



HAL
open science

Le sang de dragon : usages ancestraux de la sève de Croton lechleri en médecine traditionnelle amérindienne et applications médicales en Occident

Jonathan Goffredi

► To cite this version:

Jonathan Goffredi. Le sang de dragon : usages ancestraux de la sève de Croton lechleri en médecine traditionnelle amérindienne et applications médicales en Occident. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297894

HAL Id: hal-03297894

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297894>

Submitted on 23 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2019

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le **26 avril 2019** sur un sujet dédié à :

**LE SANG DE DRAGON : USAGES ANCESTRAUX DE LA SÈVE DE
CROTON LECHLERI EN MÉDECINE TRADITIONNELLE
AMÉRINDIENNE ET APPLICATIONS MÉDICALES EN OCCIDENT**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par

Jonathan GOFFREDI

né le 26 avril 1991 à Laxou (54)

Membres du Jury

| | | |
|----------------|-------------------------------|--|
| Président : | Mme. Dominique LAURAIN-MATTAR | Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine |
| Directeur : | Mme. Dominique LAURAIN-MATTAR | Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine |
| Co-Directeur : | M. Hervé BLAJMAN | Docteur en Pharmacie |
| Juges : | Mme Rosella SPINA | Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine |
| | M. Olivier GREMILLET | Docteur en Pharmacie |

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2018-2019

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication

Innovation pédagogique

Référente ADE

Référent dotation sur projet (DSP)

Marie-Paule SAUDER

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Dominique DECOLIN

Responsabilités

Filière Officine

Caroline PERRIN-SARRADO

Filière Industrie

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Pharma Plus ENSAIA

Xavier BELLANGER

Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Luc FERRARI

Commission d'agrément des maîtres de stage

François DUPUIS

ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Pierre LEROY

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Alain MARSURA
Alain NICOLAS
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|--------------------------------|----|---|
| Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ | 82 | <i>Thérapie cellulaire</i> |
| Béatrice DEMORE | 81 | <i>Pharmacie clinique</i> |
| Jean-Louis MERLIN | 82 | <i>Biologie cellulaire</i> |
| Jean-Michel SIMON | 81 | <i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i> |
| Nathalie THILLY | 81 | <i>Santé publique et Epidémiologie</i> |

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

| | | |
|-------------------------------|----|---|
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Igor CLAROT | 85 | <i>Chimie analytique</i> |
| Joël DUCOURNEAU | 85 | <i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i> |
| Raphaël DUVAL | 87 | <i>Microbiologie clinique</i> |
| Béatrice FAIVRE | 87 | <i>Hématologie, Biologie cellulaire</i> |
| Luc FERRARI | 86 | <i>Toxicologie</i> |
| Pascale FRIANT-MICHEL | 85 | <i>Mathématiques, Physique</i> |
| Christophe GANTZER | 87 | <i>Microbiologie</i> |
| Frédéric JORAND | 87 | <i>Eau, Santé, Environnement</i> |
| Isabelle LARTAUD | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Dominique LAURAIN-MATTAR | 86 | <i>Pharmacognosie</i> |
| Brigitte LEININGER-MULLER | 87 | <i>Biochimie</i> |
| Philippe MAINCENT | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |
| Patrick MENU | 86 | <i>Physiologie</i> |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS | 86 | <i>Chimie thérapeutique</i> |
| Bertrand RIHN | 87 | <i>Biochimie, Biologie moléculaire</i> |

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|-----------------|----|--|
| Alexandre HARLE | 82 | <i>Biologie cellulaire oncologique</i> |
| Julien PERRIN | 82 | <i>Hématologie biologique</i> |
| Loïc REPPEL | 82 | <i>Biothérapie</i> |
| Marie SOCHA | 81 | <i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i> |

MAITRES DE CONFÉRENCES

| | | |
|------------------------|----|----------------------|
| Sandrine CAPIZZI BANAS | 87 | <i>Parasitologie</i> |
|------------------------|----|----------------------|

| | | |
|-------------------|----|---|
| Xavier BELLANGER | 87 | <i>Parasitologie, Mycologie médicale</i> |
| Emmanuelle BENOIT | 86 | <i>Communication et Santé</i> |
| Isabelle BERTRAND | 87 | <i>Microbiologie</i> |
| Michel BOISBRUN | 86 | <i>Chimie thérapeutique</i> |
| Ariane BOUDIER | 85 | <i>Chimie Physique</i> |
| Cédric BOURA | 86 | <i>Physiologie</i> |
| Joël COULON | 87 | <i>Biochimie</i> |
| Sébastien DADE | 85 | <i>Bio-informatique</i> |
| Dominique DECOLIN | 85 | <i>Chimie analytique</i> |
| Roudayna DIAB | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |
| Natacha DREUMONT | 87 | <i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i> |
| Florence DUMARCAÏ | 86 | <i>Chimie thérapeutique</i> |
| François DUPUIS | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Reine EL OMAR | 86 | <i>Physiologie</i> |
| Adil FAIZ | 85 | <i>Biophysique, Acoustique</i> |
| Anthony GANDIN | 87 | <i>Mycologie, Botanique</i> |
| Caroline GAUCHER | 86 | <i>Chimie physique, Pharmacologie</i> |
| Stéphane GIBAUD | 86 | <i>Pharmacie clinique</i> |
| Thierry HUMBERT | 86 | <i>Chimie organique</i> |
| Olivier JOUBERT | 86 | <i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i> |

ENSEIGNANTS (suite)

Section
CNU* Discipline d'enseignement

| | | |
|-------------------------|-------|--|
| Alexandrine LAMBERT | 85 | <i>Informatique, Biostatistiques</i> |
| Julie LEONHARD | 86/01 | <i>Droit en Santé</i> |
| Christophe MERLIN | 87 | <i>Microbiologie environnementale</i> |
| Maxime MOURER | 86 | <i>Chimie organique</i> |
| Coumba NDIAYE | 86 | <i>Epidémiologie et Santé publique</i> |
| Arnaud PALLOTTA | 86 | <i>Bioanalyse du médicament</i> |
| Marianne PARENT | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |
| Caroline PERRIN-SARRADO | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Virginie PICHON | 85 | <i>Biophysique</i> |
| Sophie PINEL | 85 | <i>Informatique en Santé (e-santé)</i> |
| Anne SAPIN-MINET | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |
| Marie-Paule SAUDER | 87 | <i>Mycologie, Botanique</i> |
| Guillaume SAUTREY | 85 | <i>Chimie analytique</i> |
| Rosella SPINA | 86 | <i>Pharmacognosie</i> |
| Sabrina TOUCHET | 86 | <i>Pharmacochimie</i> |
| Mihayl VARBANOV | 87 | <i>Immuno-Virologie</i> |
| Marie-Noëlle VAULTIER | 87 | <i>Mycologie, Botanique</i> |
| Emilie VELOT | 86 | <i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i> |
| Mohamed ZAIYOU | 87 | <i>Biochimie et Biologie moléculaire</i> |

PROFESSEUR ASSOCIE

| | | |
|------------------|----|---------------------------|
| Julien GRAVOULET | 86 | <i>Pharmacie clinique</i> |
|------------------|----|---------------------------|

PROFESSEUR AGREGÉ

| | | |
|--------------------|----|----------------|
| Christophe COCHAUD | 11 | <i>Anglais</i> |
|--------------------|----|----------------|

*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

Remerciements

A notre président et directeur de thèse,

Madame Dominique LAURAIN-MATTAR, Professeur à la Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine.

Je vous exprime toute ma gratitude pour avoir dirigé cette thèse. Je vous remercie pour tous vos conseils avisés ainsi que pour le temps consacré et l'intérêt porté à l'encadrement de ce travail.

A notre co-directeur de thèse,

Monsieur Hervé BLAJMAN, Docteur en pharmacie.

Je vous remercie d'avoir proposé ce sujet d'étude passionnant.

J'espère que ce travail répondra à vos attentes.

Veillez trouver en cette thèse la marque de ma considération et de mon respect.

A nos membres du jury,

Madame Rosella SPINA, Maître de Conférences en Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine.

Je vous remercie d'avoir accepté si rapidement de siéger au sein de ce jury.

Je vous remercie pour votre gentillesse et pour les éléments que vous avez apporté à cet ouvrage. J'espère que ce travail saura vous contenter et vous exprime ma plus profonde gratitude.

Monsieur Olivier GREMILLET, Docteur en Pharmacie.

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre bienveillance et votre sympathie.

Je vous remercie également pour l'intérêt que vous avez su porté à ce travail et pour votre contribution.

Veillez trouver en cette thèse l'expression de ma plus grande sympathie.

A Monsieur Alain Reymond, administrateur délégué au CEIA de Bruxelles,

Je vous remercie pour le temps que vous avez accepté de me consacrer et pour votre sympathie.

Je vous remercie pour toutes les précieuses informations que vous m'avez fournies lors de nos échanges téléphoniques.

A Monsieur Jean-Pierre Félix des laboratoires Pierre d'Astier,

Je vous remercie pour les informations et les contacts que vous m'avez fournis lors de nos échanges. En espérant que cet ouvrage vous apporte satisfaction.

A mes parents Dominique et Florent,

Je vous remercie de m'avoir épaulé et soutenu durant ces années d'étude. Votre éducation m'a permis d'en arriver là aujourd'hui. Merci à vous d'être présents au quotidien, merci pour vos conseils que je devrais plus souvent entendre et pour m'avoir remis dans le droit chemin lorsqu'il le fallait. C'est une fierté pour moi de vous dédier ce travail, cette finalité, que j'aurai difficilement atteinte sans vous.

A ma grand-mère Colette,

Merci pour ton amour et ton soutien, pour m’avoir accueilli et hébergé à maintes reprises durant mes stages. J’espère que tu seras fière de ton petit-fils.

A mon oncle François et Amélie,

Merci à vous pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre soutien, pour vos encouragements, et pour la blonde du mercredi midi.

A Monsieur Alain Louis,

Je vous remercie de votre enseignement et des valeurs que vous m’avez inculqué.
Je tâcherai de ne pas les oublier durant mon exercice.

A tous mes proches, amis et famille, je dédie cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| I – Introduction | 8 |
| I-1) Qu'est-ce que le sang de dragon ? | 8 |
| I-2) Histoire et Mythologie | 8 |
| I-3) Usages traditionnels de la résine de <i>Croton lechleri</i> en Amazonie | 9 |
| II – Espèces productrices de sang de dragon..... | 11 |
| II-1) Caractères botaniques de <i>Croton lechleri</i> | 13 |
| II-2) Biologie et habitat | 14 |
| II-3) Récolte du latex | 15 |
| III - Constituants chimiques identifiés dans le latex de <i>Croton lechleri</i> | 17 |
| III-1) Les polyphénols | 17 |
| III-2) Les alcaloïdes | 19 |
| III-3) Les terpènes | 20 |
| IV – Etudes des activités pharmacologiques de la sève de <i>Croton lechleri</i> et de ses composés isolés | 23 |
| IV-1) Activité cicatrisante | 23 |
| IV-2) Activités gastroprotectrice et anti-ulcéreuse | 27 |
| IV-2-1) Etudes de l'effet cicatrisant sur des ulcères induits expérimentalement | 27 |
| IV-2-2) Evaluation du potentiel bactéricide vis-à-vis de <i>Helicobacter pylori</i> | 31 |
| IV-3) Activité antioxydante | 33 |
| IV-3-1) Etude du potentiel antioxydant de la sève brute | 33 |
| IV-3-2) Etude du potentiel antioxydant de composés isolés. | 34 |
| IV-4) Activité antimicrobienne | 38 |
| IV-4-1) Etude du spectre d'action antibactérien de la sève brute..... | 38 |
| IV-4-2) Activité antiparasitaire de la sève brute..... | 45 |

| | |
|--|----|
| IV-4-3) Etude de l'activité antivirale du SP303, un oligomère proanthocyanidique isolé du latex de <i>C.lechleri</i> | 46 |
| IV-5) Activité anti-inflammatoire | 53 |
| IV-5-1) Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'alcaloïde taspine | 53 |
| IV-5-2) Etude de la toxicité de la taspine | 55 |
| IV-5-3) Etude <i>in vitro</i> de l'effet anti-inflammatoire du sang de dragon brut | 56 |
| IV-6) Activité anticancéreuse | 58 |
| IV-6-1) Evaluation du potentiel mutagénique et antimutagénique de la sève de <i>Croton lechleri</i> | 58 |
| IV-6-2) Etude des mécanismes d'action anticancéreux du sang de dragon brut et de l'alcaloïde taspine. | 59 |
| IV-7) Activité anti-diarrhéique du SP303, un oligomère proanthocyanidique isolé du latex de <i>Croton lechleri</i> | 65 |
| IV-7-1) Utilisation du SP303 en médecine vétérinaire..... | 67 |
| IV-8) Activité immunomodulatrice de la sève brute et de l'alcaloïde taspine. | 68 |
| IV-9) Evaluation de la résine de <i>Croton lechleri</i> comme milieu de stockage des dents avulsées | 69 |
| V – Applications cliniques | 70 |
| V-1) Traitement des pathologies auto-immunes | 70 |
| V-2) Traitement des pathologies digestives | 70 |
| V-3) Traitement des pathologies respiratoires | 71 |
| V-4) Traitement des pathologies ostéo-articulaires | 71 |
| V-5) Traitement des pathologies cutanéomuqueuses | 72 |
| VI – Production, commercialisation et cadres réglementaires | 74 |
| VII – Conclusion..... | 77 |
| BIBLIOGRAPHIE | 79 |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Arbre et sève de <i>Croton lechleri</i> (Iwanicki, 2017)..... | 13 |
| Figure 2 : Répartition géographique mondiale de l'espèce <i>Croton lechleri</i> (Source : https://natedelicatessen.wordpress.com/tag/croton-lechleri/)..... | 14 |
| Figure 3 : Récolte du sang de dragon par la technique de coulée (Source : « Dračí krev - Croton Lechleri » http://www.jungle-medicine.eu/eshop/zluta-linie/croton-lechleri)..... | 16 |
| Figure 4 : Structure chimique du lignane 3',4-O-diméthylcédrusine (De Marino et al, 2008) | 17 |
| Figure 5 : Epicatéchine | |
| Figure 6 : Catéchine..... | 18 |
| Figure 7 : Gallocatéchine | |
| Figure 8 : Epigallocatechine..... | 18 |
| Figure 9 : Exemple de dimère proanthocyanidique retrouvé dans le latex de <i>C.lechleri</i> (Ester et al, 2001) | 19 |
| Figure 10 : Structure chimique des alcaloïdes isolés chez <i>C.lechleri</i> et voie de biosynthèse probable au sein de la plante (Milanowski et al, 2002) | 20 |
| Figure 11: Diterpènes identifiés dans la sève de <i>C.lechleri</i> (Ester et al, 2001) | 22 |
| Figure 12 : Photographies d'ulcères gastriques traités au sang de dragon (Miller et al. 2000)..... | 27 |
| Figure 13 : Histogramme représentant l'influence du sang de dragon sur les variations de sécrétion épithéliale dans des iléons de cobaye avec différents inducteurs (Miller et al, 2000)..... | 29 |
| Figure 14 : Gel d'électrophorèse représentant l'effet du sang de dragon sur l'expression de divers gènes codant pour des cytokines pro inflammatoires (Miller et al, 2000) | 30 |
| Figure 15 : Structure chimique des métabolites secondaires identifiés dans la sève de <i>C.lechleri</i> (De Marino et al, 2008) | 35 |
| Figure 16 : Diagramme du test de dilution en gélose évaluant l'effet antibiotique de l'extrait éthanolique de <i>C.lechleri</i> (Corrales Ramírez et al, 2013) | 39 |
| Figure 17 : Diagramme du test de dilution en gélose évaluant l'effet antibiotique de l'extrait d'éther (Corrales Ramírez et al, 2013)..... | 40 |
| Figure 18 : Structure chimique du SP303 (Ubillas et al, 1994) | 46 |
| Figure 19 : Effet inhibiteur du latex de <i>Croton lechleri</i> sur des œdèmes induits expérimentalement chez le rat par une injection intrapéritonéale de carraghénine (Risco et al, 2003)..... | 56 |

Figure 20 : Effets du sang du dragon et de la taspine sur les cycles cellulaires de lignées cellulaires cancéreuses issues de mélanome (Montopoli et al, 2012)63

Figure 21 : Structure du 12k, dérivé synthétique de la taspine (Dai et Wang, 2015)64

Figure 22 : Mécanisme d'action du SP303 (McAuliffe et al, 2017).....66

Figure 23 : Flacon de latex de *Croton lechleri* commercialisé par le laboratoire Pierre d'Astier (« LTX 5 - Croton L. Gouttes » s. d.)75

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Principaux usages du sang de dragon en médecine traditionnelle (Taylor, 2005) | 10 |
| Tableau II : Espèces végétales productrices de sang de dragon (Gupta, Bleakley et Gupta, 2008)..... | 12 |
| Tableau III : Evolution moyenne de la cicatrisation des plaies observées durant les 20 jours d'étude (Namjoyan et al, 2016)..... | 25 |
| Tableau IV : Activité antioxydante de différents extraits, fractions et composés obtenus à partir du latex de <i>C. lechleri</i> (De Marino et al, 2008)..... | 37 |
| Tableau V : Concentrations minimales inhibitrices (exprimée en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le premier groupe d'entérobactéries..... | 42 |
| Tableau VI : Concentrations minimales inhibitrices (exprimée en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le deuxième groupe d'entérobactéries | 42 |
| Tableau VII : Concentrations minimales inhibitrices (exprimées en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le troisième groupe d'entérobactéries | 43 |
| Tableau VIII : Concentrations minimales inhibitrices (exprimées en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur les bactéries à Gram négatif autres que les entérobactéries | 43 |
| Tableau IX : Concentrations minimales inhibitrices (exprimées en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le cinquième groupe de bactéries comportant les cocci à gram positif..... | 44 |
| Tableau X : Concentrations minimales inhibitrices (exprimée en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le sixième groupe contenant diverses bactéries et levures | 44 |
| Tableau XI : Liste des modèles animaux et virus utilisés durant l'étude | 48 |
| Tableau XII : Activité antidœdémateuse de l'hydrochloride de taspine (Perdue et al. 1979) | 54 |
| Tableau XIII : Effet inhibiteur de granulation de l'hydrochloride de taspine (Perdue et al, 1979)..... | 55 |
| Tableau XIV : Effets du traitement par la taspine sur l'évolution de croissance de xénogreffes de tissus tumoraux humains de cancer du sein chez des souris (Zhan et Zhang, 2011)..... | 60 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- ATCC : American Type Culture Collection
- Baq : *bcl-2 homologous antagonist killer*
- Bax : *bcl-2-associated X protein*
- Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*
- CaCC : *Calcium-dependant chloride channel*
- Cdk : Cycline dépendante des kinases
- CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
- COX : Cyclo-oxygénase
- Da : Dalton
- DE50 ou ED50 : Dose effective médiane
- DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- FDA : *Food and Drug Administration*
- HBV : Virus de l'Hépatite B
- HIV ; Virus de l'immunodéficience humaine
- HPV : *Human papillomavirus*
- HSV : Herpes Simplex Virus
- IC50 ou CI50 : Concentration inhibitrice médiane
- iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible
- Isc : Courant de court-circuit (*shorted circuit*)

- LD50 ou DL50 : Dose létale médiane
- Mcl-1 : *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*
- MPO : Myéloperoxydase
- MRP : *Multidrug resistance-related proteins*
- MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
- NK-1 : Neurokinine-1
- OMS : Organisation mondiale de la Santé
- PIV : Parainfluenza Virus
- PgP : Glycoprotéine P
- RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase utilisant des fragments d'ADNc obtenus à partir d'ARN par rétrotranscription
- S.d. : Sans date
- TNF : Facteur de nécrose tumorale
- TRAP : *Total radical-trapping antioxidant parameter*
- TRPV1 : *Transient receptor potential vanilloide 1*
- VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
- VRS : Virus respiratoire syncitial
- VS : Vitesse de sédimentation

I – Introduction

Les plantes sont utilisées depuis la nuit des temps en médecine traditionnelle à travers le monde. On recense environ 20 000 espèces végétales utilisées couramment à des fins médicinales, ce qui constitue un vaste réservoir de molécules phytochimiques à étudier au niveau de la recherche pharmaceutique. Avec l'avancée de l'industrie pharmaceutique moderne, les drogues synthétiques ont progressivement remplacé les préparations à base de plantes. En revanche, dans les pays en voie de développement, l'OMS estime que 80% des habitants n'ont pas accès aux produits pharmaceutiques, trop onéreux, et disposent le plus souvent de leurs propres médicaments confectionnés avec des plantes locales (Salatino et al, 2007).

