2012). Chemical variation of essential oil constituents of *ocimum gratissimum* L. from Benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* Leach. *Chem. Biodiv.* 9 (1): 139-150.
- 144) **Krall RL, Penry JK, White BG, Kupferberg HJ, Swinyard E.A.** (1978). *Anticonvulsant drug development: Anticonvulsant drug screening.* *Epilepsia.* 19: 409-428.
- 145) **Krohn KA, Link JM, Mason RP** (2008). Molecular imaging of hypoxia. *J. Nucl. Med.* 49(2): 129-48.
- 146) **Kumar A** (1988). Antibacterial properties of some eucalyptus oils, *Fitoterapia*, 59: 141–144.
- 147) **Kumar S, Kumar N** (2013). Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies on Some Transition Metal Complexes of Thiosemicarbazone. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 4 (1): 305-311.
- 148) **Kune GA** (1964). To-day's drugs: methisazone. *Br. Med. J.* 2: 621.
- 149) **Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y, Ichimura K** (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric. Bil. Chem.* 43: 2365-2371.
- 150) **Ladan Z, Amupitan JO, Oyewale OA, Okonkwo EM, Ladan EO, djobo B, Habila ON** (2011). Chemical composition and biological activity of the volatile oils of *Hyptis spicigera* against *Trypanosoma brucei brucei*, (*Tbb*) found in Northern Nigeria, *African Journal of Pure and Applied Chemistry.* 5(4): 53-58.
- 151) **Lalko J, Api AM** (2008). Citral: identifying a threshold for induction of dermal sensitization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 52: 62-73.
- 152) **Laleye A, Gbenou J, Edorh P, Gangbo F, Anthony D, Daho R, Yayi E, Ahoussi L, Gbaguidi**

- F, Darboux R, Moudachirou M** (2004). Evaluation de l'embryotoxicité de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. black (Niaouli) chez le rat wistar. *Journal de la Société ouest-africaine de chimie*. 2004 18 : 149-164.
- 153) **Larsen AK, Skladanowski A** (1998). Cellular resistance to topoisomerase targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim. Biophys. Acta*. 1400: 257-74.
- 154) **Larsen AK, Skladanowski A, Bojanowski K** (1996). The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle. *Prog. Cell. Cycle Res.* 2: 229-39.
- 155) **Lee SO, Choi GJ, Jang KS, Lim HK, Cho KY, Kim J-C** (2007). Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathol. J.* 23(2): 97-102.
- 156) **Legros D, Evans S, Maiso F, Enyaru JC, Mbulamberi D** (1999). Risk factors for treatment failure after melarsoprol for *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 439-42.
- 157) **Legros D, Ollivier G, Gastellu-Etchegorry M, Paquet C, Burri C, Jannin J, Büscher P** (2008). Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 1 (1):32-8.
- 158) **Lehman AJ, Fitzhugh OG** (1954). 100-fold margin of safety. *Assoc. Food Drug Off. U.S.Q. Bull.* 18: 33-35.
- 159) **Leite ACL, Moreira DRM, Cardoso MVO, Hernandez MZ, Pereira VRA, Silva RO, Kiperstok AC, Soares MBP** (2007). Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Chem. Med. Chem.* 2: 1339-1345.
- 160) **Lessa JA, Soares MA, dos Santos RG, Mendes IC, Salum LB, Daghestani HN, Andricopulo AD, Day BW, Vogt A, Beraldo H** (2013). Gallium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects and investigation on the interactions with tubulin. *Biometals*. 26(1):151-65.
- 161) **Leung AY** (1980). Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.
- 162) **Lewis JS, Laforest R, Dehdashti F, Grigsby PW, Welch MJ, Siegel BA** (2008). An imaging comparison of ⁶⁴Cu-ATSM and ⁶⁰Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix. *J. Nucl. Med.* 49: 1177-82.
- 163) **L'Heritier de Brutelles CL** (1789). *Sertum Anglicum*. Paris: Didot.
- 164) **Lindman H, Taube A, Bergh JC** (1994). Suramin inhibits the growth of human breast cancer cell lines. Studies on parental lines and corresponding sublines with acquired doxorubicin resistance with and without expression of P-glycoprotein. *Anticancer Res.* 14:363-366.
- 165) **Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ** (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