La Pharmacopée amazonienne constitue une source extrêmement riche en matière de phytomédecine. La communauté scientifique en est bien consciente et les travaux de recherches basés sur les utilisations traditionnelles ancestrales se sont multipliés durant ces dernières décennies.

I-1) Qu'est-ce que le sang de dragon ?

Le sang de dragon est le nom donné à la sève de certains arbres d'Amazonie appelés populairement « les Dragonniers ». Elle a la particularité d'être d'une couleur rouge et d'une viscosité rappelant celle du sang. Le genre *Croton* est le plus représenté parmi les espèces productrices de ce latex et l'espèce *Croton lechleri* est à ce jour la plus étudiée. Le latex de *Croton lechleri* est connu en Amérique latine sous le nom de « sangre de drago » ou « sangre de grado ». Il s'agit d'un remède traditionnel de longue date très populaire dans ces pays et il constitue un des piliers de la médecine amazonienne.

I-2) Histoire et Mythologie

L'origine du nom « sang de dragon » n'est pas clairement identifiée. D'après les écrits de la mythologie grecque, « Ladon, le dragon à cent têtes, gardien du jardin des Hespérides, fut tué par Hercule dans sa quête lorsqu'il alla chercher les pommes d'or. Le sang du dragon se répandit sur les terres et exsuda des arbres alors renommés les arbres du dragon » et leur sève « le sang du dragon ».

Le sang de dragon est un nom utilisé pour décrire de nombreuses résines dans la littérature. Les premiers écrits relatant de l'utilisation du sang de dragon sont ceux de l'explorateur et naturaliste espagnol P. Barnabé Cobo dans les années 1600 qui a découvert et étudié l'utilisation de la résine

de *Croton* déjà utilisée en masse par les tribus indigènes du Mexique, du Pérou et de l'Equateur. En réalité, ses premiers usages remonteraient à l'Antiquité où elle était obtenue à partir de l'espèce *Dracaena cinnabari* sur l'île de Socotra au Yémen et les romains lui vouaient alors des vertus magiques (Gupta et al, 2008).

I-3) Usages traditionnels de la résine de *Croton lechleri* en Amazonie

Le sang de dragon est principalement utilisé à des fins thérapeutiques mais on le retrouve également dans les domaines artistiques où il sert d'agent colorant des peintures, laques et vernis ou encore dans des rituels magiques et spiritueux.

Au Pérou et dans les pays d'Amérique latine, la résine de *Croton lechleri* est utilisée pour guérir les blessures. Il s'agit du premier et principal usage référencé. En effet, celle-ci possède des propriétés astringentes et cicatrisantes et agit comme un véritable pansement liquide. Elle était utilisée par les tribus indigènes pour peindre les plaies et ainsi stopper le saignement, sceller, protéger et accélérer la guérison des blessures et prévenir les infections. Elle possède par ailleurs une action hémostatique qui est mise à profit lors des accouchements, un bain vaginal permet d'éviter les hémorragies en post-partum et post-abortum.

En application locale, elle est utilisée pour traiter les hémorroïdes, les troubles trophiques de la peau comme l'eczéma, l'herpès et l'acné et pour soulager les piqûres d'insectes (Taylor, 2005).

Au Pérou, la douche vaginale est pratiquée pour traiter les infections mycosiques et les leucorrhées (Herforth et al, 2001).

En stomatologie, le sang de dragon est utilisé pour son pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire et comme analgésique pour soigner les caries dentaires et les gingivites.

En ingestion par voie orale, elle permet principalement de traiter les diarrhées aqueuses et induites par le choléra ainsi que les ulcères gastriques et les colites ulcéreuses.

Son utilisation inclut également le traitement de diverses infections respiratoires.

Ses vertus anti-inflammatoires sont mises à profit pour soulager divers types de douleurs rhumatismales et certains l'utilisent également en gargarisme pour soulager les maux de gorge.

Le sang de dragon constitue par ailleurs un remède pour le traitement de diverses formes de cancer où il est utilisé de façon empirique (Chen, Cai et Phillipson, 1994).

La sève peut être utilisée pure, mélangée dans de l'eau ou incorporée dans une préparation. Elle est également ingérée en tant que complément alimentaire à des fins toniques et purgatives et pour stimuler les défenses immunitaires (Taylor, 2005).

Il est difficile de déterminer une posologie exacte pour chaque indication. Le nombre de gouttes utilisé est variable d'un écrit à l'autre et ne représente pas une science exacte. Les guérisseurs se basent sur les coutumes et observations ancestrales qui leur sont propres.

Tableau I : Principaux usages du sang de dragon en médecine traditionnelle (Taylor, 2005)

| Principales actions | Actions annexes | Dosage utilisé |
|----------------------------|------------------------|---|
| Action cicatrisante | Action cytotoxique | En externe, la résine est appliquée sur la zone à traiter une à deux fois par jour |
| Action hémostatique | Action antitumorale | En interne : Quelques gouttes sont diluées dans l'eau de boisson et ingérées une ou plusieurs fois par jour |
| Action antimicrobienne | Action antimutagénique | |
| Action antidiarrhéique | | |
| Action anti-inflammatoire | | |

II – Espèces productrices de sang de dragon

Les espèces d'arbres identifiées comme productrices de sang de dragon sont relativement nombreuses et référencées dans le Tableau II.

Parmi ces espèces, la sève de *Croton lechleri* est la plus utilisée en médecine traditionnelle de par la richesse de ses composés actifs et ses activités pharmacologiques nombreuses. Bien que relativement peu connue des phytothérapeutes occidentaux, *Croton lechleri* représente Outre-Atlantique une des plantes majeures de la Pharmacopée amazonienne. Par ailleurs, il est à noter que cette espèce est menacée d'extinction du fait de la popularité grandissante de sa sève (Phillipson, 2007).

Tableau II : Espèces végétales productrices de sang de dragon (Gupta, Bleakley et Gupta, 2008)

| Espèces | Famille botanique | Origine géographique |
|---|--------------------------|--|
| <i>Croton spp</i> | Euphorbiaceae | Zones tropicales et sub-tropicales du monde |
| <i>C. draco</i> <i>C. lechleri</i> <i>C. draconoides</i> <i>C. urucurana</i> <i>C. xalapensis</i> <i>C. gossypifolium</i> <i>C. erythrochilus</i> <i>C. palanostigma</i> | | |
| <i>Daemocorpos spp</i> | Palmaceae | Asie du sud-est |
| <i>D. draco</i> <i>D. didymophylla</i> <i>D. micracantha</i> <i>D. motleyi</i> <i>D. rubra</i> <i>D. propinqua</i> | | |
| <i>Dracaena spp</i> | Dracaenaceae | Socotra (Yemen), îles Canaries, Madère, Afrique de l'Est |
| <i>D. cinnabari</i> <i>D. cochinchinensis</i> <i>D. draco</i> | | |
| <i>Pterocarpus spp</i> | Fabaceae | Inde et Amérique du Sud |
| <i>P. officinalis</i> | | |

II-1) Caractères botaniques de *Croton lechleri*

Croton lechleri est une espèce d'arbre tropical laticifère appartenant à la grande famille botanique des Euphorbiaceae. C'est une espèce monoïque à croissance rapide qui possède un tronc tacheté d'une largeur de 15 à 55 cm de diamètre recouvert d'une écorce lisse. Sa hauteur peut atteindre 3 mètres chez les espèces arbustives et jusqu'à 25 mètres chez les espèces arborescentes majoritairement rencontrées. Il possède un aspect caractéristique en forme de cône cylindrique. Son branchage est désordonné et évolue le plus souvent par bifurcation sympodiale et ses branches sont recouvertes de poils étoilés. Les feuilles sont d'un vert éclatant, cordiformes, d'abord tomenteuses puis devenant glabrescentes avec le temps. Elles dégagent une odeur forte caractéristique à la pression. Les pétioles possèdent des stipules rigides à leur base. On retrouve de longues inflorescences blanches bisexuées avec un pistil tricarpellé. Les fleurs donnent quant à elles des fruits de type schizocarpes qui s'ouvrent à maturité en libérant 3 graines. Ce fruit est consommé par certaines espèces d'oiseaux ce qui contribue en partie à la dissémination de l'espèce (Ester et al, 2001).



Figure 1 : Arbre et sève de *Croton lechleri* (Iwanicki, 2017)

II-2) Biologie et habitat

L'espèce *Croton lechleri* se développe dans un biotope bien spécifique. On la retrouve exclusivement dans les régions forestières d'Amérique latine et centrale, dans des pays tels que la Bolivie, le Pérou, le Brésil, la Colombie ou l'Equateur. C'est une espèce pérenne que l'on retrouve tout au long de l'année à des altitudes variant de 100 à 1800 mètres et à des températures comprises entre 18 et 30°C. Elle nécessite un bon ensoleillement pour un développement optimal ainsi qu'une pluviométrie annuelle de 2000 à 4000 mm. Sa durée de vie varie de 5 à 20 ans. La couleur et la consistance du latex exsudé varient selon l'âge de l'arbre et la quantité d'eau reçue, brun-rouge et fluide chez les espèces jeunes et devenant plus sombre et plus visqueux avec le temps. Le *Croton* se développe dans des sols bien aérés, sableux ou argileux, non inondés mais légèrement humide, à un pH proche de 5 comme par exemple sur des rives sablonneuses à proximité de cours d'eau. Ces conditions favorisent également le développement des mycorhizes souvent associés au *Croton* et pouvant jouer un rôle dans la synthèse de certains composés chimiques retrouvés dans le latex (Alexiades, 2002).



Figure 2 : Répartition géographique mondiale de l'espèce *Croton lechleri* (Source : <https://natedelicatessen.wordpress.com/tag/croton-lechleri/>)

II-3) Récolte du latex

On estime que la récolte du latex de *Croton lechleri* peut s'effectuer lorsque l'arbre est âgé d'au moins 8 ans afin que le ratio entre les différents principes actifs soit optimal soit lorsque le diamètre de l'arbre avoisine les 30 cm. Il existe 2 méthodes d'obtention du latex. La première, par coulée, en incisant l'écorce de l'arbre et en récoltant directement le flux qui s'écoule. Cette méthode est la moins efficace et offre un rendement assez faible, elle permet de récolter sur un arbre adulte environ 300 mL soit environ 12 % du latex contenu dans l'arbre.

La deuxième méthode est l'abattage qui permet de récolter environ 80 % du latex contenu dans l'arbre soit un rendement bien supérieur et une quantité de latex pouvant varier de 2 à 5 litres suivant la taille de l'arbre et ses conditions de vie (terrain, ensoleillement, pluie). Les arbres se situant dans des espaces ouverts exposés à un fort ensoleillement et se développant sur des terrains secs ont souvent peu de latex contrairement à ceux se développant dans une végétation dense et humide.

Le fait d'effectuer des récoltes successives par coulée sur le même arbre n'est pas plus intéressant que l'abattage car le rendement est de plus en plus faible à chaque récolte étant donné que l'on endommage les tissus producteurs du latex qui sont incapables de se régénérer par eux-mêmes. De plus, l'arbre s'affaiblit et s'expose à diverses maladies et infections fongiques et ne survit généralement pas plus d'un an.

La méthode de récolte par coulée est donc utilisable par la population locale ou les shamans lorsqu'elle nécessite de faibles quantités de latex et que l'endommagement de l'arbre reste limité. Lorsque de plus gros rendements sont nécessaires, par exemple pour la commercialisation, ce sera toujours l'abattage qui sera choisi. Il y a également une influence du moment choisi pour la récolte, en fonction des jours et des saisons. Certaines croyances locales racontent que les récoltes s'effectuent en fonction des cycles lunaires, au moment des pleines lunes. Le moment le plus propice pour la récolte étant le matin lorsque la température est encore basse et idéalement le lendemain d'un jour de pluie pour obtenir les meilleurs flux. Les récoltes sont à éviter en pleine saison sèche et lorsqu'il fait très chaud du fait du tarissement de l'arbre (Alexiades, 2002).

La quantité de latex contenue dans l'arbre est proportionnelle au diamètre du tronc. Les périodes optimales pour la récolte du latex sont les mois de mars, mai, septembre et décembre durant lesquels la pluviométrie est la plus importante. Par ailleurs, le latex peut se présenter sous diverses formes organoleptiques : rouge sang, rouge vin ou ocre (Castillo-Quiliano et Domínguez-Torrejón, 2010).



Figure 3 : Récolte du sang de dragon par la technique de coulée (Source : « Dračí krev - Croton Lechleri » <http://www.jungle-medicine.eu/eshop/zluta-linie/croton-lechleri>)

III - Constituants chimiques identifiés dans le latex de *Croton lechleri*

La sève de *Croton lechleri* est un vaste réservoir de molécules. La caractérisation phytochimique du latex a débuté dans les années 1980. Les composés retrouvés majoritairement sont des polyphénols. On retrouve également des diterpènes ainsi que des phytostérols. Parmi les composés minoritaires, on distingue deux classes de molécules particulièrement actives pharmacologiquement, les alcaloïdes et les lignanes.

III-1) Les polyphénols

Les polyphénols représentent une vaste famille de composés aromatiques. Ils se caractérisent par la présence d'au moins deux groupements phénoliques. Les dérivés du phénol sont extrêmement nombreux. Ils sont couramment retrouvés chez les végétaux et notamment dans les essences végétales.

Une sous-famille de composés phénoliques, les lignanes, sont également retrouvés chez de nombreuses espèces végétales. Ce sont des métabolites secondaires dont le rôle métabolique n'est pas clairement connu. Certains lignanes ont démontré des propriétés antioxydantes et antibactériennes ce qui laisse à penser qu'ils auraient un rôle dans les mécanismes de protection et de défense des végétaux.

En médecine, des lignanes sont retrouvés dans certains médicaments comme la podophyllotoxine, aux propriétés anti-mitotiques, utilisée pour la formulation de l'étoposide.

Dans la sève de *Croton lechleri*, un lignane isolé et ayant fait l'objet de plusieurs études est le 3',4-O-diméthylcédrusine (Figure 4).

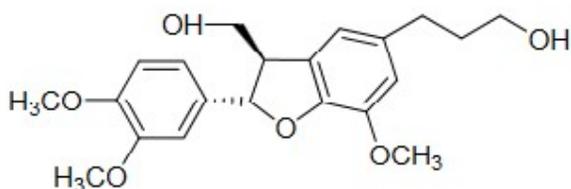


Figure 4 : Structure chimique du lignane 3',4-O-diméthylcédrusine (De Marino et al, 2008)

Les proanthocyanidines ou tanins condensés représentent une sous-famille de polyphénols. Ce

sont les composés chimiques retrouvés majoritairement dans le sang de dragon. Ils sont formés à partir de monomères de catéchines ou flavan-3-ols ou de polymères bordés de glucose, d'acide ellagique ou d'acide gallique. On retrouve des proanthocyanidines de poids moléculaire très varié du fait des différents degrés de polymérisation que peuvent prendre ces molécules. Il s'agit de la famille chimique la plus représentée au sein du latex et on estime que l'ensemble de cette classe représente 90 % de son poids sec. Les composés identifiés dans le latex sont l'épicatéchine (Figure 5), la catéchine (Figure 6), la gallocatéchine (Figure 7) et l'épigallocatéchine (Figure 8). On retrouve également des oligomères hétérogènes (Figure 9) allant des dimères aux heptamères formés par la polymérisation de ces monomères via des liaisons (4- α →8) et (4- α →6) (Cai, Chen et Phillipson, 1993).

Un oligomère proanthocyanidique isolé du latex de *Croton lechleri* a donné lieu à de nombreuses études et publications scientifiques pour ses propriétés antivirales et antidiarrhéiques. Il a été baptisé SP303 et constitue à ce jour le principe actif de plusieurs médicaments développés sur le territoire américain (Cai et al, 1991).

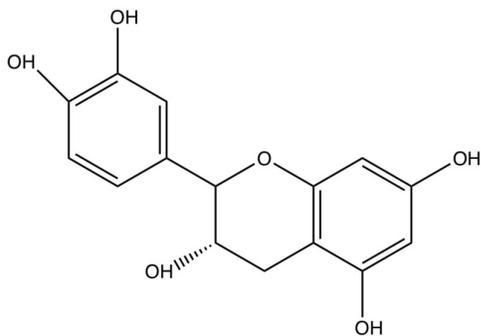


Figure 5 : Epicatéchine

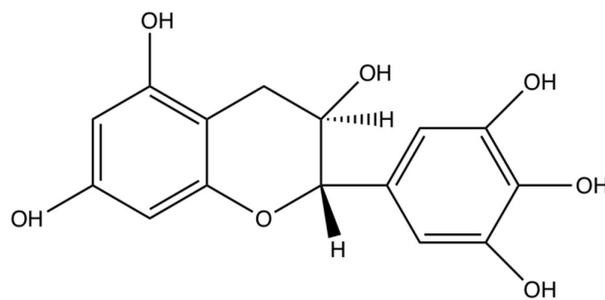


Figure 6 : Catéchine

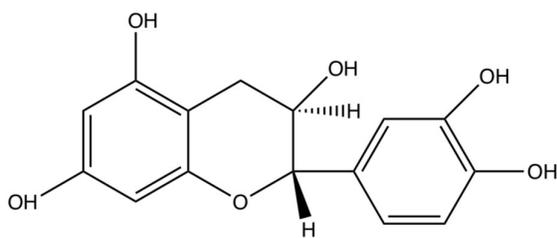


Figure 7 : Gallocatéchine

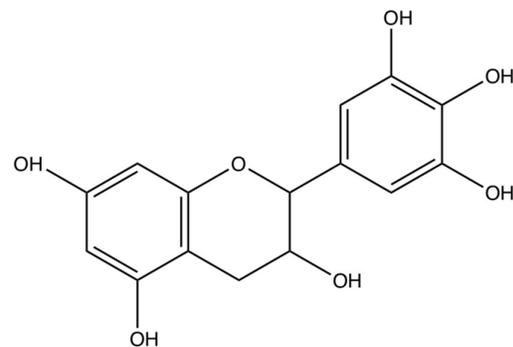
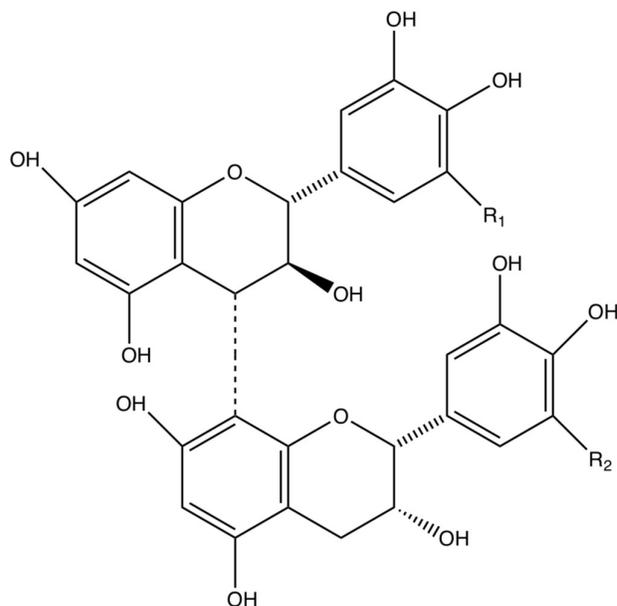


Figure 8 : Epigallocatéchine



R1=R2=H : Catéchine-(4,-8)-épicatechine

R1=R2=OH : Catéchine-(4,-8)-épigallocatechine

R1=OH et R2=H : Gallocatechine-(4,-8)-épicatechine

Figure 9 : Exemple de dimère proanthocyanidique retrouvé dans le latex de *C.lechleri* (Ester et al, 2001)

III-2) Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent une vaste famille de molécules organiques très diverses de par leurs structures complexes et leurs activités biologiques variées. Ces activités ont suscité très tôt l'intérêt de l'industrie pharmaceutique au niveau de la recherche et du développement de nouveaux médicaments. Ils sont à l'origine même du médicament et occupent une place principale dans les débuts de l'industrie avec des médicaments utilisés couramment comme la morphine, l'atropine, la quinine, la réserpine, la vinblastine, la colchicine et bien d'autres. Ils représentent également le principe actif de la plupart des plantes utilisées en médecine traditionnelle. Cependant, ces molécules ont la particularité de présenter une toxicité importante.

Les alcaloïdes sont relativement rares chez les Euphorbiaceae. Chez le genre *Croton*, les alcaloïdes retrouvés sont principalement de type phénantréniques comme les morphinandiénonnes ainsi que les alcaloïdes de type isoquinoléïques.

Les alcaloïdes identifiés chez *Croton lechleri* sont la glaucine, la thaliporphine, l'isoboldine la

norisoboldine, la magnoflorine, la corytubérine et la taspine. Tous ces alcaloïdes dérivent d'un alcaloïde unique, la réticuline (Figure 10). La taspine est le seul alcaloïde retrouvé dans la sève de *Croton lechleri* lorsque l'arbre arrive à maturité, les autres alcaloïdes sont uniquement présents dans les feuilles et retrouvés à l'état de trace dans la sève des jeunes arbres de moins de 1 an. L'analyse d'échantillons de latex de diverses provenances a permis d'établir 3 chémotypes distincts. Dans chacun d'eux, la concentration moyenne en taspine représente environ 9% du poids sec du latex avec des variations allant de 1,3% à 20,4% qui ne semblent pas avoir de lien avec le lieu de récolte ou le type de chémotype. La taspine est un alcaloïde à structure dilactone qui est à ce jour la molécule du sang de dragon la plus étudiée d'un point de vue pharmacologique (Milanowski et al, 2002).

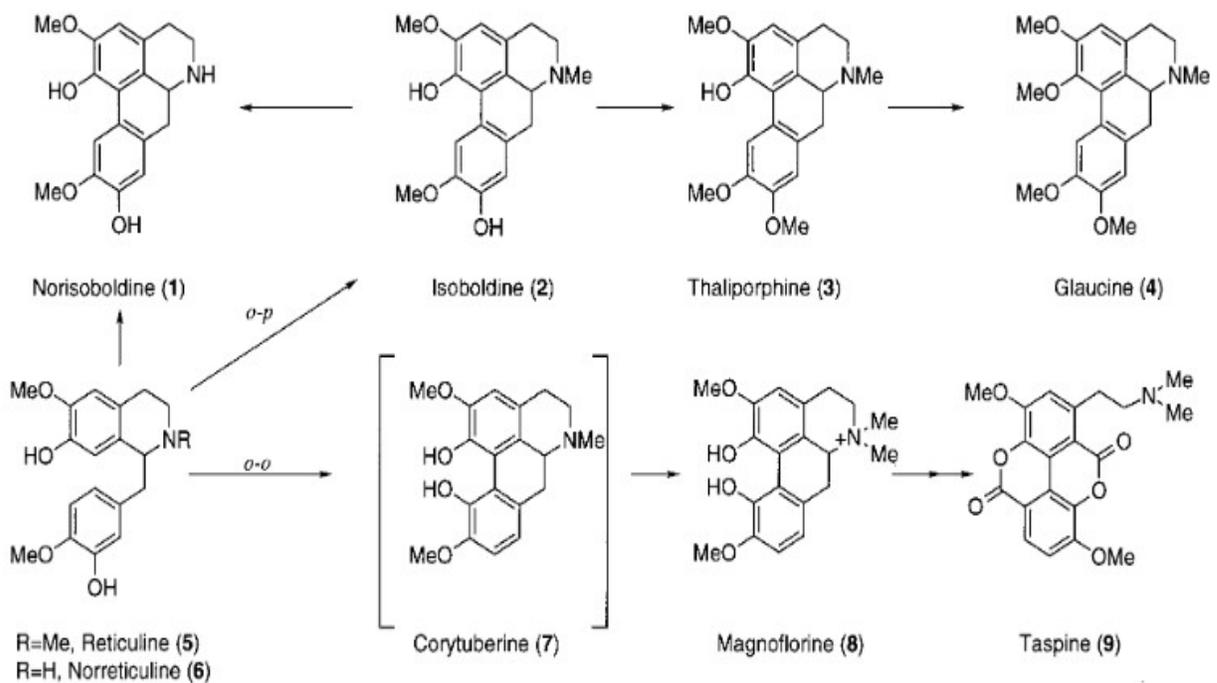


Figure 10 : Structure chimique des alcaloïdes isolés chez *C.lechleri* et voie de biosynthèse probable au sein de la plante (Milanowski et al, 2002)

III-3) Les terpènes

Les terpènes représentent une vaste famille de composés chimiques, ce sont les métabolites secondaires les plus largement retrouvés chez le genre *Croton* bien que minoritaires chez *C.lechleri*. Il existe les terpènes à proprement parlé qui sont des hydrocarbures formés à partir de l'isoprène et les dérivés terpéniques qui ont la même structure de base sur laquelle viennent se

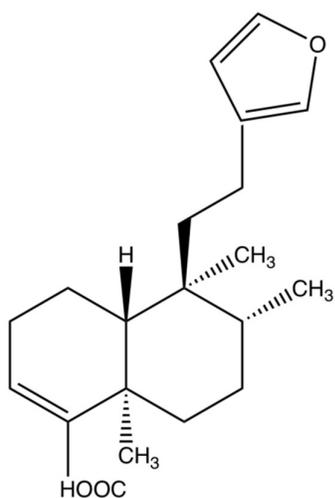
greffer diverses fonctions chimiques. (alcools, aldéhydes, acides,..)

Les terpènes sont responsables de toutes les senteurs chez les végétaux et certains ont également un rôle biologique important et possèdent notamment des activités antimicrobiennes ou anti-inflammatoires jouant un rôle dans l'autodéfense de la plante.

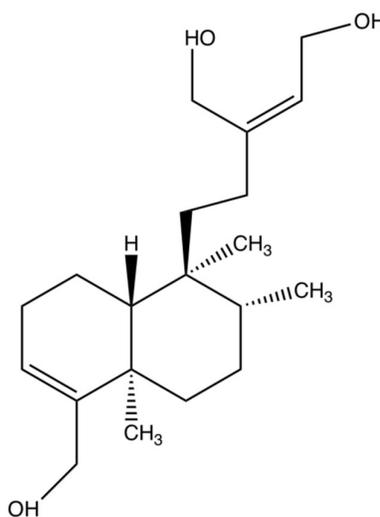
Parmi les différents types de squelettes chimiques existant chez les diterpènes, le genre clérodane et les esters de phorbol sont les 2 plus représentés chez le *Croton* (Salatino et al, 2007).

Quatre diterpènes ont été identifiés dans le latex de *Croton lechleri*, il s'agit de l'acide hardwickiique et de l'acide crolechinique que l'on retrouve dans l'écorce et dans le latex, du bincatriol et du crolechinol (Cai, Chen et Phillipson, 1993).

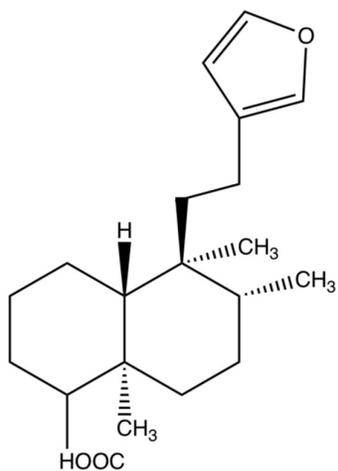
Une étude approfondie a permis d'identifier deux nouveaux diterpènes isolés pour la première fois, l'analyse par RMN a révélé qu'il s'agissait de deux diterpènes lactones au squelette clérodane nommés Korberine A et Korberine B. (Figure11) Par ailleurs, trois stéroïdes ont également été identifiés : le sitosterol, le sitosterol- β -D-glucopyranoside ainsi que le β -sitostenone (Cai, Chen et Phillipson, 1993).



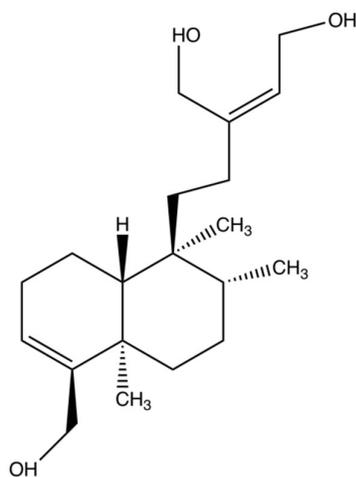
Acide hardwickiique



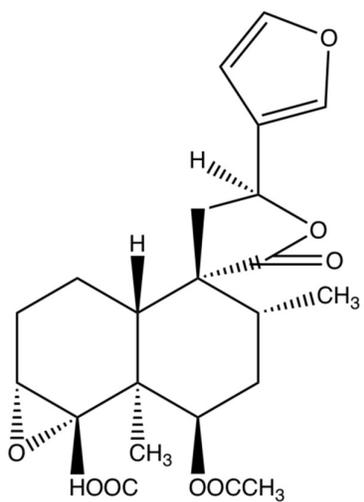
Bincatriol



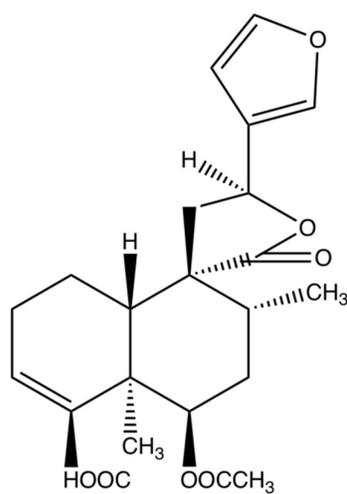
Acide crolechinique



Crolechinol



Korberine A



Korberine B

Figure 11: Diterpènes identifiés dans la sève de *C.lechleri* (Ester et al, 2001)

IV – Etudes des activités pharmacologiques de la sève de *Croton lechleri* et de ses composés isolés

La majorité des travaux de recherches et des publications scientifiques traitant de la sève de *Croton lechleri* ont été réalisés dans le but de rechercher des activités pharmacologiques *in vivo* ou *in vitro*. La plupart des activités biologiques du sang de dragon sont connues de par les usages traditionnels. Les études cliniques et expérimentales réalisées ont permis de rationaliser les différentes hypothèses apportées par ces utilisations traditionnelles. Le but de ces différents travaux étant dans un premier temps de vérifier les activités expérimentalement, d'en comprendre les mécanismes d'action et d'évaluer sa sécurité d'emploi. L'identification des actifs étant souvent complexe, des composés isolés ont également été testés et les concentrations efficaces et toxiques recherchées.

Dans la majorité des études, la sève de *Croton lechleri* utilisée provient du Pérou. Les laboratoires disposent le plus souvent du latex sous une forme de lyophilisat qui est par la suite reconstitué extemporanément par dilution dans de l'eau distillée. La sève peut alors être étudiée sous sa forme brute ou à partir d'extraits méthanoliques.

IV-1) Activité cicatrisante

L'utilisation du sang de dragon comme composé cicatrisant représente le premier et principal usage du latex en médecine traditionnelle depuis des siècles.

La cicatrisation est un phénomène biologique complexe qui se déroule en plusieurs étapes et faisant intervenir divers mécanismes cellulaires et moléculaires. Elle se divise en 3 grandes phases avec en premier lieu une inflammation locale causée par la migration de globules blancs au niveau du site de la plaie. On y retrouve diverses cellules sanguines telles que des polynucléaires neutrophiles et des monocytes assurant la détertion des microorganismes et déchets cellulaires par phagocytose et stimulant le début de la phase de régénération par libération de facteurs de croissance. Il s'ensuit l'étape de bourgeonnement, enclenchée par un afflux de fibroblastes permettant le renouvellement de la matrice et la formation de collagène et enfin une phase de maturation également appelée remodelage.

La première étude traitant de l'activité cicatrisante du sang du dragon a été réalisée en Belgique en 1995 par L.Pieters, T. De Bruyne et collaborateurs. L'équipe s'est intéressée au potentiel cicatrisant du sang de dragon brut ainsi que de divers constituants isolés. L'étude expérimentale

réalisée *in vivo* sur des rats a comparé l'activité cicatrisante de l'alcaloïde taspine, du lignane 3',4-O-dimethylcedrusine ainsi que de diverses proanthocyanidines. Appliquée brute, la sève a permis d'induire une contraction de la plaie, un phénomène physiologique permettant le rapprochement des berges. Elle a également engendré la formation d'une croûte en seulement 24 heures contre 5 jours pour les composés isolés. Cette différence s'explique par la forte teneur en proanthocyanidines du latex induisant une précipitation avec les protéines tissulaires pour former une croûte. La sève de *Croton* a par ailleurs facilité divers processus de régénération tissulaire comme la néoformation de collagène ainsi que la régénération de la couche épithéliale.

Le lignane 3',4-O-dimethylcedrusine a quant à lui démontré une stimulation de la formation de fibroblastes et de collagène. Le latex brut a globalement montré une meilleure efficacité que les composés isolés avec une cicatrisation de 95% sans laisser de cicatrices à la fin de l'expérience. Le délai de cicatrisation est quant à lui plus lent que les composés isolés du fait du ralentissement de la formation de fibroblastes par les proanthocyanidines (Pieters et De Bruyne, 1995).

La substance considérée comme la plus importante dans l'activité cicatrisante est la taspine. Dans ce cadre, des études plus approfondies ont été réalisées en 2006 dans l'étude de Marzia Foddai, Marianna Usai et collaborateurs. L'action réparatrice de la taspine a été observée *in vitro* sur de la peau humaine brûlée. L'expérience sur peau saine a permis d'observer une infiltration de cellules lymphocytaires au niveau du derme. La mise en culture d'un fragment de peau brûlée avec du sang de dragon a mis en évidence un remodelage du derme par activation des papilles dermiques avec un effet dose-réponse invariable (Foddai et al, 2006).

Dans une étude réalisée en 2015, Guillermo José Gallardo Vasquez et collaborateurs ont testé des gels cicatrisants à base d'extraits de sang du dragon à diverses concentrations sur des modèles murins ainsi que des gels à base de taspine et de 3'-4-O-diméthylcedrusine et il a été déterminé qu'un gel concentré à 2% en extrait brut fournissait une efficacité optimale, avec une action cicatrisante 4 fois supérieure aux composés isolés. L'étude a également mis en évidence la capacité de la taspine à stimuler par chimiotaxie les fibroblastes de manière dose-dépendante (Vásquez et al, 2015).

L'alcaloïde prépondérant du sang du dragon, la taspine, possède une activité anti-inflammatoire reconnue (Perdue et al, 1979). Le sang de dragon permet d'accélérer le processus de cicatrisation en réduisant la durée de la phase inflammatoire.

Une étude clinique menée en Iran par l'Université des Sciences médicales d'Ahvaz jundishapur en octobre 2010 a évalué l'effet cicatrisant d'une crème à base d'extrait éthanolique de sève de

Croton lechleri (15%) sur un échantillon de 60 patients du service de médecine dermatologique de l'hôpital Imam Khomeni. La crème a été testée versus placebo sur des plaies réalisées expérimentalement par cautérisation afin d'obtenir une homogénéité de taille. Chaque patient a reçu comme consigne d'en appliquer deux fois par jour pendant 20 jours et l'évolution de la cicatrisation a été constaté en mesurant la surface des plaies. (Tableau III)

Tableau III : Evolution moyenne de la cicatrisation des plaies observées durant les 20 jours d'étude (Namjoyan et al, 2016).

| | Jour 3 | Jour 5 | Jour 7 | Jour 10 | Jour 14 |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Crème à base de sang du dragon | 31,06 % | 63,77 % | 77,80 % | 89,14 % | 95,73 % |
| Placebo | 4,74 % | 23,50 % | 43,90 % | 61,96 % | 78,10 % |

La surface des plaies a été mesurée et une valeur de 100% lui a été attribuée. Les pourcentages dans le tableau III indiquent l'avancement de la cicatrisation, une valeur de 100% témoignant d'une cicatrisation totale.

L'étude a globalement montré que la crème à base de sang de dragon permettait de réduire la durée de cicatrisation des plaies. Cette différence est visible dès le troisième jour avec un pourcentage de cicatrisation moyen de 31,06 % contre 4,74 % pour le groupe placebo. Les composés polyphénoliques du latex jouent également un rôle dans la création d'une barrière protectrice au niveau de la plaie. De plus, des études ont démontré le pouvoir antibactérien de la sève de *Croton lechleri* (Roumy et al, 2015) ce qui réduit d'autant plus le risque d'infection et facilite la cicatrisation.

Un autre facteur essentiel du processus de cicatrisation est la vasoconstriction. Le latex de *Croton lechleri* possède un effet vasoconstricteur sur les artères (Froldi et Zagotto, 2009). De la même manière que dans l'étude de Pieters, De Bruyne et collaborateurs, il a été observé que les composés polyphénoliques, en se fixant aux diverses protéines tissulaires, permettent de refermer la plaie plus rapidement et de stimuler la réépithélisation. La migration des fibroblastes induite par la taspine permet également de favoriser la reconstruction de la matrice cellulaire, la formation de collagène et l'angiogénèse.