- developmental settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* 46: 3-25.
- 166) **Lis-Balchin M, Buchbauer G, Ribisch K, Wenger MT** (1998). Comparative antibacterial effects of novel Pelargonium essential oils and solvent extracts. *Lett. Appl. Microbiol.* 27(3): 135-141.
- 167) **Liu L** (2008). Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in High-five insect cells. *Protein Expr. Purif.* 60(2): 225-231.
- 168) **Louis FJ, Bouteille B, Buguet A** (2004). La résurgence de la maladie du sommeil. In : *Livre blanc du haut-comité de la défense civile*. Curé M. (Ed.). Paris : Haut-Comité de la défense civile.
- 169) **Louis FJ, Keiser J, Simarro PP, Schmid C, Jannin J** (2003). L'éflornithine dans le traitement de la maladie du sommeil. *Méd. Trop.* 63(6) : 559-63.
- 170) **Low T** (1990). *Bush Medicine, A Pharmacopeia of Natural Remedies*, Angus & Robertson, p. 85.
- 171) **Ludwig JA, Szakács G, Martin SE** (2006). Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res.* 66: 4808-15.
- 172) **Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS** (2008). Antimicrobial activity of Eucalyptus citriodora essentialoil. *International Journal of Essential Oil Therapeutics.* 2: 69-75.
- 173) **Ma B, Goh BC, Tan EH** (2008). A multicenter phase II trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine) and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer with pharmacokinetic evaluation using peripheral blood mononuclear cells. *Invest. New Drugs.* 26: 169-73.
- 174) **Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA** (2010). Chemical composition of Eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on Lutzomyia longipalpis. *Veterinary Parasitology.* 167: 1-7.
- 175) **Mackey ZB, O'Brien TC, Greenbaum DC, Blank RB, McKerrow JH** (2004). A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in Trypanosoma brucei. *J. Biol. Chem.* 279: 48426-33.
- 176) **Mackenzie MJ, Saltman D, Hirte H** (2007). A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium. *Invest. New Drugs.* 25: 553-8.
- 177) **Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis AL, Chinou IB, Mitaku S** (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus. var. chia*. *Planta Med.* 65(8): 749-752.
- 178) **Maharjan M, Mishra DR** (2006). Trypanosomiasis in domestic animals of Makwanpur

- district, Nepal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081: 320-321.
- 179) **Malawska B** (2003). *Application of pharmacophore models for the design and synthesis of new anticonvulsant drugs*. *Mini Rev. Med. Chem.* 3: 159-165.
- 180) **Mangena T, Muyima NY** (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Romarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 28(4): 291-296.
- 181) **Mann J** (1987). Secondary metabolism. Second edition, Clarendon press, Oxford, p.374.
- 182) **Matarrese M, Bedeschi P, Scardaoni R** (2010). Automated production of copper radioisotopes and preparation of high specific activity [(64)Cu]Cu-ATSM for PET studies. *Appl. Radiat. Isot.* 68: 5-13.
- 183) **Matasyoh JC, Wagara IN, Nakavuma JL, Kiburai MA** (2011). Chemical composition of *Cymbopogon citrates* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal of Food Science.* 5(3): 138-142.
- 184) **Mateus Aparecido C, de Oliveira Monteiro CM, Goldner Scoralik M, Teixeira Gomes F, de Azevedo Prata MC, Daemon E** (2010). Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research.* 107(4) : 987-992.
- 185) **McMichael AJ** (2004). Environmental and social influence on emerging infectious diseases: past, present and future. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 359: 1049-1058.
- 186) **McNamara JO, Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG** (2001) *Drugs effective in the therapy of the epilepsies*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, The McGraw-Hill, New York, . pp 521-547.
- 187) **Melo MS, Sena LCS, Barreto FJN, Bonjardim LR, Almeida JRGS, Lima JT, De Sousa DP, Quintans-Júnior LJ** (2010). Antinociceptive effect of citronellal in mice. *Pharmaceutical Biology.* 48(4): 411-416.
- 188) **Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL** (1982). Brine shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant constituents, *J. Med. Pl.* 45: 31-4.
- 189) **Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M** (1956). *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science.* 123: 464.
- 190) **Mirza M, Yaqeen Z, Bano A, Qadri RB, Qadiruddin M** (2004). Trace elements in indigenous medicinal diuretic plants in human health and disease (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Raphanus sativus* Linn. and *Zea mays* Linn.). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research.* 47: 42-5.
- 191) **Mohammed G, Ayotunde AS, Bashir I, Aji BM, Aliyu SM, Hauwa M** (2012). Comparative Evaluation of Ethno-Medicinal Use of two Species of *Eucalyptus* Plant as an