La crème à base de sang de dragon a démontré de bons résultats sur la guérison des plaies et une bonne tolérance, ce qui en fait un produit intéressant et efficace à ajouter à l'arsenal thérapeutique. Des études doivent encore être menées pour évaluer son potentiel sur des plaies

plus complexes à soigner telles que les escarres, les ulcères ou les brûlures (Namjoyan et al, 2016).

En 2015, une équipe de chercheurs brésiliens a testé une pommade à base d'extraits de *Croton lechleri* sur des ulcères chroniques des membres inférieurs chez des patients diabétiques. Les ulcères des membres inférieurs représentent une des complications du diabète et imposent des hospitalisations de longue durée et un traitement coûteux.

Quatre patients ont reçu une application quotidienne de pommade pendant 3 mois. Ces patients présentaient des lésions avancées avec un échec des traitements antérieurs. Ils présentaient également des facteurs aggravants : obésité, polymédication, infection locale.

A la suite du traitement, une réduction de la taille moyenne des ulcères à hauteur de 19,5% a été constatée, un résultat insuffisant. Par ailleurs, aucune action antibactérienne n'a été observée du fait de la trop faible concentration en actifs antibactériens dans une pommade à 10%. Les résultats sont tout de même encourageants et des études supplémentaires doivent être menées notamment au niveau de la formulation des pommades (Silva, 2016).

En 2016, le potentiel de cicatrisation cutanée et la toxicité aiguë de la sève de *Croton lechleri* ont été évalués *in vivo* chez le rat dans l'étude Diego Omar Cevallos-Verdesoto et collaborateurs. L'analyse histopathologique pendant les 7 jours suivant une application locale du latex sur une incision de l'épiderme a démontré des signes de réparation cutanée deux fois plus rapide que les plaies non traitées qui présentent par ailleurs des abcès et une inflammation importante. Il a également été observé que le caractère acide du latex lui conférait une activité bactériostatique locale empêchant ainsi la prolifération bactérienne. Les observations faites sont similaires à celles de l'étude de Namjoyan et al. (2016) quant à l'action synergique des composés du latex apportant à la fois un effet anti-inflammatoire local et accélérateur de réparation épidermique par stimulation de la formation de fibroblastes.

L'étude de toxicité locale aiguë à des doses de 2000 mg/kg n'a pas engendré de décès chez le rat ou de signes de toxicité notables, ce qui est rassurant quant à la sécurité d'utilisation du sang de dragon en application cutanée (Cevallos-Verdesoto et al, 2016).

Dans l'ensemble des travaux d'étude réalisés, les conclusions sont unanimes. La sève de *Croton lechleri* possède des propriétés cicatrisantes extrêmement efficaces si elle est bien tolérée. Elle permet de faciliter et d'accélérer toutes les étapes du processus de cicatrisation en agissant sur la composante inflammatoire et en stimulant la prolifération et la migration de divers facteurs de cicatrisation. Elle regroupe en un seul produit les bénéfices apportés par un produit antiseptique, un pansement et une crème réparatrice.

IV-2) Activités gastroprotectrice et anti-ulcéreuse

Le sang de dragon est utilisé en médecine amazonienne pour soulager les gastrites et favoriser la cicatrisation des ulcères gastriques où il est administré par voie orale en diluant quelques gouttes dans l'eau de boisson. Les ulcères et cancers gastriques sont répandus en Amérique du sud du fait de la forte incidence d'*Helicobacter Pylori* dans cette région du globe (Miller et al, 2000).

IV-2-1) Etudes de l'effet cicatrisant sur des ulcères induits expérimentalement

Les recherches concernant l'activité anti-ulcéreuse ont débuté dans les années 2000. La plus vaste étude à ce sujet est celle de Mark Miller et collaborateurs en 1999. Dans cette étude, la résine de *Croton lechleri* a été administrée dans l'eau de boisson de rats sur lesquels des ulcères ont été induits. Elle a été testée en utilisant des dilutions de 1:1000 à 1:10000 pour des doses thérapeutiques comprises entre 60 et 600 µg par jour.

A la suite des 7 jours de traitement, les tissus gastriques ont été prélevés afin d'évaluer la taille des ulcères, leur morphologie (Figure 12) et d'étudier l'effet du sang de dragon sur différents paramètres : l'expression des gènes pro-inflammatoires (Figure 14), la teneur en bactéries dans le lit de l'ulcère et l'activité myéloperoxydase.

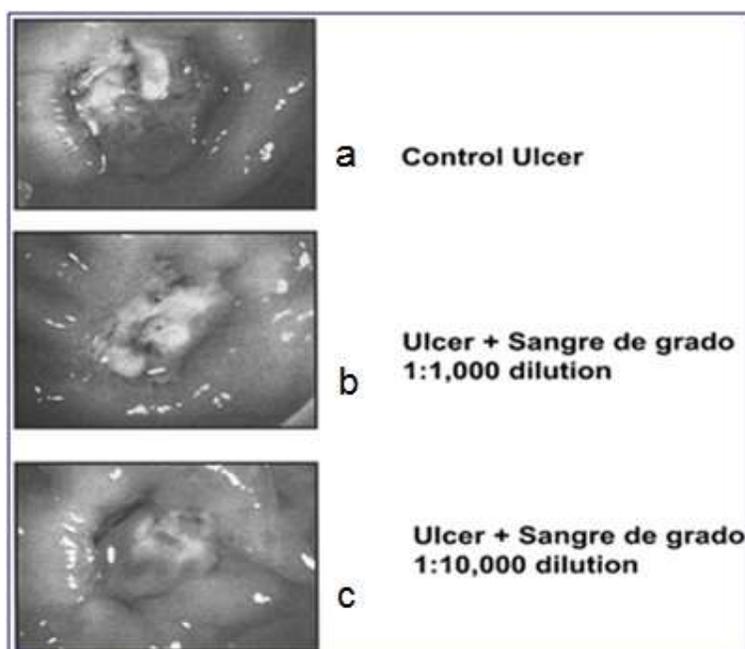


Figure 12 : Photographies d'ulcères gastriques traités au sang de dragon (Miller et al. 2000)

La figure 12a montre distinctement la morphologie d'un ulcère non traité, rond et clair. On y voit des débris cellulaires et un épithélium nécrosé.

Les figures 12b et 12c montrent la morphologie des ulcères traités aux dilutions 1:1000 et 1:10 000. Sur ces photos, on remarque que les zones d'ulcérations sont toujours présentes mais que les ulcères sont plus petits et les tissus en cours de cicatrisation, la muqueuse est également moins inflammée.

Les ulcères traités à des dilutions 1:1000 et 1:10000 sont de taille réduite par rapport au témoin non traité, la guérison étant comparable à celle observée par un traitement conjoint de streptomycine et pénicilline.

Les ulcères non traités possèdent également un nombre plus important de bactéries que ceux traités ce qui confirme le pouvoir bactéricide du latex sur les germes impliqués dans l'étiologie ulcéreuse.

Par ailleurs, les taux de myéloperoxydase, un marqueur inflammatoire témoignant de la teneur en granulocytes, sont considérablement réduits comparativement au témoin négatif d'où cette inflammation réduite des tissus.

Un autre paramètre ayant été étudié est la sécrétion épithéliale, consistant à analyser les transports ioniques s'effectuant au sein de l'épithélium d'un iléon de cobaye afin d'observer l'impact du sang de dragon sur la sécrétion d'ions chlorure après une stimulation par de la capsaïcine. Le but est de déterminer si le sang de dragon agit au niveau des nerfs afférents sensoriels.

Les transports ioniques sont observés après émission d'un courant court-circuit en mesurant la différence de potentiel électrique à travers les tissus. Une expérience parallèle a été réalisée avec le même mode opératoire en remplaçant la capsaïcine par un agoniste des récepteurs NK-1, le Sar-Met-Substance P. Cet agoniste spécifique des récepteurs NK-1 stimule la sécrétion d'ions chlorures. La capsaïcine active ces mêmes récepteurs par l'intermédiaire d'une libération de substance P.

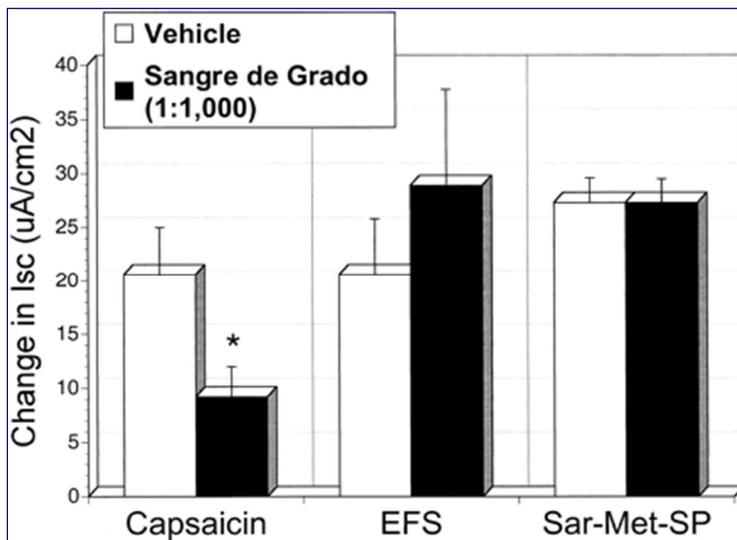


Figure 13 : Histogramme représentant l'influence du sang de dragon sur les variations de sécrétion épithéliale dans des iléons de cobaye avec différents inducteurs (Miller et al, 2000)

La sécrétion épithéliale a été induite par 3 stimuli : la capsaïcine, la stimulation par champ électrique (EFS) ainsi que l'agoniste des récepteurs NK-1 (Sar-Met-SP).

On observe que l'exposition à la capsaïcine a immédiatement engendrée une augmentation de l'Isc significatif d'une sécrétion d'ions chlorures. Les expériences parallèles utilisant les agonistes NK-1 et l'EFS ont produit les mêmes changements d'Isc que la capsaïcine. En revanche, le traitement par le sang de dragon dans l'extrait stimulé par la capsaïcine a engendré une diminution de 70 % de l'Isc donc une diminution de la réponse sécrétoire alors que pour les agonistes NK-1 aucun changement n'a été remarqué après traitement au sang de dragon.

Cette expérience a démontré que la réponse épithéliale à la capsaïcine fait intervenir une libération de substance P par stimulation des neurones afférents sensoriels et dans un second temps une activation des récepteurs NK-1 par la substance P induit la libération d'ions chlorure. Comme le sang de dragon n'a pas atténué la réponse sécrétoire induite par les agonistes directs NK-1, il n'agit donc pas sur les neurotransmetteurs ou les récepteurs cellulaires mais par un effet de blocage des afférences sensorielles qui empêche la libération de Substance P.

L'inhibition de l'expression de divers gènes pro-inflammatoires a été étudié à partir extraits de tissus stomacaux par RT-PCR.

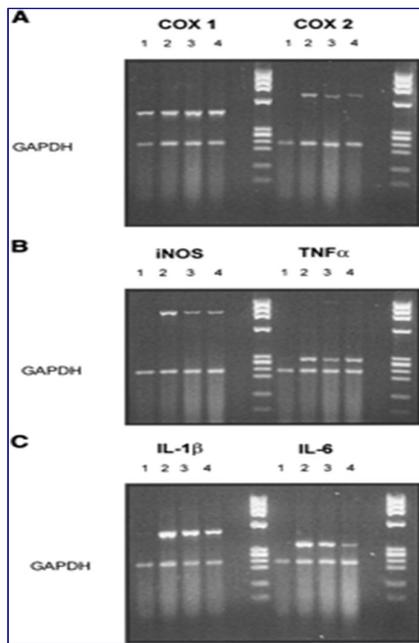


Figure 14 : Gel d'électrophorèse représentant l'effet du sang de dragon sur l'expression de divers gènes codant pour des cytokines pro inflammatoires (Miller et al, 2000)

La bande 1 correspond au rat naïf sans ulcère, on remarque que seule la COX-1 est exprimée ce qui est un phénomène physiologique normal. Les autres gènes y sont absents.

La bande 2 représente un ulcère non traité. L'expression de COX-1 est restée identique. On observe également l'expression des gènes pro-inflammatoires (COX-2, iNOS, TNF-alpha, IL-1 et IL-6)

La bande 3 correspond à un ulcère traité par sang de dragon à la dilution 1:1000. On y observe l'expression de tous les gènes pro-inflammatoires. L'expression a été largement réduite pour iNOS et IL-6 et en partie réduite pour COX-2, TNF-α et IL-1B.

La bande 4 provient d'un ulcère traité au sang de dragon à la dilution 1:10000. Cette bande est relativement similaire à la bande 3, avec une expression un peu plus importante de TNF-α et moindre pour l'IL-6.

La COX-1 est le seul produit de PCR retrouvé dans tous les estomacs. Son expression n'a pas été affectée par l'induction d'ulcère et est restée stable après traitement au sang de dragon. Les autres facteurs inflammatoires sont absents chez les rats normaux et apparaissent après induction des ulcères puis sont réduits après traitement. On peut conclure de ce test que le sang de dragon supprime l'activation de ces gènes. On peut également supposer que cette suppression est due à une diminution de la concentration bactérienne dans le lit de l'ulcère qui réduit les signaux d'activation et de transcription des gènes pro-inflammatoires. D'autres mécanismes encore mal connus sont certainement impliqués (Miller et al, 2000).

En 2014, une étude a comparé un extrait de sève de *Croton lechleri* à la ranitidine. Comme précédemment, des ulcères ont été induits par action de l'éthanol sur des modèles murins. Le traitement a été suivi durant 3 jours à des doses de 200 à 400 mg/kg et l'évaluation microscopique et macroscopique n'a pas montré de réduction significative des lésions ulcéreuses avec une réduction moyenne de 20,21% à 31,26% contre 61,17% pour la ranitidine. L'équipe de recherche en a conclu que l'extrait de *Croton lechleri* présentait un effet gastroprotecteur léger mais insuffisant.

Il a tout de même été observé que l'extrait stimulait la production de mucus afin de créer un film protecteur vis-à-vis de l'agression de l'éthanol. Un autre point intéressant est l'observation de lésions hémorragiques sévères et de nécroses profondes au niveau des couches de la muqueuse gastrique dans le groupe témoin et l'absence de ces symptômes dans les groupes recevant l'extrait de sang de dragon. L'hypothèse faite est que le sang de dragon posséderait une action vasodilatatrice locale permettant une perfusion sanguine adéquate évitant la formation d'érosions hémorragiques et que son activité antioxydante (Desmarchelier et al, 1997) réduirait la peroxydation lipidique des membranes induite par les radicaux libres. Il a également permis d'augmenter localement la production de prostaglandines (PGE2) connues comme inhibitrices de la production d'acide chlorhydrique (Llontop et Quevedo, 2014).

L'effet gastroprotecteur de l'extrait de *Croton lechleri* est certes bien moindre que celui d'un inhibiteur de la pompe à protons tel que la ranitidine mais l'effet n'est pas nul et les résultats méritent des investigations supplémentaires pour déterminer s'il pourrait apporter un bénéfice chez l'homme. Il semble s'agir d'un effet synergique de diverses molécules du latex apportant à la fois une action anti-inflammatoire, antibactérienne et antioxydante et facilitant la création d'un environnement propice à la protection et à la cicatrisation des muqueuses.

IV-2-2) Evaluation du potentiel bactéricide vis-à-vis de *Helicobacter pylori*

En 2003, l'activité antibactérienne du sang de dragon vis-à-vis d' *Helicobacter pylori* a été évaluée dans une étude expérimentale réalisée par Tamariz Ortiz et collaborateurs. au Pérou. L'équipe de recherche a testé un lot de 41 souches d' *Helicobacter pylori* isolées à partir de biopsies gastriques. Le sang de dragon étudié provient quant à lui de 4 sources d'approvisionnement différentes afin de comparer les activités.

Helicobacter pylori est connu comme agent pathogène à l'origine de gastrites, d'ulcères gastriques et même de cancers gastriques et responsable de complications et récurrences en l'absence de traitement. Il a été classé par l'OMS comme agent cancérigène de classe I en 1992, avec 300 000 nouveaux cas par an dans le monde attribuable à cette bactérie notamment le carcinome gastrique

et le lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). L'éradication de la bactérie est donc un objectif premier, elle est basée sur une thérapie par antibiotiques avec des problèmes liés au coût du traitement dans certaines régions, à l'approvisionnement, aux effets secondaires et à l'apparition de résistances aux antibiotiques.

L'effet inhibiteur de croissance a été déterminé qualitativement par la méthode des disques via la mesure du halo d'inhibition témoignant de l'éradication bactérienne puis les CMI (concentration minimale inhibitrice) et CMB (concentration minimale bactéricide) ont été calculées.

Les résultats montrent qu'il existe un effet antibactérien du sang de dragon vis-à-vis d'*Helicobacter pylori* et que des différences significatives existent entre les différentes présentations. Ces variations s'expliquent principalement par les différences en termes de qualité et de pureté entre les différents échantillons. Les échantillons fournis par un laboratoire médical suisse et par un étudiant de l'Université de Tarapoto se sont montrés de haute qualité, avec un degré de pureté élevé et une différence non significative a été observée entre les résultats obtenus. Les échantillons achetés en centre commercial et fournis par un centre de soin en médecine naturelle ont montré une activité antibactérienne significativement plus faible ce qui peut s'expliquer par un degré de pureté inférieur, une variabilité au niveau de la teneur en actifs antibactériens d'un échantillon à l'autre ou une mise en suspension dans un solvant. Les sources d'approvisionnement sont donc un point crucial à ne pas négliger.

Dans la détermination des CMI, il a été observé une inhibition d'*Helicobacter pylori* par les différentes présentations du produit pur jusqu'à la dilution 1/8.

La CMB a quant à elle été déterminée visuellement comme la plus petite concentration en sang de dragon présente dans la gélose qui ne contient aucune colonie.

L'effet bactéricide sur *Helicobacter pylori* est observé avec du sang de dragon concentré (produit pur) pour toutes les présentations. A partir de la dilution 1/2, le produit perd son effet bactéricide total (Ortiz et al, 2003).

Les utilisations populaires dans le traitement des ulcères gastriques consistent à mélanger 2 à 3 gouttes de sève pure dans un verre d'eau ce qui apporte une concentration en actif insuffisante pour qu'il y ait un quelconque effet antibactérien.

Seules des études *in vitro* ou chez le rat ont été menées à l'heure actuelle et l'effet bactéricide sur *Helicobacter pylori* est uniquement obtenu avec un extrait concentré ce qui rend son utilisation impossible chez l'homme en l'état dans la recherche d'une action antibiotique. Toutefois, un bénéfice pourrait être apporté par une diminution de la sécrétion d'acide ainsi qu'une action inhibitrice au niveau de différents facteurs inflammatoires.