- Antimicrobial Agent. *International Journal of Science and Technology*. 2 (8): 548-550.
- 192) **Mompon B** (1994). Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO₂, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4^{ième} rencontre internationale de Nyons, p. 149-166.
- 193) **Montessori V, Phillips P, Montaner J, Haley L, Craib K, Bessuille E, Black W** (1996). Species distribution in human immunodeficiency virus-related mycobacterial infectious: implications for selection of initial treatment. *Clin. Infect. Dis.* 22: 989-992.
- 194) **Morton JF** (1981) Atlas of medicinal plants of middle America. Bahamas to Yucatan. C.C. Thomas, Springfield, IL.
- 195) **Moudachirou M, Gbénou JD, Chalchat JC, Chabard JL, Lartigue C** (1999). Chemical Composition of Essential Oils of Eucalyptus from Bénin: *Eucalyptus citriodora* and *E. camaldulensis*. Influence of Location, Harvest Time, Storage of Plants and Time of Steam Distillation. *Journal of Essential Oil Research*. 11(1): 109-118.
- 196) **Moulin M, Coquerel A** (2002). Pharmacologie. 2^{ième} Ed pp31-32.
- 197) **Musyimi DM, Ogur JA** (2008). Comparative assessment of antifungal activity of extracts from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus citriodora*. *Research Journal of Phytochemistry*. 2: 35-43.
- 198) **Negrelle RRB, Gomes EC** (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Rev. Bras. Pl. Med.* 9: 80-92.
- 199) **Ngantchou I, Nono J-J** (2004). Activités trypanocides comparées de quelques composés naturels isolés des plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* (13) : 133-139.
- 200) **Nok AJ** (2003). Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res.* 90(1):71-9.
- 201) **Nonviho G, Wotto VD, Noudogbessi JP, Avlessi F, Akogbeto M, Sohounhloué DCK** (2010). Insecticidal activities of essential oils extracted from three species of *poaceae* on *anopheles gambiae* spp, major vector of malaria. *Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 11 (4): 411 – 420.
- 202) **Nutting CM, van Herpen CML, Miah AB** (2009). Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 20: 1275-9.
- 203) **OCDE** (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, 19.
- 204) **OCDE** (2001). Guidance document on Acute Oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment 24.

- 205) **Office fédéral de la santé publique (OFSP)**, (2007), Dépliant « Aérer ou Parfumer », <http://www.baq.admin.ch/themen/chemikalien/00228/04325/index.html?lang=fr>
- 206) **Olivero-Verbel J, Nerio LS and Stashenko EE** (2010). Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest Management Science*. 66: 664–668.
- 207) **Ollivier G, Legros D** (2001). Trypanosomiase humaine africaine : Historique de la thérapeutique et de ses échecs. *Tropical Medicine and International Health*. 6(11) : 858.
- 208) **Onadja Y, Ouedraogo A, Samate AD** (2007). Chemical composition and physical characteristics of the essential oil of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng of Burkina Faso. *Journal of Applied Sciences*. 7(4): 503-506.
- 209) **Opletalová V, Kalinowski DS, Vejsová M** (2008). Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. *Chem. Res. Toxicol*. 21: 1878-89.
- 210) **Osawa K, Matsumoto T, Mruyama T, Tkiguchi T, Takazoe I** (1990). Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their components against periodontopathic bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(1): 17-21.
- 211) **Otero L, Vieites M, Boiani L** (2006). Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* 49: 3322-31.
- 212) **Ouédraogo IW, Boulvin M, Flammang R, Gerbaux P, Bonzi-Coulibaly YL** (2009). Conversion of Natural Aldehydes from *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia multiflora* into Oximes: GC-MS and FT-IR Analysis. *Molecules*. 14: 3275-3285.
- 213) **Ouellette M, Kundig C** (1997). Microbid multidrug resistance. *Internat. J. Antimicrob. Agents*. 8: 179-87.
- 214) **Owolabi MS, Oladimeji MO, Lajide L, Singh G, Marimuthu P, Isidorov VA** (2009). Bioactivity of three plant derived essential oils against the maize weevils *sitophilus zeamais* (motschulsky) and cowpea weevils *callosobruchus maculatus* (fabricius). *EJEAFChe*. 8 (9): 828-835.
- 215) **Oyedeji AO, Ekundayo O, Olawore ON, Adeniyi BA, Koenig WA** (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia*. 70(5): 526-528.
- 216) **Palanimuthu D, Shinde SV, Somasundaram K, Samuelson AG** (2013). In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 56 (3): 722-734.
- 217) **Pandeya SN, Aggarwal N, Jain JS** (1999). Evaluation of semicarbazones for anticonvulsant and sedative hypnotic properties. *Pharmazie*. 54: 300-302.

- 218) **Pandeya SN, Mishra V, Ponnilararsan I** (2000). *Anticonvulsant activity of p-chloro phenyl substituted aryl semicarbazones, the role of primary terminal amino group*. *Pol. J. pharmacol.* 52: 283-290.
- 219) **Pandeya SN, Ponnilararsan I, Pandey A, Lakhan R** (1999). Evaluation of p-nitrophenyl substituted semicarbazones for anticonvulsant properties. *Pharmazie*. 54: 923-925.
- 220) **Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A** (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J. Dent.* 28(5): 341-345.
- 221) **Parekh AK, Desai KK** (2006). Synthesis and antibacterial activity of thiosemicarbazones, *I.J.C-B.* 45(04): 1072-1075.
- 222) **Pérez-Rebolledo A, Teixeira LR, Batista AA** (2008). 4-nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant *in vitro* anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med.Chem.* 43: 939-48.
- 223) **Pingaew R, Prachayasittikul S, Ruchirawat S** (2010). Synthesis, Cytotoxic and Antimalarial Activities of Benzoyl Thiosemicarbazone Analogs of Isoquinoline and Related Compounds. *Molecules*. 15: 988-996.
- 224) **Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, Khalil L, Delattre J, Pelissier E, Sansonetti N** (1998). Opolon for the multivirc group, Factors Associated With Serum Alanine Transaminase Activity in Healthy Subjects: Consequences for the Definition of Normal Values, for Selection of Blood Donors, and for Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 27(5): 1231-1219.
- 225) **Porter RJ, Hessie BJ, Cereghino JJ, Gladding GD, Kupferberg HJ, Scoville B, White BG** (1985). Advances in the clinical development of antiepileptic drugs. *Fed. Proc.* 44(10): 2645-2649.
- 226) **Porter RJ, Rogawski MA** (1992). *New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery*. *Epilepsia*. 1(33): 1-6.
- 227) **Prost A** (1989). Environnement, comportements et epidemiologie des maladies. *In : La santé en pays tropicaux*, Rougemont A., Brunet-Jailly J. (eds.). Paris, Doin editeurs, 65-90.
- 228) **Purcell M** (1946). Spontaneous emission probabilities at radiofrequencies. *Phys. Rev.* 69(11-12): 681.
- 229) **Quiroga AG, Perz JM, Lopez S** (1998). Novel tetranuclear orthometalated complexes of Pd(II) and Pt(II) derived from p-isopropylbenzaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cell lines. Interaction of these complexe with DNA. *J. Med. Chem.* 75: 255.
- 230) **Rajeswara Rao BR, Kaul PN, Syamasundar KV, Ramesh S** (2003). Comparative composition of decanted and recovered essential oils of Eucalyptus citriodora Hook. *Flavour and Fragrance Journal*. 18(2): 133–135.
- 231) **Rakover Y, Ben-Arye E, Goldstein LH** (2008). The treatment of respiratory ailments with essential oils of some aromatic medicinal plants. *Review. Hebrew*. 147(10): 783-8.