IV-3) Activité antioxydante

Les radicaux libres sont retrouvés dans tous les organismes biologiques et sont la cause de maladies dégénératives. Ils produisent un stress oxydatif sur les membranes cellulaires, à l'origine de mutagénèse, carcinogénèse, de problèmes d'ordres vasculaires et de vieillissement prématuré. Depuis plusieurs années, les études scientifiques s'intéressent particulièrement aux antioxydants d'origine naturels présents dans certaines plantes ou aliments. Le pouvoir antioxydant correspond à la capacité d'une molécule donnée à lutter contre l'oxydation en piégeant les radicaux libres dérivés de l'oxygène responsables du stress oxydatif.

Plusieurs études ont évalué le potentiel antioxydant du sang de dragon de *Croton lechleri*. Il a été déterminé que le poids sec du latex est composé à 90 % de composés phénoliques possédant des propriétés antioxydantes reconnues. D'autres molécules ont également été étudiées pour leur potentiel antioxydant, l'alcaloïde taspine et le lignane 3',4-O-diméthylcedrusine (De Marino et al, 2008).

IV-3-1) Etude du potentiel antioxydant de la sève brute

En 1997, C. Demarchelier et collaborateurs ont publié une première étude concernant l'activité antioxydante de la sève de *Croton lechleri*. Dans cette étude, le TRAP (*total reactive antioxydant potential*), un index du pouvoir antioxydant qui peut être déterminé par la technique de chimiluminescence, a été déterminé sur un extrait de sang de dragon récolté au Pérou. La méthode de détermination du TRAP utilise un mélange composé d'un tampon phosphate à pH 7,4, d'un cation donneur de radicaux peroxy, le 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) et de luminol. La machine utilisée a été calibrée avec un antioxydant témoin, le trolox, un dérivé synthétique de l'alpha-tocophérol.

L'addition du sang de dragon au mélange a induit une décroissance de luminescence entre T0 et T5min avec une décroissance maximale obtenue en 5 minutes. On remarque que le Trolox induit une décroissance beaucoup plus rapide mais moindre et que son action s'épuise plus rapidement. Ce test a révélé que le sang de dragon possédait une très forte concentration en molécules antioxydantes mais que sa réactivité est relativement faible (Desmarchelier et al, 1997).

Dans cette même étude, un essai sur de l'ADN de thymus de veau endommagé par stress oxydatif a été réalisé selon la méthode de Halliwell et Gutteridge.

On observe un effet protecteur du sang de dragon à hautes concentrations (100 et 1000 µg/ml) avec un pourcentage d'inhibition de la dégradation du matériel génétique important.

A contrario, à faible concentration (1 et 10 µg/mL), on observe une augmentation du nombre de produits de dégradation qui témoigne d'un effet prooxydant à faible dose (Desmarchelier et al, 1997).

En 2003, l'effet antioxydant du latex de *Croton lechleri* a été étudié *in vivo* par Maria Inez Lopes et collaborateurs. Il a été testé sur des levures du type *Saccharomyces cerevisiae* soumises à un stress oxydatif.

Les levures *Saccharomyces cerevisiae* ont été traitées par deux agents oxydants, l'apomorphine ayant un effet cytotoxique sur les cellules par oxydoréduction ainsi que le peroxyde d'hydrogène endommageant la membrane cellulaire par stress oxydatif via des radicaux OH°.

Le potentiel antioxydant des extraits de sang de dragon dilués au 1:10 a été évalué en mesurant le taux de survie des levures. Il a globalement permis d'augmenter le taux de survie et il est donc capable d'inhiber l'effet cytotoxique de l'apomorphine à condition qu'il soit ajouté avant l'agent oxydant (environ 10 minutes) afin qu'il soit présent dans la cellule au moment du stress oxydatif, s'il est ajouté en même temps ou après celui-ci, aucun effet antioxydant n'est observé (Lopes et al, 2004).

IV-3-2) Etude du potentiel antioxydant de composés isolés.

Les métabolites secondaires du latex de *Croton lechleri* ont été isolés et étudiés par Simona De Marino et collaborateurs en 2008 dans le but d'évaluer leur potentiel antioxydant. Les purifications ont abouti à l'isolement de 15 composés (Figure 15), On retrouve 3 megastigmanes, les 4 proanthocyanidines connues que sont la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, 3 phenylpropanoïdes, 3 lignanes dont le 3',4'-O-dimethylcedrusine, un clerodane ainsi que l'alcaloïde taspine.

Tous ces composés sont connus dans la littérature. Par ailleurs, six autres composés ont été isolés pour la première fois : le bluménol B, le bluménol C, le 4,5-dihydrobluménol A qui sont des dérivés terpénoïdes, deux dérivés de lignanes, l'érythro guaiacyl glycéryl β-O-4'-dihydroconiféryl éther, un composé très rare observé une seule fois auparavant dans le pin sylvestre et le 2-(4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy)-propane-1,3-diol ainsi qu'un clérodane, l'acide floribundique.

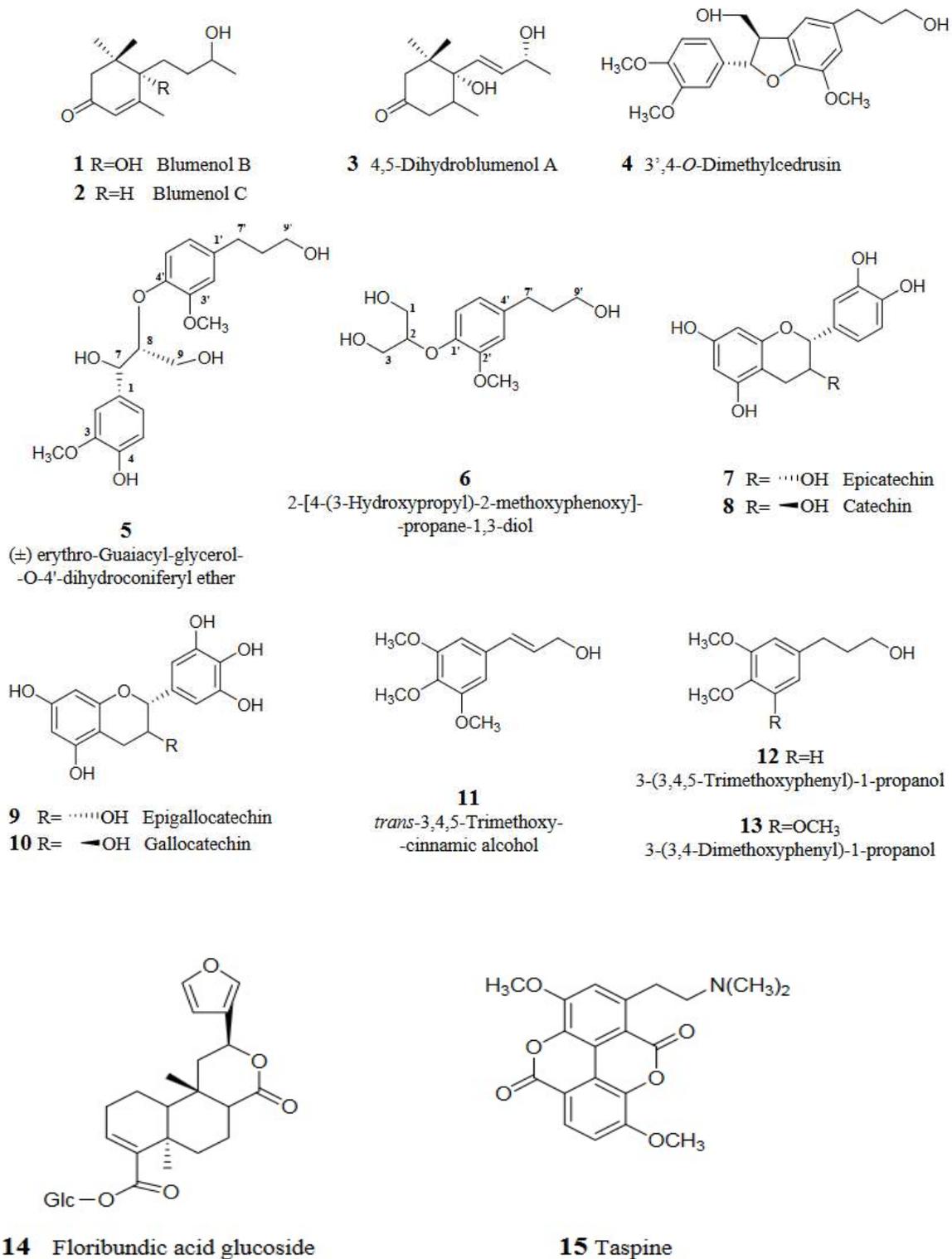


Figure 15 : Structure chimique des métabolites secondaires identifiés dans la sève de *C.lechleri* (De Marino et al, 2008)

A partir d'un échantillon de sève brute, des extractions successives, par la méthode de Kupchan, ont abouti à l'obtention de 4 extraits : un extrait de n-hexane, un extrait chloroformique, un extrait butanolique ainsi qu'un extrait aqueux. L'extrait de n-hexane étant faiblement concentré en actifs, les tests ultérieurs n'ont pas été réalisés sur cet extrait.

La chromatographie de l'extrait butanolique a permis d'obtenir 4 nouvelles fractions et d'isoler 3 dérivés de la catéchine : l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine.

Le contenu phénolique total de chaque fractions et extraits a été quantifié par spectrophotométrie, en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu et la capacité antioxydante de chaque échantillon a été mesurée par la méthode de Copper et le test à la DPPH. Tous ces extraits ont été comparés à des antioxydants de référence, l'acide ascorbique, le Trolox ainsi que la quercétine. (Tableau IV)

Tableau IV : Activité antioxydante de différents extraits, fractions et composés obtenus à partir du latex de *C. lechleri* (De Marino et al, 2008)

| Echantillons | Phénols (mg/g d'extrait) | Activité antioxydante (mEq d'acide urique) à 1 µM d'extrait | Activité antioxydante (mEq d'acide urique) à 10 µM d'extrait | DPPH (IC50) |
|-------------------------------|--------------------------------|---|--|----------------|
| Acide ascorbique | N/A | 0,36 ± 0,02 | 0,33 ± 0,02 | 9,65 µM |
| Trolox | N/A | 0,85 ± 0,07 | 1,77 ± 0,18 | 12,9 µM |
| Quercétine | N/A | 0,75 ± 0,06 | 2,17 ± 0,17 | 4,37 µM |
| Extrait du n-hexane | 4,84 | / | / | / |
| Extrait chloroformique | 41,87 | 0,09 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,09 µM |
| Extrait butanolique | 306,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,65 ± 0,05 | 0,875 µM |
| Extrait aqueux | 34,37 | 0,05 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 12,40 µM |
| Fraction 1 | 212,90 | 0,01 ± 0,01 | 0,83 ± 0,07 | 13,10 µM |
| Fraction 2 | 314,55 | 0,02 ± 0,01 | 1,81 ± 0,14 | 6,10 µM |
| Fraction 3 | 546,47 | 0,01 ± 0,01 | 1,11 ± 0,08 | 10,90 µM |
| Fraction 4 | 330,51 | 0,03 ± 0,01 | 0,66 ± 0,05 | 1,41 µM |
| Gallocatechine | N/A | 0,16 ± 0,03 | 1,35 ± 0,10 | 10,0 µM |
| Epigallocatechine | N/A | 0,39 ± 0,05 | 2,05 ± 0,11 | 0,561 µM |
| Epicatechine | N/A | 0,09 ± 0,01 | 0,36 ± 0,03 | 19,3 µM |

Le Tableau IV montre tout d'abord que l'extrait butanolique est le plus concentré en composés phénoliques. Son potentiel de captation du radical DPPH est supérieur aux antioxydants témoins. Il concentre majoritairement de la gallocatechine et de l'épigallocatechine qui ont été isolées de l'extrait et testées indépendamment.

On remarque par ailleurs que l'activité antioxydante totale des différents extraits et fractions est

significative à une concentration de 10 µM dans tous les extraits et quasiment nulle à une concentration de 1 µM.

Les fractions 2 et 3 obtenues à partir de l'extrait butanolique sont celles qui présentent l'activité antioxydante la plus importante, ce sont les fractions qui concentrent principalement l'épigallocatechine et la gallocatechine. La fraction 4, contenant principalement de l'épicatéchine, possède une activité moindre.

L'extrait chloroformique contient principalement de l'épicatéchine et de la catéchine en faible quantité d'où son activité antioxydante minime.

Les composés responsables de l'activité antioxydante sont donc principalement les proanthocyanidines. La gallocatechine et l'épigallocatechine ont démontré le plus fort potentiel antioxydant parmi les métabolites testés, avec une activité antioxydante équivalente à celle de la Quercétine et supérieure au Trolox et à l'acide ascorbique. La complexité du mélange de métabolites obtenu n'a pas permis d'identifier un rôle pour chaque composé. La captation des radicaux est la résultante d'une action synergique entre tous ces composés et des investigations supplémentaires sont nécessaires pour en apprendre d'avantage (De Marino et al, 2008).

IV-4) Activité antimicrobienne

IV-4-1) Etude du spectre d'action antibactérien de la sève brute

De nos jours, la résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur. Elle concerne notamment les agents pathogènes impliqués dans les maladies nosocomiales. Ce problème d'envergure nécessite le développement de nouvelles molécules à visée antibactériennes avec des mécanismes d'action différents des antibiotiques disponibles mais la recherche et le développement médicamenteux dans ce domaine est faible d'où l'intérêt de s'orienter vers les ressources que présente la diversité végétale. Les plantes se sont toujours développées au contact de bactéries et ne contractent que rarement des infections ce qui porte à croire qu'elles possèdent un arsenal moléculaire permettant de lutter contre celles-ci et la recherche pharmacologique de composés antibactériens chez les végétaux n'en est que plus justifiée.

Les études antérieures ont d'ores et déjà constaté le potentiel antibactérien de la sève de *Croton lechleri* sur *Helicobacter pylori* (Ortiz et al. 2003). La détermination du spectre d'action antibactérien du latex a débuté tardivement. En 2016, une étude a démontré que la sève brute de *Croton lechleri* exerçait une action bactéricide sur la souche *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

(Cayo, 2016). La méthode des disques imprégnés à diverses concentrations a montré un halo d'inhibition moyen de 1,8 mm et un effet bactéricide total lorsque le latex est utilisé pur. L'effet bactéricide diminue fortement dès la première dilution. Cette méthode présente tout de même une sensibilité relativement faible.

En 2013, l'étude de Lucia Corrales Ramirez et collaborateurs a évalué le potentiel antibactérien de la résine de *Croton lechleri* qui a été testé en milieu hospitalier sur des germes obtenus à partir d'ulcères cutanés. Les souches isolées et testées sont pour les Gram positifs : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus sanguis* et pour les Gram négatifs : *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que *Burkholderia cepacia*.

Deux extraits ont été comparés, un extrait obtenu à partir d'un solvant polaire, l'éthanol ainsi qu'un extrait obtenu à partir d'un solvant apolaire, l'éther de pétrole.

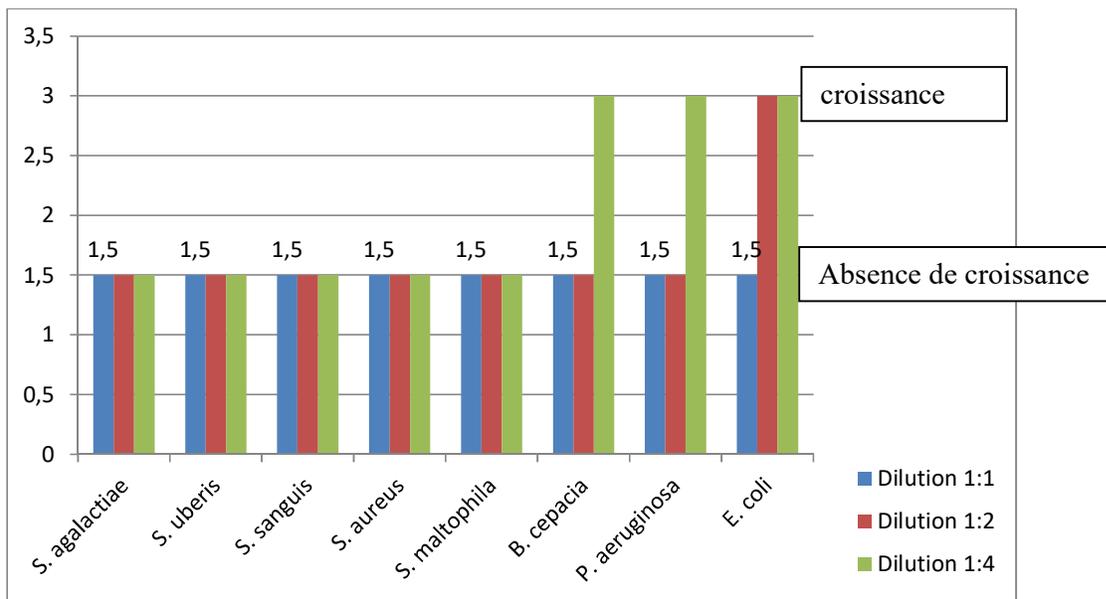


Figure 16 : Diagramme du test de dilution en gélose évaluant l'effet antibiotique de l'extrait éthanolique de *C.lechleri* (Corrales Ramirez et al, 2013)

L'extrait éthanolique a montré une efficacité antibactérienne globale sur l'ensemble des germes testés à la dilution 1:1. L'effet antibactérien est toujours présent à la dilution 1:2 sauf pour la souche d'*Escherichia coli* sur laquelle seul l'extrait concentré est actif. On observe également une croissance bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* aux dilutions 1:4 ce qui témoigne d'une absence d'efficacité de l'extrait à ces concentrations.

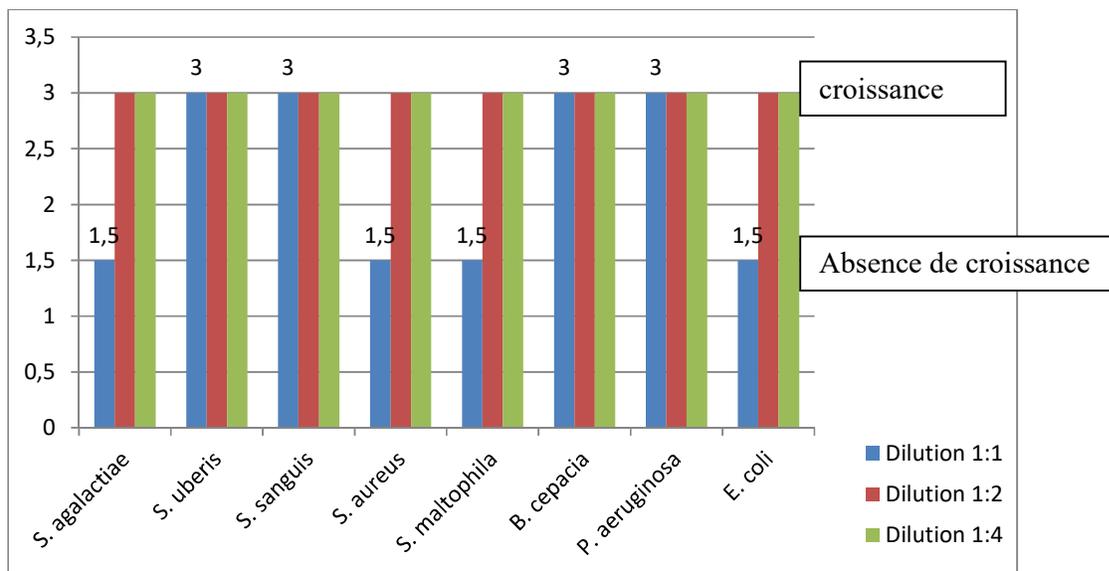


Figure 17 : Diagramme du test de dilution en gélose évaluant l'effet antibiotique de l'extrait d'éther (Corrales Ramírez et al, 2013)

On remarque que le même test que celui réalisé précédemment donne des résultats différents avec l'extrait d'éther. En effet, seul 50% des germes sont sensibles à la dilution 1:1. Les composés responsables de l'effet antibactérien semblent être présents principalement dans l'extrait éthanolique.