- 232) **Ramezani H, Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Dargan JS** (2002). Fungicidal effect of volatile oils from *eucalyptus citriodora* and its major constituent citronellal. *Arable Entomology & Pathology*. 55:327-330.
- 233) **Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B** (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*. 20(12): 522- 531.
- 234) **Rauber SC, Guterres SS, Schapoval EES** (2005). LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37(3): 597-601.
- 235) **Räz B, Iten M, Grether-Bühler Y, Kaminsky R, Brun R** (1997). The AlamarBlueR essay to determine drugs sensitivity of African trypanosomes (*Trypanosoma. bruceirhodhesiense* et *Trypanosoma. bruceigambiense*) *in vitro*. *ActaTropica*. 68: 139-147.
- 236) **Reiter M, Brandt W** (1985). Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus citriodora* on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung*. 35(1A): 408-414.
- 237) **Rice PJ, Coats JR** (1994). Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house (Diptera: Muscidae), red or beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 87: 1172-1179.
- 238) **Richard H** (1974). Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. Série Synthèse Bibliographiques N°2. Sous le patronage du B.N.I.S.T. 212.
- 239) **Rizk A** (1986). The Phytochemistry of the Flora of Qatar. University of Qatar, Doha, Qatar, *Scientific and Applied Research Centre* 50-150.
- 240) **Robinson T** (1991). The organic constituents of higher plants. The chemistry and interrelationships. *Cordus Press*, MA, USA.
- 241) **Rodov V, Ben-Yehoshua S, Fang DQ, Kim JJ, Ashkenazi R** (1995). Preformed antifungal compounds of lemon fruit: Citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43: 1057-1061.
- 242) **Rosenthal PJ, McKerrow JH, Guy RK** (2005), *Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 (1): 121-123.
- 243) **Rouessac F, Rouessac A** (1998). Analyse Chimique. Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. Cours et Exercices Résolus. 4ème Ed.; Dunod, Paris.
- 244) **Roussanova N** (2011). Antibacterial activity of essential oils against the etiological agent of American fowlbrood disease (*Paenibacillus larvae*). *Bulg. J. Vet. Med.* 14(1): 17-24.
- 245) **Rusenova N, Parvanov P** (2009). Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*. 7(1): 37-43.
- 246) **Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R** (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants,

- antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 91: 621–632.
- 247) **San DK, Brutcher RJ, Chandhuri S** (2003) Spectroscopic, structural and antibacterial properties of copper (II) complexes with bio-relevant 5-methyl-3-formylpyrazole N (4)-benzyl-N (4) methyl thiosemicarbazone. *Mol. Cell. Biochem.* 2(21): 253.
- 248) **Santin MR, Dos Santos AO, Nakamura CV, Dias BP, Ferreira PIC, Ueda-Nakamura T** (2009). In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitology research.* 105(6): 1489-1496.
- 249) **Santos Pimenta LP, Pinto GB, Takahashi JA, Silva LGF, Boaventura MAD** (2003). Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine.* 10: 209-212.
- 250) **Sartorelli AC, Agrawal KC, Moore EC** (1971). Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by α -(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones, *Biochem. Pharmacol.* 20: 3119-23.
- 251) **Sartorelli AC, Booth BA** (1967). Inhibition of the growth of sarcoma 180 ascites cells by combinations of inhibitors of nucleic acid biosynthesis and the cupric chelate of kethoxal bis-(thiosemicarbazone). *Cancer Res.* 27: 1614-9.
- 252) **Sartorelli P, Marquiere AD, Amaral-Baroli A, Lima ME, Moreno PR** (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother. Res.* 21(3):231-3.
- 253) **Schnitzler P, Schon K, Reichling J** (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie.* 56(4): 343-7.
- 254) **Shao J, Zhou B, Di Bilio AJ** (2006). A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Mol. Cancer Ther.* 5: 586-92.
- 255) **Sharma R, Nagar M** (2006). Synthesis, structural and antibacterial studies of some mixed ligand complexes of Zn(II), Cd(II), and Hg(II) derived from citral thiosemicarbazone and N-phthaloyl amino acids. *Phosphorus. Sulfur and Silicon and the Related Elements.* 181(12): 2863-2875
- 256) **Siest G** (1975). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities in plasma: statistical distributions, individual variations, and reference values. *Clin. Chem.* 21(8): 1077-87.
- 257) **Silou T, Mapola G, Makany RA, Loumouamou AN, Malanda M, Chalchat J-C** (2009). Model of Steam and Water Extraction of Essential Oil of *Eucalyptus Citriodora* Using a Complete 2n Factorial Plan. *International Journal of Food Engineering.* 5(4): Article 9.
- 258) **Silva J, Abebe W, Sousa SM, Duarte VG, Machado ML, Matos FJA** (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of eucalyptus, *journal of ethnopharmacology.* 89(2-3): 277-283.

- 259) **Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ** (2007). Identification spectrométrique de composés organiques, (2e édition) Editeur : De Boeck.
- 260) **Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG** (2011). The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5(2): 1007.
- 261) **Singh HP, Batish DR, Setia N, Kohli RK** (2005). Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Annals of Applied Biology.* 146(1): 89–94.
- 262) **Sirwal IA, Banday KA, Reshi AR, Bhat MA, Wani MM** (2004). Estimation of Glomerular Filtration Rate (GFR). *J.K. Science.* 6: 121–123.
- 263) **Sleet RB, Brende K** (1983). Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. *Ecotoxicol. Env. Safety.* 7: 435-446.
- 264) **Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L** (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Appl. Microbiol.* 26: 118122.
- 265) **Sohounhloue DK, Dangou J, Gnomhossou B, Garneau FX, Gagnon H, Jean FI** (1996). Leaf Oils of Three *Eucalyptus* Species from Benin: *E. torelliana* F. Muell., *E. citriodora* Hook, and *E. tereticornis* Smith. *Journal of Essential Oil Research.* 8(1): 111-113.
- 266) **Subrahmanyam NPV, Kinthada PMMS, Kalyani P, Muralidhar P** (2012). Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anti cancer drugs. *Int. J. Pharm. Biomed. Sci.* 3(2): 24-27.
- 267) **Tangpu V, Yadav AK** (2006). Antidiarrhoeal activity of *cymbopogon citratus* and its main constituent, citral. *Pharmacologyonline.* 2: 290-298.
- 268) **Tarasconi P, Capacchi S, Pelosi G, Cornia M, Albertini R, Bonati A, Dall'Aglio PP, Lunghi P, Pinelli S** (2000). Synthesis, spectroscopic characterization and biological properties of new natural aldehydes thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 8(1): 157-162.
- 269) **Tchoumboungang F, Dongmo PMJ, Sameza ML, Mbanjo EGN, Fotso GBT, Zollo PHA, Menut C** (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1) : 77-84.
- 270) **Teeter T, Franciscus A** (2004). Comment interpréter un rapport de laboratoire, *Hepatitis C Support Project*, version 1.0.
- 271) **Teisseire PJ** (1991). Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. p.480.
- 272) **Thelander L, Gräslund A** (1983). Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. Destruction of the