Il a été observé une activité antibactérienne des extraits de *Croton lechleri* vis-à-vis de l'ensemble des germes isolés à partir des lésions ulcéreuses. On remarque que l'extrait éthanolique possède une meilleure efficacité que l'extrait d'éther. L'étude a montré que l'extrait éthanolique contenait une plus grande variété de composés extraits du fait de son affinité polaire permettant l'extraction de composés tel que les alcaloïdes, les polyphénols ou encore les terpènes alors que l'extrait d'éther contient deux fois moins d'actifs et ne concentre que quelques terpènes, alcaloïdes et huiles essentielles.

Les halos d'inhibition obtenus avec l'extrait éthanolique sont comparables à ceux qu'on obtiendrait avec un antibiotique utilisé couramment (Corrales Ramírez et al, 2013).

En 2015, une étude réalisée à Iquitos, en Amazonie péruvienne, a évalué le potentiel antibiotique des plantes les plus couramment utilisées en médecine locale vis à vis des pathogènes impliqués dans les infections microbiennes, notamment les bactéries connues pour présenter une résistance aux antibiotiques ou impliquées dans les infections opportunistes ou nosocomiales ayant une morbi-mortalité importante. Une enquête ethnobotanique a été menée en amont en interrogeant des herboristes de la région, des guérisseurs, des sages-femmes et des habitants ayant des connaissances en phytothérapie. Les pathologies ciblées étant la toux, la diarrhée, la dysentérie,

les maladies de peau, les conjonctivites, la tuberculose, les bronchites chroniques, les maladies génito-urinaires et le mal de gorge. A l'issue de ces entrevues, 52 plantes ont été retenues dont *Croton lechleri* et leurs propriétés antimicrobiennes ont été évaluées *in vitro* sur un panel de 36 bactéries et levures afin de déterminer leur CMI.

Les bactéries utilisées ont été réparties en six groupes. Trois groupes sont constitués d'Entérobactéries. Le premier groupe comprend les entérobactéries VP- (ne fermentant pas le lactose). Ce sont des bactéries pathogènes généralement peu résistantes. On y retrouve deux souches d'*Escherichia coli* (8137,8138) résistantes à la pénicilline ainsi qu'une souche résistante à la pénicilline et aux fluoroquinolones (8157, ATCC 25922). La deuxième souche est *Citrobacter freundii* (11041) résistante aux céphalosporines.

Le deuxième groupe comprend des Entérobactéries VP+ à fortes résistance aux antibiotiques et souvent impliquées dans des infections nosocomiales. Il est composé de 4 espèces : deux souches de *Klebsiella pneumoniae* (11016,11017) résistantes à la pénicilline, deux souches d'*Enterobacter cloacae* (11050,11051) résistantes aux céphalosporines, une souche d'*Enterobacter aerogenes* (9004) ainsi que deux souches de *Serratia marcescens* (11056,11057) résistantes aux céphalosporines.

Le troisième groupe comprend les Entérobactéries VP- plus virulentes que celles du premier groupe. On y retrouve trois souches : une souche de *Proteus mirabilis* (11060), une souche de *Providencia stuartii* (11038) ainsi que deux souches de *Salmonella spp* (11033,11037) résistantes à la pénicilline.

Le quatrième groupe se compose également de bactéries à Gram négatif communément rencontrées dans les infections de type nosocomiales. Trois espèces ont été sélectionnées : *Pseudomonas aeruginosa* (8131, ATCC 27583), deux souches d'*Acinetobacter baumannii* (9010,9011) dont une multi-résistante ainsi que *Stenotrophomonas maltophilia*.

Le cinquième groupe se compose des cocci Gram positifs responsables d'infections de la peau. Six espèces y sont recensées : 2 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline et à la kanamycine (8146,8147), deux souches de *Staphylococcus epidermidis* (5001,10282), une souche de *Staphylococcus lugdunensis* (T26A3), une souche de *Staphylococcus warneri* (T12A12), deux souches d'*Enterococcus spp* résistantes aux aminoglycosides (8152) pour la première et à l'érythromycine et clindamycine (8153) pour la deuxième ainsi qu'une souche d'*Enterococcus faecalis* sensible à la vancomycine (C159-6).

Le sixième et dernier groupe contient diverses autres bactéries et levures : une souche de *Mycobacterium smegmatis* (5003), une souche de *Corynebacterium striatum* (T25-17) ainsi qu'une

souche de *Candida albicans* (10286).

Les Tableaux V à X (Roumy et al, 2015) présentent les CMI de la sève de *Croton lechleri* sur les différents groupes de bactéries.

Tableau V : Concentrations minimales inhibitrices (exprimée en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le premier groupe d'entérobactéries

| Species | Part | Strains | | | | | | |
|-------------------------------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | <i>C. freundii</i> (11041) | <i>C. freundii</i> (11042) | <i>C. freundii</i> (11043) | <i>E. coli</i> (8137) | <i>E. coli</i> (8138) | <i>E. coli</i> (8157) | <i>E. coli</i> (ATCC 25922) |
| <i>Anacardium occidentale</i> | B | 2.5 | 2.5 | 2.1 | | | | |
| <i>Couroupita guianensis</i> | B | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 5 | 5 | | 2.5 |
| | L | 1.7 | 1.7 | 2.5 | | 2.5 | | 1.7 |
| <i>Croton lechleri</i> | Re | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 1.2 | 1.1 | 1.2 | 0.6 |
| <i>Davilla kunthii</i> | Br | 2.5 | 2.5 | - | 5 | | | |
| <i>Davilla rugosa</i> | Br | 5 | 5 | 2.5 | - | | | |

C. freundii: *Citrobacter freundii*; *E. coli*: *Escherichia coli*; MIC: Minimal inhibitory concentration; ATCC: American Type Culture Collection; Br: Branch; B: Stem bark; L: Leaves; Re: Resin

Sur ce premier groupe d'entérobactéries, l'extrait de résine *Croton lechleri* présente une efficacité globale sur tous les germes avec une CMI de 0,6 à 1,2mg/ml.

Tableau VI : Concentrations minimales inhibitrices (exprimée en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le deuxième groupe d'entérobactéries

| Species | Part | Strains | | | | | | | |
|-------------------------------|------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | <i>E. aerogenes</i> (9004) | <i>E. cloacae</i> (11050) | <i>E. cloacae</i> (11051) | <i>E. cloacae</i> (11053) | <i>K. pneumoniae</i> (11016) | <i>K. pneumoniae</i> (11017) | <i>S. marcescens</i> (11056) | <i>S. marcescens</i> (11057) |
| <i>Anacardium occidentale</i> | B | 2.5 | 2.5 | 1.7 | 2.5 | | 0.6 | 2.5 | 1.7 |
| <i>Couroupita guianensis</i> | B | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | | 0.6 | 2.5 | 2.5 |
| <i>Couroupita guianensis</i> | L | 1.7 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | | 0.6 | 2.5 | 2.5 |
| <i>Croton lechleri</i> | Re | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 1.2 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| <i>Davilla kunthii</i> | Br | | | | | | 1.2 | 2.5 | 0.6 |

Dans ce deuxième groupe, l'extrait de résine de *C.lechleri* possède une activité antibactérienne très large sur l'ensemble des entérobactéries multirésistantes avec une CMI de 0,6 mg/mL et devance tous les autres extraits en termes d'efficacité.

Tableau VII : Concentrations minimales inhibitrices (exprimées en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le troisième groupe d'entérobactéries

| | | (11060) | (11038) | sp. (11033) | sp. (11037) |
|-------------------------------|----|---------|---------|-------------|-------------|
| <i>Anacardium occidentale</i> | B | 0.6 | 0.6 | | 2.5 |
| <i>Bixa orellana</i> | Fr | 2.5 | 2.5 | | - |
| <i>Couroupita guianensis</i> | B | 1.2 | 1.2 | 2.5 | 2.5 |
| | L | 0.6 | 0.6 | 2.5 | 2.5 |
| <i>Croton lechleri</i> | Re | 0.3 | 0.3 | 0.6 | 0.6 |
| <i>Davilla kunthii</i> | Br | 1.2 | 1,2 | | |

Concernant le troisième groupe d'entérobactéries, *C.lechleri* possède là encore l'activité la plus marquée et on remarque une multirésistance des souches de Salmonella sur lesquelles seul *C lechleri* s'est montré efficace.

Tableau VIII : Concentrations minimales inhibitrices (exprimées en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur les bactéries à Gram négatif autres que les entérobactéries

| Species | Part | Strains | | | | |
|-------------------------------|------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| | | <i>A. baumannii</i> (9010) | <i>A. baumannii</i> (9011) | <i>P. aeruginosa</i> (8131) | <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27583) | <i>S. maltophilia</i> (TP) |
| <i>Anacardium occidentale</i> | B | 1.2 | 1.7 | 2.5 | 1.2 | 0.3 |
| <i>Anacardium occidentale</i> | L | | 5 | | | 0.3 |
| <i>Andropogon citratus</i> | Ep | | 5 | 5 | | |
| <i>Bidens pilosa</i> | L | | | | | 5 |
| <i>Bixa orellana</i> | Fr | 2.5 | | | 2.5 | 0.6 |
| | L | | | | | 1.2 |
| <i>Cedrela odorata</i> | B | | | | | 2.5 |
| <i>Couroupita guianensis</i> | B | 1.2 | 1.2 | 2.5 | 1.2 | 0.6 |
| | L | 1,2 | 1,2 | 2,5 | 1,2 | 0,6 |
| <i>Croton lechleri</i> | Re | 0.3 | 0.6 | 0.6 | 0.3 | 2.1 |
| <i>Davilla kunthii</i> | Br | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 1.2 | 0.6 |
| <i>Davilla rugosa</i> | L | | | | | 0.6 |

Le quatrième groupe de bactéries contient des souches particulièrement résistantes et pathogènes. L'extrait de *C.lechleri* s'est quant à lui montré efficace sur tous les germes avec une CMI < 1mg/mL mais il est inefficace sur *S.maltophilia*.

Tableau IX : Concentrations minimales inhibitrices (exprimées en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le cinquième groupe de bactéries comportant les cocci à gram positif

| Species | Part | Strains | | | | | | | | |
|-------------------------------|------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | | <i>E. faecalis</i> (C159-6) | <i>Enterococcus</i> sp. (8152) | <i>Enterococcus</i> sp. (8153) | <i>S. aureus</i> (8146) | <i>S. aureus</i> (8147) | <i>S. epidermidis</i> (5001) | <i>S. epidermidis</i> (10282) | <i>S. lugdunensis</i> (T26A3) | <i>S. warneri</i> (T12A12) |
| <i>Aegiphila filipes</i> | L | | | | - | 5 | - | 1.2 | 2.5 | 2.5 |
| <i>Ambelania acida</i> | B | | | | 5 | | | 2.5 | 5 | 5 |
| <i>Anacardium occidentale</i> | B | 1.2 | 1.7 | 1.2 | 0.6 | 0.6 | 0.5 | 0.15 | 0.4 | 0.6 |
| <i>Anacardium occidentale</i> | L | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 1.2 | 1.2 | 2.5 | 0.6 | 1.2 | 1.2 |
| <i>Andropogon citratus</i> | Ep | | | | 2.5 | 2.5 | 1.2 | 0.6 | 2.5 | |
| <i>Bidens pilosa</i> | L | | 2.5 | 2.5 | | | | | 5 | |
| <i>Bixa orellana</i> | Fr | | | 5 | 2.5 | 2.5 | 5 | 0.6 | 1.2 | 1.2 |
| | L | | | | 2.5 | 1.2 | 5 | 0.6 | 0.6 | 1.2 |
| <i>Brugmansia suaveolens</i> | L | 5 | 5 | 5 | | | | | | |
| <i>Cedrela odorata</i> | B | 2.5 | 1.2 | 2.5 | 1.2 | 1.2 | 2.5 | 1.2 | 0.6 | 1.2 |
| <i>Ceiba samauma</i> | L | 5 | 2.5 | 2.5 | 1.2 | 1.2 | 2.5 | 5 | 2.5 | 2.5 |
| <i>Couroupita guianensis</i> | B | 1.2 | 2.5 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 2.5 | 0.3 | 0.3 | 1.2 |
| | L | 2.5 | 2.5 | 1.2 | 0.6 | 0.6 | 1.2 | 0.3 | 0.6 | 0.6 |
| <i>Croton lechleri</i> | Re | 0.6 | 1.2 | 0.6 | 0.3 | 0.3 | 0.6 | 0.075 | 0.15 | 0.15 |
| <i>Davilla kunthii</i> | Br | 1.2 | 0.6 | 2.5 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| <i>Davilla rugosa</i> | L | 1.2 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 2.5 | 0.6 | 1.2 |

Les extraits de plantes ont été particulièrement efficaces sur le cinquième groupe, composé des cocci à Gram positif. Cela explique l'utilisation large des plantes pour traiter les infections externes. L'extrait de *C.lechleri* possède là encore une efficacité globale très bonne.

Tableau X : Concentrations minimales inhibitrices (exprimée en mg/mL) des extraits végétaux actifs sur le sixième groupe contenant diverses bactéries et levures

| Species | Part | Strains | | |
|-------------------------------|------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | | <i>C. albicans</i> (10286) | <i>C. striatum</i> (T25-17) | <i>M. smegmatis</i> (5003) |
| <i>Aegiphila filipes</i> | L | | 5 | 5 |
| <i>Ambelania acida</i> | B | 5 | 5 | |
| <i>Anacardium occidentale</i> | B | 1.1 | 0.3 | 0.3 |
| | L | | | 0.6 |
| <i>Andropogon citratus</i> | Ep | | 0.6 | 2.5 |
| <i>Bixa orellana</i> | Fr | | 0.6 | 1.2 |
| | L | | 0.3 | 0.6 |
| <i>Brugmansia suaveolens</i> | L | | 5 | |
| <i>Cedrela odorata</i> | B | | 0.6 | 0.6 |
| <i>Ceiba samauma</i> | L | | 1.2 | 0.6 |
| <i>Couroupita guianensis</i> | B | 2.5 | 0.6 | 0.6 |
| <i>Couroupita guianensis</i> | L | 2.5 | 0.6 | 0.4 |
| <i>Croton lechleri</i> | Re | 0.15 | 0.075 | 0.15 |
| <i>Davilla kunthii</i> | Br | 1.2 | 0.6 | 0.6 |

Le sixième groupe est également sensible à de nombreux extraits avec une bonne efficacité de *C.lechleri* sur les trois souches étudiées. Il est à souligner que *Mycobacterium smegmatis* appartient au même genre que *Mycobacterium tuberculosis*, qui est à l'origine de multiples résistances aux antibiotiques et responsable d'un taux de mortalité important chez les patients immunodéficients et infectés par le VIH. Ces résultats sont encourageants quant à la découverte de molécules d'origine végétale potentiellement actives contre l'agent responsable de la tuberculose.

Certaines bactéries multirésistantes comme la souche de *K.pneumoniae* se sont montrées sensibles à des extraits végétaux avec une CMI inférieure à la même souche non résistante ce qui laisse à penser que ces extraits agissent selon un mode d'action différent des antibiotiques couramment utilisés.

Les résultats ont globalement montré l'impressionnant spectre d'action antibactérien de l'extrait de résine de *C.lechleri* à des doses efficaces relativement basses. Les composés supposés responsables de son activité antibiotique étant les diterpénoïdes, les proanthocyanidines ainsi que l'alcaloïde taspine (Roumy et al, 2015).

Son utilisation topique en tant que telle pour traiter des infections cutanées semble justifiée. Toutefois, seules des études *in vitro* en gélose ont été réalisées et on ne connaît pas le réel potentiel antibactérien chez l'Homme.

IV-4-2) Activité antiparasitaire de la sève brute

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires graves et dont la prise en charge médicamenteuse repose sur un traitement lourd et toxique engendrant de nombreux effets indésirables chez les patients.

En 2015, Il a été démontré un effet leishmanicide de la sève de *Croton lechleri* dans l'étude de Ana Paula de Azevedo dos Santos et collaborateurs. L'exposition *in vitro* de *Leishmania guyanensis* et *Leishmania amazonensis* à diverses concentration de résine (6,25 – 12,5 et 25 µg/mL) pendant 72 heures a montré un effet létal positif (IC50=9,05 µg/mL) pour *L. guyanensis* et 5,04 µg/mL pour *L. amazonensis*.

Les résultats de cette étude sont prometteurs quant à l'élaboration de nouvelles formes de thérapies à visée leishmanicide. Toutefois, aucune étude clinique n'a encore été réalisée à ce jour chez l'homme dans cette indication (Santos et al, 2015).

IV-4-3) Etude de l'activité antivirale du SP303, un oligomère proanthocyanidique isolé du latex de *C.lechleri*

Les usages traditionnels de la sève de *Croton lechleri* incluent le traitement de diverses affections virales notamment respiratoires ainsi que le traitement topique des infections herpétiques. Ces actions ont été mises en évidence via diverses études expérimentales menées *in vitro* et *in vivo* dans l'étude de R.Ubilas et collaborateurs. Cette vaste étude publiée en 1994 s'est intéressée à la proanthocyanidine baptisée SP303, identifiée dans le latex de *Croton lechleri*. Il s'agit d'un oligomère proanthocyanidique possédant une large activité antivirale vis-à-vis de différents types de virus à ADN et ARN. Différents tests d'efficacité et de toxicité ont été réalisés *in vitro* sur des cultures cellulaires et *in vivo* sur des modèles animaux.

Au niveau structural, le SP303 est un polymère formé d'une chaîne linéaire de proanthocyanidines (Figure 18). Chaque monomère se compose de trois cycles. Les monomères retrouvés dans le cycle C (au milieu) sont le 5,7,3',4'- tétrahydroxycatéchine ou l'épicatéchine. Ce sont deux stéréoisomères où l'épicatéchine représente la forme cis et la catéchine la forme trans. Les deux autres monomères sont le 5,6,3',4',5'-pentahydroxyflavan-3-ol-gallicatéchine ou l'épigallicatéchine. Le cycle A (à gauche) est invariable. Le cycle B (à droite) peut présenter deux configurations avec deux degrés d'oxydation : la forme 3',4'-dihydroxyphényl appelée procyanidine ou la forme 3',4',5' -trihydroxyphényl appelée prodelphinidine. Chaque monomère est relié au suivant par des liaisons C4→C6 ou C4→C8.