- tyrosine free radical of the enzyme in an oxygen-requiring reaction. *J. Biol. Chem.* 258: 4063-6.
- 273) **Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP, Morgado-Diaz JA, de Souza W, Nakamura CV** (2005). Antileishmanial activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents chemother.* 49: 176-182.
- 274) **Traynor AM, Lee J, Bayer GK** (2009). A phase II trial of Triapine(R) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503. *Invest. New Drugs*: DOI 10.1007/s10637-009-9230-z.
- 275) **Trossini GHG, Guido RVC, Oliva G, Ferreira EI, Andricopulo AD** (2009). Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. *J. Mol. Graph. Model.* 28: 3-11.
- 276) **Tyagi AK, Malik A** (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of cymbopogon citrates. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 10: 65.
- 277) **Ultée A, Gorris LMG, Smid EJ** (1998). Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 211-218.
- 278) **Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S, Sjöberg A, Lennernäs H** (1998). Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J. Pharm. Sci.* 87: 360-366.
- 279) **US EPA** (1989). Risk assessment guidance for Superfund (RAGS), volume I: human health evaluation manual, part A.
- 280) **Valnet J, Duraffourd CH, Duraffourd P, Cilapraz J** (1978), L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant Med. Phytother.* 12: 43-52.
- 281) **Van NS** (1999). Present strategies in the treatment of human African trypanosomiasis (Chapter 15). In: Dumas M, Bouteille B, Buguet A (Eds), Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness, *Springer-Verlag*, Paris, 253-280.
- 282) **Vanhaecke GP, Persoone C, Claus PS** (1981). proposal for a Short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol. env. Safety.* 5: 382-387.
- 283) **Vesten JAV** (1971). The Tsetse Fly *Glossina fuscipes fuscipes* Newstead, 1911, in East Africa: some aspects of its biology and its role in the epidemiology of human and animal trypanosomiasis, *Doctoral Thesis, University of Amsterdam*.
- 284) **Vickerman K** (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.* 41(2): 105-14.
- 285) **Vieites M, Otero L, Santos D** (2008). Platinum (II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *J. Inorg. Biochem.* 102: 1033-43.
- 286) **Villalona-Calero MA, Otterson GA, Wientjes MG, Weber F, Bekaii-Saab T, Young D, Murgu AJ, Jensen R, Yeh T-K, Wei Y, Zhang Y, Grever M, Au JL-S** (2008).

- Noncytotoxic suramin as a chemosensitizer in patients advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *Ann. Oncol.* 19(11): 1903–1909.
- 287) **Watson L, Dallwitz** (2005). "Cymbopogon Spreng." from <http://deltaintkey.com/grass/www/cymbopog.htm>.
- 288) **Weiss EA** (1997). Essential oil crops: Wallingford changes. UK: *CAB International*. 59-137.
- 289) **Wejstal R, Hansson G, Lindholm A, Norkrans G** (1988). Persistent alanine aminotransferase elevation in healthy Swedish blood donors mainly caused by obesity. *Vox Sang.* 55: 151-156.
- 290) **Wright J** (1995). Essential oils. In Ashurst PR (Ed) Food flavorings. Blackie Academic and Professional Edition.
- 291) **Wu C, Shukla S, Calcagno AM, Hall MD, Gottesman MM, Ambudkar SV** (2007). Evidence for dual mode of action of a thiosemicarbazone, NSC73306: a potent substrate of the multidrug resistance linked ABCG2 transporter. *Mol. Cancer. Ther.* 6: 3287-96.
- 292) **Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR** (2004). Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Blood.* 104: 1450-8.

Sources des images

Figure 1:

http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRTkh-IGHq-gB1JKk-IxprT4lOEor3UXeNRlobmSgxcAVf_u_4B

Figure 14:

http://www.sleeping-sickness.ird.fr/Images_gif/schematryp.gif

Figure 15:

<http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRf0b9YrDydULEGMTM8eqglH25ieSq8ve8hIHv5H7OuVy8DJ6VRSQ>

Figure 16:

<http://wwwnc.cdc.gov/eid/images/01-0130-F1.jpg>

Figure 17:

<http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTod4qkjuX3wB2XMbSnidOMf6sXWPe6gTXyJG591mpudv3-HtKT>

Figure 18:

<http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2006/ryan/termpaper.html>

Annexes

Annexes 1

Annexes 2