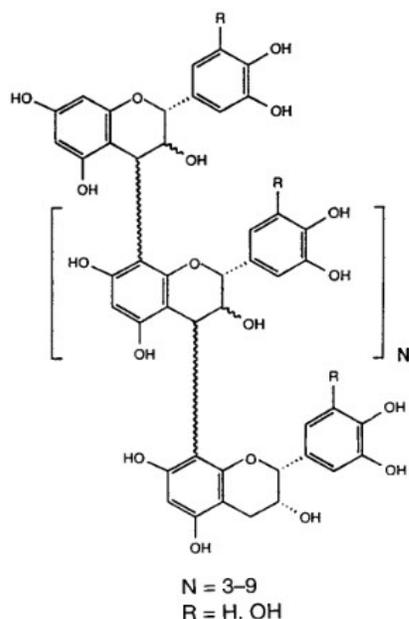


Figure 18 : Structure chimique du SP303 (Ubilas et al, 1994)

L'activité antivirale du SP303 a été étudiée sur un large panel de virus : le Virus respiratoire syncytial (VRS), le Parainfluenzavirus (PIV-3), l'Influenzavirus A (FLU-A), les Herpesvirus HSV-1 et HSV-2 ainsi que les virus de l'hépatite A et B.

· Activité antivirale du SP303 *in vitro* :

L'activité antivirale du SP303 a été étudiée *in vitro* en utilisant des cultures cellulaires d'origines variées. Le but de l'étude *in vitro* a été de comprendre les mécanismes d'action du SP303 et notamment quand et comment il intervient sur les différentes étapes du cycle d'infection virale de la cellule hôte qui sont successivement l'attachement, la pénétration et la décapsidation.

Il s'est montré efficace sur l'ensemble des virus. Lors du test de l'effet cytopathique, il a montré une efficacité équivalente à la ribavirine vis-à-vis du RSV. Malgré une efficacité démontrée sur les virus du type HSV, il reste néanmoins moins efficace que l'acyclovir.

L'étude de l'activité antivirale sur des hépatocytes infectés par HBV a induit une diminution de l'ADN viral intracellulaire. Or, il est connu que dans son mécanisme d'action, le HBV acquiert son enveloppe à l'intérieur de la cellule hôte et non par bourgeonnement de la membrane plasmique (Robinson, 1990) ce qui laisse à penser que le SP303 agit indirectement par fixation à la membrane plasmique de l'hépatocyte infecté.

Il est également inhibiteur du virus de l'hépatite A, qui est un virus non-enveloppé. Son action inhibitrice s'expliquerait par une fixation à des polypeptides présents sur la capsid virale. Pour le moment, seules des suppositions peuvent être établies et il faudrait effectuer des études supplémentaires pour déterminer de manière précise les interactions avec les enveloppes ou capsides virales.

Le SP303 utilisé en traitement prophylactique sur des cellules Hep-2 infectées par le virus RSV s'est avéré efficace ce qui laisse à supposer un mécanisme d'action différent d'une liaison directe avec les particules virales. On pourrait supposer une interaction avec la membrane plasmique cellulaire et ses récepteurs viraux rendant impossible l'attachement du virus.

· Activité antivirale du SP303 *in vivo* :

Tableau XI : Liste des modèles animaux et virus utilisés durant l'étude

| Modèle animal | Dosage (mg/kg/j) | Voie d'administration | Schéma posologique | Critères d'efficacité | Molécules contrôles | Témoins d'efficacité |
|-------------------------|--|-----------------------|-----------------------|---|------------------------|--|
| RSV/rat | 0,3-270 | IP, PO, SPA | +24h 3jours | Concentration virale pulmonaire | ribavirine | IP :1-10mg/kg/j PO :1-10mg/kg/j SPA :1,3-10mg/kg/j |
| RSV/singe vert africain | 0,2-270 | IV, PO | -4h à +24h 10jours | Présence du virus dans les sécrétions bronchiques | aucune | Réduction de la concentration virale dans les sécrétions |
| FLU A/souris | 0,3-270 | IP, PO, SPA | -4h à +24h 8jours | Oximétrie, titrage du virus dans les poumons, histologie pulmonaire, température corporelle | Ribavirine, amantadine | aucun |
| FLU A/furet | 1-10 | IP | -48h 3jours | Température corporelle, titrage du virus dans les poumons, histologie pulmonaire, anticorps viraux dans le plasma | Ribavirine, amantadine | Concentration virale intrapulmonaire réduite de 93 % |
| PARA FLU-3/rat | 1-10 | IP | +24h 3jours | Titration virale dans les poumons | aucune | Concentration virale intrapulmonaire réduite de 90 % |
| HSV-1/cochon de Guinée | Crèmes ou pommades à 10-30 % | TOP | 0h à +6h 8jours | Lésions cutanées, taux de survie | ACV | aucun |
| HSV-2/vagin de souris | IP, PO : 30-270 TOP : crèmes ou pommades à 5-10 % | IP, PO, TOP | -2h à +6h 8jours | Lésions externes, présence du virus dans les sécrétions, taux de survie | ACV DHPG | Réduction des lésions |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----|----------------------|---|-----|-----------------------|
| HSV-2/vagin de cochon de Guinée | Crèmes ou pommades à 10-15 % | TOP | -48h à +6h 8jours | Lésions externes, présence du virus dans les sécrétions, taux de survie | ACV | Réduction des lésions |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----|----------------------|---|-----|-----------------------|

Abréviations utilisées pour les voies d'administration : IP pour intrapéritonéale, IV pour intraveineuse, TOP pour topique, SPA pour particules aérosol de petite taille, ACV pour Acyclovir, DHPG pour Ganciclovir.

Concernant les schémas posologiques, le signe (-) indique un traitement prophylactique débuté avant l'infection, un signe (+) désigne un traitement symptomatique débuté après l'infection, 0h indique que le traitement débute au moment de l'infection. Le nombre de jours qui suit indique la durée de traitement.

- Administration du SP303 per os chez les rats infectés par RSV :

Le traitement par voie orale a été administré à des doses comprises entre 0,3 et 270 mg/kg de SP303, avec une à trois administrations par jour. L'évaluation de l'efficacité antivirale du SP303 par un lavage transpleural des poumons a démontré une diminution significative de la charge virale dans chacune des études à des doses de 1 à 10 mg/kg. L'ensemble des études n'as pas permis de conclure quant à un dosage optimal à suivre pour le traitement ni sur les bénéfices d'une prise unique ou pluri journalière.

- Administration du SP303 par voie intrapéritonéale chez les rats infectés par RSV :

Les études réalisées par voie intrapéritonéale ont également montré une réduction significative de la concentration virale pulmonaire du RSV. La dose de 10 mg/kg a montré la meilleure efficacité durant les études. A partir de 30 mg/kg, une toxicité légère est observée avec une perte de poids notable. L'effet antiviral du SP303 reste néanmoins inférieur à celui de la ribavirine administrée à 90 mg/kg.

- Administration du SP303 sous forme de particules aérosol chez les rats infectés par RSV :

L'administration sous forme de fines particules d'aérosol à des doses de 1,3 à 10 mg/kg/jour a

induit une diminution significative de la concentration virale pulmonaire. Le seuil de toxicité constaté étant 18,7mg/kg à partir duquel on observe une perte de poids chez les animaux. Le titrage viral reste néanmoins inférieur à celui mesuré après traitement à la ribavirine.

- Résultats chez les singes verts africains infectés par RSV :

Les administrations du SP303 par voie IV réalisées 4 heures avant l'inoculation du virus sur des plages de concentrations de 0,2 à 1 mg/kg/jour ont montré une réduction dose-dépendante de la charge virale dans les prélèvements oropharyngés par rapport aux placébos.

Chez les singes ayant reçu une dose de 1 mg/kg/jour, on observe une réduction de 3log₁₀ du TCID₅₀, connu comme la charge virale nécessaire pour tuer 50 % des cellules hôtes. La charge virale est donc considérablement réduite et les symptômes infectieux observés sont également moindres. L'excrétion virale initiale a été retardée et la durée d'excrétion a été réduite par rapport au témoin non traité.

Lorsque le traitement est débuté 24 heures après l'inoculation du virus, on observe une réduction de la concentration virale moyenne pour tous les dosages mais tous les autres paramètres étudiés restent inchangés. Chez les animaux débutant le traitement après 48 heures, aucune différence parmi les paramètres étudiés n'a été observée par rapport au groupe contrôle.

Ces observations sont en corrélation avec ceux obtenus dans le test *in vitro* sur les cultures Hep-2, le SP303 semble efficace sur le RSV uniquement en pré-traitement.

Le traitement *per os* initié 4 heures avant l'infection s'est avéré optimal pour une posologie de 10 mg/kg/jour en une prise quotidienne.

Le traitement symptomatique en 2 prises par jour à des posologies de 10, 30 et 90 mg/kg/jour débuté 24heures après l'infection a permis d'observer une diminution significative de la concentration virale dans les fluides pulmonaires pour tous les dosages testés et ces derniers résultats indiquent que le traitement peut s'avérer efficace en post-infection lors d'une administration *per os* ce qui contredit la précédente théorie d'un mode d'action exclusif par modulation des récepteurs viraux.

L'administration orale ou IV du SP303 n'a pas engendré de toxicité ni d'effets indésirables notables.

- Résultats chez des souris infectées par le virus influenza A :

Le traitement par SP303 a été testé selon 3 modes d'administration : la voie intrapéritonéale, la voie orale et la voie inhalée. L'administration par voie inhalée est la seule qui s'est avérée efficace. Le taux de survie des souris est de 85 % chez le groupe traité à 9 mg/kg/jour contre 0 % pour le

groupe placebo.

- Résultats chez les rats infectés par PIV-3 :

Le traitement a été initié 24 heures après l'infection et poursuivi pendant 3 jours. L'administration intrapéritonéale de SP303 à des doses de 3 et 10 µg/ml a permis de réduire de près de 90 % la concentration virale dans les poumons par rapport au groupe placebo.

- Résultats chez les cochons de Guinée et souris infectés par HSV-1 et HSV-2 :

Le traitement de lésions dorsales infectées par HSV-1 s'est montré totalement inefficace sur tous les paramètres étudiés.

L'étude de l'efficacité sur HSV-2 s'est faite sur des lésions vaginales infectées sur des modèles murins et des cochons de Guinée. Sur ce dernier groupe, des applications locales de crèmes et pommades dosées à 10-15 % en SP303 se sont montrées efficaces avec une diminution de l'excrétion virale locale. Les crèmes ont été testées avec 3 excipients différents et la crème formulée avec 79 % de diméthylsulfoxyde a montré des résultats nettement supérieurs aux autres excipients ce qui démontre leur importance dans la formulation des crèmes.

En ce qui concerne le traitement des souris, les 3 voies d'administration testées (intrapéritonéale, prise orale et application topique) se sont montrées efficaces. Il n'y a visiblement pas d'effet dose-réponse et l'acyclovir utilisé comme antiviral témoin s'est montré environ deux fois plus actif que le SP303.

- Toxicité du SP303 sur des modèles animaux :

Chez les souris, l'administration d'une dose orale aiguë à 300 mg/kg n'a entraîné aucun décès ni aucun signe clinique particulier. L'administration par voie intraveineuse a été létale à 10 mg/kg et à 25 mg/kg pour l'administration intrapéritonéale.

Dans le groupe de rats, l'administration intraveineuse a été létale dans le groupe recevant la plus haute dose (50mg/kg), les administrations intrapéritonéales n'ont engendré aucun décès même à forte dose (100mg/kg).

Chez les singes Rhésus, la première étude montrant un résultat significatif est l'étude conduite sur 14 jours chez des groupes de singes recevant des doses croissantes par voie orale. Dans le

groupe recevant 500 mg/kg/jour, on remarque une augmentation du taux d'éosinophiles au jour 15 ainsi qu'une infiltration d'éosinophiles au niveau des tissus hématopoïétiques d'origine inconnue. L'analyse histopathologique a révélé une pigmentation verdâtre des histiocytes au niveau des intestins, une gastropathie légère ainsi qu'une involution et une diminution de taille du thymus. Une pigmentation diffuse est également observable dans les cellules sinusoidales hépatiques.

Sur la même espèce, une administration de SP303 par sondage gastrique à des doses de 30 à 200 mg/kg/jour a engendré des selles molles et une diminution d'appétit chez les animaux recevant les plus hautes doses.

Les administrations intraveineuses répétées chez un groupe de rats et de chiens ont été bien tolérées chez les rats. A l'inverse, de nombreux effets indésirables ont été notifiés dans le groupe canin. Les bolus répétés sur 5 jours sont à l'origine d'une toxicité hématologique importante (thrombocytopénie) ainsi que de modifications histopathologiques avec une coloration et une vacuolisation des histiocytes du système réticuloendothélial. L'administration d'un bolus de 35 mg/kg a entraîné des phénomènes d'ataxie, de bradycardie et de perte de conscience momentanée.

Le SP303 ne possède pas de structure nucléosidique, son mécanisme d'action antiviral diffère donc des interférons et des analogues nucléosidiques agissant intrinsèquement sur la réplication virale. Les études ont montré qu'il agissait en dehors de la cellule en se fixant à la particule virale ou à la membrane plasmique de la cellule infectée. Une étude réalisée avec du SP303 radiomarqué a démontré que celui-ci n'avait pas la capacité de traverser la membrane plasmique. Les virus possédant une enveloppe lipidique (RSV, HSV, FLU et PIV) présentent des fragments lipidiques ainsi que des glycoprotéines membranaires sur lesquels le SP303 semble se fixer et cette interaction jouerait un rôle important dans son mécanisme d'action antiviral. Une étude réalisée avec le virus RSV et du SP303 radiomarqué au tritium a permis de mesurer une constante de dissociation K_d de $2,3 \times 10^{-8}$ par l'analyse de Scatchard ce qui correspond à l'affinité de liaison connue des antiviraux sur les récepteurs viraux.

Les études réalisées *in vivo* sur des modèles animaux ont également démontré un potentiel thérapeutique certain. Dans la plupart des infections, les résultats ont été positifs mais il n'a pas toujours été possible de déterminer précisément un effet dose-réponse.

Un autre constat est le fait qu' *in vitro* les résultats obtenus sont similaires au contrôle positif alors qu' *in vivo* la différence est plus nette et les témoins positifs utilisés (acyclovir, ganciclovir et ribavirine) montrent une meilleure efficacité que le SP303. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait qu'il ne parvienne pas à atteindre son site d'action où a lieu la réplication virale ou qu'il y parvienne mais que son mécanisme d'action extracellulaire le rende moins efficace que les

antiviraux possédant une action intracellulaire (Ubillas et al, 1994).

En 1992, la compagnie Shaman Pharmaceuticals, Inc. a déposé un brevet sur la production du SP303. Elle a également initié le développement du Virend[®], indiqué dans le traitement de l'herpès. Le projet a été abandonné suite aux échecs des premiers essais cliniques (Alexiades, 2002).

IV-5) Activité anti-inflammatoire

Parmi les différentes utilisations du sang de dragon en thérapeutique, un effet anti-inflammatoire important est toujours constaté. Cet effet émane principalement de son alcaloïde prépondérant, la taspine.

IV-5-1) Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'alcaloïde taspine

En 1978, une étude américaine conduite par Georgia Persinos Perdue et collaborateurs. a démontré l'activité anti-inflammatoire de la Taspine via 2 expériences *in vivo*.

Le potentiel anti-inflammatoire aigu de cet alcaloïde à structure dilactone a été évalué sur des rats Wistar. Une solution de carraghénine injectée dans l'aponévrose plantaire des pattes arrière a permis d'induire une réaction œdémateuse. Les animaux ont reçu de l'hydrochloride de taspine par sonde d'alimentation et le volume des pattes a été mesuré à T0 et après 3 heures par immersion dans une solution de mercure où tout changement de pression est mesuré à l'aide d'un pléthysmographe. L'activité de la taspine a été comparée à un anti-inflammatoire témoin, la phénylbutazone (Tableau XII).

Tableau XII : Activité antidœdémateuse de l'hydrochloride de taspine (Perdue et al. 1979)

| Essai | Composé | Dose (mg/kg) | Augmentation moyenne du volume des pattes | Volume des pattes en pourcentage par rapport au témoin |
|----------|----------------|--------------|---|--|
| A | Agar (placebo) | | 1,40 ± 0,12 | 100 |
| | Phénylbutazone | 250 | 0,71 ± 0,05 | 51 |
| | Taspine | 50 | 0,58 ± 0,06 | 41 |
| | Taspine | 125 | 0,78 ± 0,08 | 56 |
| | Taspine | 250 | 0,67 ± 0,09 | 48 |
| B | Agar | | 1,16 ± 0,12 | 100 |
| | Phénylbutazone | 200 | 0,50 ± 0,07 | 43 |
| | Taspine | 50 | 0,71 ± 0,11 | 61 |
| | Taspine | 125 | 0,53 ± 0,06 | 45 |
| | Taspine | 250 | 0,39 ± 0,07 | 34 |
| C | Agar | | 1,08 ± 0,12 | 100 |
| | Phénylbutazone | 200 | 0,43 ± 0,08 | 40 |
| | Taspine | 10 | 0,45 ± 0,08 | 42 |
| | Taspine | 50 | 0,43 ± 0,04 | 40 |
| | Taspine | 125 | 0,33 ± 0,06 | 31 |
| | Taspine | 250 | 0,22 ± 0,05 | 20 |
| D | Agar | | 1,18 ± 0,06 | 100 |
| | Phénylbutazone | 200 | 0,55 ± 0,07 | 47 |
| | Taspine | 50 | 0,70 ± 0,04 | 59 |
| | Taspine | 125 | 0,50 ± 0,06 | 42 |
| | Taspine | 250 | 0,40 ± 0,05 | 34 |

On constate d'après le tableau des résultats une diminution des œdèmes dans les groupes traités par l'hydrochloride de taspine. Cette diminution est liée à la dose administrée. La Dose Effective médiane (ED50) calculée sur l'ensemble des études est de 58 mg/kg pour la taspine. Comparativement, la phénylbutazone aux doses utilisées (200 à 250 mg/kg), a montré une

diminution de la réaction œdémateuse d'environ 50 %, ce qui confère à la taspine une efficacité quatre fois supérieure à dose équivalente.

Dans cette même étude, une expérience a permis d'observer que la taspine agissait au niveau de granulomes inflammatoires induits par des rondelles de coton implantées en sous-cutané sur les rats. Chaque groupe a reçu une dose d'hydrochloride de taspine à 20 mg/kg ou de l'indométacine à 0,5 ou 1mg/kg pendant six jours. Une pesée comparative des animaux a permis d'évaluer les variations de poids des granulomes (Tableau XIII).

Tableau XIII : Effet inhibiteur de granulation de l'hydrochloride de taspine (Perdue et al, 1979)

| Essai | Composé | Dose (mg/kg) | Poids moyen des tissus de granulation | Pourcentage d'inhibition (%) |
|----------|--------------|--------------|---------------------------------------|------------------------------|
| A | Agar | 0,25 | 144 ± 14 | |
| | Indométacine | 0,5 | 122 ± 7 | 15 |
| | Taspine | 20 | 95 ± 11 | 34 |
| B | Agar | 0,25 | 160 ± 4 | |
| | Indométacine | 1 | 132 ± 5 | 17 |
| | Taspine | 20 | 136 ± 8 | 15 |

On constate que la taspine a permis d'inhiber significativement la formation de granulomes inflammatoires par rapport au placebo. L'hydrochloride de taspine, administrée à 20 mg/kg a permis d'obtenir un pourcentage d'inhibition similaire à une injection d'indométacine à 1 mg/kg, comme nous le montrent les résultats de l'étude B.

IV-5-2) Etude de la toxicité de la taspine

Les alcaloïdes sont des molécules à haut potentiel toxique, la toxicité aiguë et chronique de la taspine a été évaluée *in vivo*. La LD50 chez le rat pour une administration orale unique d'hydrochloride de taspine est de 518 mg/kg en moyenne et 100 mg/kg pour une administration quotidienne pendant 7 jours.

Les premiers animaux sont décédés le septième jour dans le groupe recevant 100 mg/kg et après le cinquième jour dans le groupe recevant 200 à 300 mg/kg. Durant les derniers jours, une perte de poids et des diarrhées ont été notifiées et les autopsies ont révélé une congestion pulmonaire importante (Perdue et al, 1979).

Cette première étude a permis de démontrer clairement le potentiel anti-inflammatoire de la taspine, efficace à des doses bien en deçà des doses létales.

IV-5-3) Etude *in vitro* de l'effet anti-inflammatoire du sang de dragon brut

Dans l'étude de Georgia Persinos Perdue et collaborateurs, il a été démontré un effet anti-inflammatoire de la taspine vis-à-vis de la réaction œdémateuse induite expérimentalement, une expérience en tout point identique a été réalisée dans l'étude d'Esther Risco et collaborateurs, en utilisant le latex brut (Figure 19).

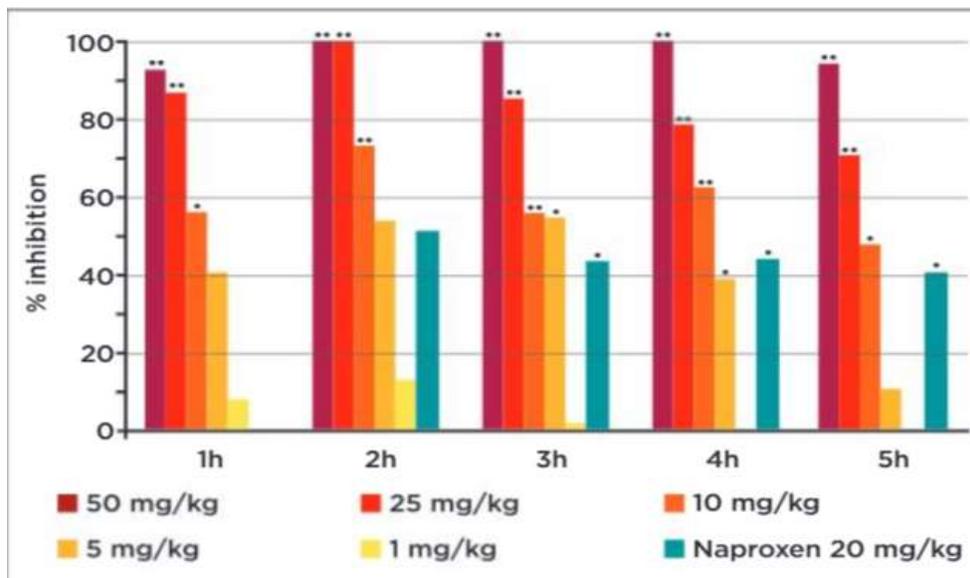


Figure 19 : Effet inhibiteur du latex de *Croton lechleri* sur des œdèmes induits expérimentalement chez le rat par une injection intrapéritonéale de carraghénine (Risco et al, 2003).

On constate par cette expérience que le latex brut présente globalement une action anti-inflammatoire supérieure à la taspine seule puisqu'une concentration de 50 mg/kg a permis d'obtenir une inhibition totale des œdèmes alors que le meilleur résultat obtenu avec de la taspine à 250 mg/kg est une inhibition de 78%.

En 2007, une étude expérimentale réalisée à la maternité de San Bartolomé sur 75 femmes enceintes a démontré l'efficacité de la résine de *Croton lechleri* en application locale pour le traitement de gingivites associées à la grossesse. Les résultats ont montré un effet positif sur l'ensemble des femmes traitées avec une diminution notable des œdèmes, des rougeurs et des saignements 24 heures après l'initiation du traitement. Le traitement conduit sur 30 jours a montré une réduction de 57,3% de l'ensemble des symptômes (Chambilla et Vasquez, 2007).

Une investigation plus approfondie sur l'étude des mécanismes anti-inflammatoires de la sève de *Croton lechleri* a été entreprise en 2010. L'étude d'Ulysse Pereira et collaborateurs a démontré que le sang du dragon avait la capacité de bloquer avec succès une inflammation neurogène cutanée induite expérimentalement. L'essai modélisé *in vitro* a utilisé une co-culture de cellules porcines constituée de kératinocytes et de ganglions rachidiens choisis car ce modèle représente le plus fidèlement, bien que simplifiée, une peau humaine innervée. L'ajout de capsaïcine permet d'induire une libération de substance P et mimétise un modèle d'inflammation neurogène. Un immunodosage enzymatique a été réalisé sur ce modèle afin de mesurer l'influence du sang de dragon sur la libération de substance P, paramètre d'étude choisi car il s'agit du premier évènement se produisant *in vivo* lors d'une inflammation de type neurogénique.

Une exposition courte de 10 minutes a démontré que le sang de dragon inhibait la libération de substance P de façon dose-dépendante avec une inhibition de 32% à une concentration de 1 % et une inhibition de 26% à une concentration de 0,1% par rapport au placebo.

Une incubation d'une heure a permis d'observer une inhibition significative de la libération de substance P avec une réduction de 65 % pour la dilution à 1 % et une réduction de 30 % pour la dilution à 0,1 %.

On constate que l'effet inhibiteur est d'autant plus prononcé que l'incubation est longue. Cet effet n'est toutefois pas une découverte majeure puisque l'inhibition de la libération de substance P par le sang de dragon avait déjà été documentée dans l'étude de Miller *et al* (2000).

Des études antérieures ont démontré le pouvoir cytotoxique de la résine de *Croton lechleri* (Rossi *et al*, 2003). Cela laisse à penser qu'elle pourrait également s'avérer neurotoxique. L'essai de cytotoxicité MTT a démontré une absence totale de neurotoxicité.

Le sang de dragon possède une action anti-inflammatoire dose-dépendante et une capacité d'inhiber à 100 % la libération de substance P induite par la capsaïcine après une incubation prolongée. Le délai d'inhibition est rapide puisqu'il intervient en 10 minutes et l'effet se renforce au fil du temps ce qui laisse à supposer un mécanisme d'action par modulation des récepteurs de la capsaïcine, les récepteurs vanilloïdes (TRPV1) en agissant comme antagoniste ou comme agent modificateur de récepteur.

La sève de *Croton lechleri* présente un intérêt à être utilisée localement pour le traitement des inflammations et des prurits d'autant que sa sécurité d'utilisation en application locale a été démontrée (Pereira *et al*, 2010).

IV-6) Activité anticancéreuse

IV-6-1) Evaluation du potentiel mutagénique et antimutagénique de la sève de *Croton lechleri*.

Le latex de *Croton lechleri* est utilisé en médecine traditionnelle en Amérique latine pour traiter les cancers de façon empirique (Chen et al, 1994). En 2003, une étude italienne menée par D.Rossi et collaborateurs a recherché des propriétés mutagéniques et antimutagéniques chez la sève de *Croton lechleri* sur des souches de *Salmonella typhimurium* T98 et T100.

Un composé est déterminé comme mutagène s'il engendre au minimum le double de colonies mutantes par rapport au taux spontané normalement observé. Le sang de dragon mélangé à des concentrations croissantes à des souches de *Salmonella typhimurium* dans un essai d'incorporation en plaques n'a pas révélé d'activité mutagénique chez *S.typhimurium* TA98 et TA100, ni en présence ni en l'absence d'inducteur de mutagénicité.

L'effet antimutagène, déterminé par le test décrit par Maron et Ames (Maron et al, 1981) est un test d'incorporation en plaques qui utilise un produit testeur de souche spécifique pour *S.typhimurium* TA98 et TA100.

Le sang de dragon à 500 µg/puit a permis d'inhiber 45% des mutants de souches de *S.typhimurium* TA98 en présence de 2-Nitrofluorène, un inducteur de mutagénicité.

Dans le modèle *S.typhimurium* TA100/Azide de sodium, l'inhibition a été de 34% pour une concentration de 1000 µg/puit.

Il s'est également montré efficace sur la prévention de l'action mutagénique du 2-Aminoanthracène en présence d'activateur pour l'ensemble des souches testées. En effet, la mutagénicité de ce dernier a été inhibée complètement sur les souches TA98 (IC50=340µg/ml) et réduite de 90% pour les souches TA100 (IC50=430µg/ml).

L'action antimutagénique vis-à-vis des mutagènes à action directe que sont le 2-Nitrofluorène et l'azide de sodium est présente mais relativement faible. Le résultat remarquable est situé au niveau de l'action antimutagénique sur les mutagènes à action indirecte, ici l'aminoanthracène. En effet, le sang de dragon a été capable d'annihiler totalement cet effet, ce qui est une découverte majeure. Les meilleurs résultats obtenus auparavant étaient ceux obtenus avec les polyphénols de thé noir et de thé vert, dans l'étude menée par Weisburger *et al.* en 1996, où il avait été démontré, à concentration égale, une réduction de 60% des mutants. Le mécanisme d'action sous-jacent n'est pas connu mais il est supposé que les proanthocyanidines du sang de dragon pourrait interagir avec certaines enzymes ce qui inhiberait leur capacité à activer les promutagènes (Rossi et al, 2003).

Ces premiers résultats sont rassurants quant à la sécurité d'usage du sang de dragon en ce qui concerne les risques mutagènes.

IV-6-2) Etude des mécanismes d'action anticancéreux du sang de dragon brut et de l'alcaloïde taspine.

L'effet antiprolifératif de la sève de *C.lechleri* a été évalué à partir d'une lignée cellulaire K562 de leucémie érythrocytaire humaine.

Les résultats ont montré une absence totale de différenciation érythrocytaire des cellules leucémiques ce qui démontre l'effet antiprolifératif du sang du dragon vis-à-vis des cellules leucémiques humaines.

L'IC50 moyenne relevée est de 2.5 ± 0.3 µg/ml dans les trois expériences réalisées (Rossi et al, 2003).

En 2009, une étude de screening avec un lot de composés naturels capables d'induire une apoptose sur des cellules HCT116 de carcinome colorectal humain a permis de découvrir l'effet cytotoxique de la taspine sur ces cellules à une concentration de 10 µM. Le mécanisme d'action de la taspine repose sur une activation de protéines pro-apoptotiques nommées Bax et Bak ainsi que sur un effet de perméabilisation des cellules HCT116.

Il a été observé *in vitro* que la taspine était inhibitrice des enzymes Topoisomérases I et II qui sont la cible d'une classe importante d'agents anticancéreux mais jusqu'à lors, aucune molécule connue utilisée en médecine ne possédait ce double effet inhibiteur. L'effet cytotoxique de la taspine est également observé dans les cellules surexprimant les transporteurs membranaires PgP et MRP à l'origine de résistances aux traitements, elle ne semble donc aucunement impactée par ces transporteurs. Par ailleurs, son pouvoir cytotoxique est réduit sur les cellules présentant une mutation de l'enzyme Topoisomérase II. Cette double inhibition a l'avantage de palier aux phénomènes de résistances couramment observés chez l'une ou l'autre des enzymes et représente une découverte prometteuse. Un travail au niveau de la formulation est nécessaire afin d'optimiser l'action *in vivo* de la taspine en prenant en compte son caractère lipophile et des discussions envisagent son utilisation combinée à un agent cytostatique dans les protocoles de chimiothérapie. Une étude *in vivo* sur des souris a démontré un effet cytotoxique sur des tumeurs xénogreffes, 48 heures après une injection unique à 10 mg/kg. Le problème majeur reste la toxicité importante de la taspine observée à partir de 20 mg/kg dans les premiers essais cliniques (Fayad et al, 2009).

En 2011, une étude chinoise a évalué l'effet de la Taspine *in vivo* et *in vitro* sur des tumeurs HER-2 positives de cancer du sein. L'étude *in vivo* sur des souris porteuses de xénogreffes a montré une

inhibition importante de la croissance tumorale après un traitement de 14 jours à des concentrations de 2,5 et 5 mg/kg (Tableau XIV). L'étude de cytotoxicité sur des cultures de cellules ZR-75-30 de tumeur cancéreuse humaine a montré une inhibition dose-dépendante de la Taspine sur la croissance cellulaire (IC50=1,69µM).

La taspine a également montré une perturbation des cycles cellulaires avec une augmentation du nombre de cellules en phase G2/S et une diminution du nombre de cellules en phase G1 ce qui témoigne d'un effet cytotoxique par blocage du cycle. Sur ces mêmes cellules, la taspine a engendré une diminution d'expression de l'ARNm codant pour les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone lors de l'analyse par Western Blot (Zhan et Zhang 2011).

Tableau XIV : Effets du traitement par la taspine sur l'évolution de croissance de xénogreffes de tissus tumoraux humains de cancer du sein chez des souris (Zhan et Zhang, 2011)

| treatment | Initial body weight (g) | Initial tumor volume (mm ³) | Final tumor volume (mm ³) | Final tumor weight (mg) | Final body weight (g) | tumor growth inhibition (%) | Ratio of body growth (%) |
|---------------------|-------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Control | 18.08 | 108.10 | 1895.25 ± 388.98 | 2166.35 ± 293.61 | 20.17 | - | - |
| Taspine (2.5 mg/kg) | 18.25 | 120.61 | 1419.32 ± 318.23 | 1462.16 ± 460.80 | 20.23 | 32.50 | 10.85 |
| Taspine (5.0 mg/kg) | 17.67 | 117.45 | 787.19 ± 343.23* | 966.03 ± 473.63** | 21.17 | 55.40 | 19.81 |

Values are mean ± standard error of the mean (SEM). *p<0.05, **p<0.01 versus control.

En 2012, un travail de recherche réalisé au Mexique par Angel Josabad Alonso-Castro et collaborateurs a démontré l'effet cytotoxique d'un extrait méthanolique de sève de *Croton lechleri* *in vitro* sur des cellules HeLa. L'extrait a induit une apoptose sur 30% de la population cellulaire (IC50=17 µg/ml). *In vivo*, des administrations intrapéritonéales sur des souris porteuses de tumeurs HeLa ont permis d'obtenir une inhibition de croissance tumorale de l'ordre de 38%, 48% et 59% aux dosages 1, 10 et 50 mg/kg. L'étude de toxicité aiguë sur des souris a également déterminé une LD50 de 356 mg/kg par voie IP et 500 mg/kg par voie orale, des valeurs en corrélation avec les LD50 déterminées sur des rats Wistar dans l'étude de Georgia Perdue et al (1979). Des essais de viabilité cellulaire ont conclu à l'absence d'effet cytotoxique de l'extrait de *Croton lechleri* sur des cellules humaines non cancéreuses (Alonso-Castro et al, 2012).

L'incidence et la morbi-mortalité des mélanomes malins cutanés et des cancers colorectaux ne fait que croître au fil des années ce qui en fait un problème de santé publique majeur et les thérapies disponibles sont parfois partiellement efficaces voire inefficaces. Les mélanomes malins représentent les cancers cutanés les plus sérieux et les plus difficiles à traiter puisque la

résistance aux chimiothérapies et radiothérapies est importante d'où l'intérêt de rechercher de nouveaux composés efficaces et utilisables en thérapie humaine. En 2012, une étude menée par Monica Montopoli, Ricardo Bertin et collaborateurs du Département des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Padua en Italie a observé les actions du sang de dragon et de l'alcaloïde taspine sur la viabilité cellulaire, les cycles cellulaires ainsi que les modifications structurales de lignées cellulaires en culture issues de mélanomes (SK23) et de carcinomes colorectaux (LoVo et HT29). Les composés à tester ont été comparés à deux agents anticancéreux naturels de référence, le taxol et la vinblastine.

- Test de viabilité cellulaire :

L'essai MTT a permis de tester l'activité du sang de dragon et de la taspine isolée sur la prolifération cellulaire des lignées cellulaires cancéreuses. Ce test a pour but l'évaluation de la viabilité cellulaire par l'étude du fonctionnement mitochondrial intracellulaire via l'activité de la succinate deshydrogénase (Mosmann, 1983). Les résultats ont montré une prolifération cellulaire réduite de $67,5 \pm 3,4\%$ sur la lignée SK23 ($IC_{50}=5\mu\text{g/ml}$). En ce qui concerne les cellules de carcinome colorectal (HT29 et LoVo), aucune action significative n'a été relevée. L'action inhibitrice sur les cellules LoVo et HT29 commence à des concentrations dix fois supérieures et les conditions expérimentales ont fait qu'il était impossible de travailler à des concentrations aussi élevées.

La taspine a quant à elle été testée dans les mêmes conditions, sur des plages de concentrations de 1 ng/ml à 1 $\mu\text{g/ml}$. Elle a montré une activité inhibitrice de la viabilité cellulaire à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ envers les lignées SK23 ($IC_{50}=0,6\mu\text{g/ml}$) et HT29 ($IC_{50}=0,8\mu\text{g/ml}$).

La taspine présente un effet cytotoxique à des concentrations environ 10 fois plus basse que la sève brute et semble agir via d'autres mécanismes.

Le test au bleu tryptan a permis d'étudier l'effet du sang de dragon et de la taspine sur les lignées de cellules cancéreuses par une autre approche que l'essai au MTT. Il évalue la viabilité cellulaire via l'observation de l'intégrité structurale de la membrane plasmique. La sève brute et la taspine ont été testées sur les même plages de concentration, de 1 à 25 $\mu\text{g/ml}$, et laisser au contact des cellules HT29 et SK23 pendant 24 et 48 heures.

L' IC_{50} mesurée pour la sève brute est de 10 $\mu\text{g/ml}$ pour les 2 lignées cellulaires et les cellules HT29 ont par ailleurs retrouvé leur aspect de base dans les 48 heures suivant le traitement ce qui témoigne d'un effet réversible.

La taspine montre quant à elle une inhibition croissante au fil du temps ($IC_{50} \geq 1\mu\text{g/ml}$) pour les 2 lignées. Le taxol et la vinblastine ont démontré un haut taux d'inhibition après seulement 24 heures.

- Etude de la morphologie des microtubules par technique d'immunofluorescence :

Le sang de dragon agit directement sur la structure des protéines cellulaires, il a engendré une déplétion structurale des microtubules sur les cellules SK23 et HT29 mais aucune modification de la f-actine, une des principales protéines structurelle, n'a été constatée.

Dans les cellules HT29, aucune modification du cytosquelette n'a été constatée mais on remarque une diminution de l' α -tubuline acétylée, protéine structurelle des microtubules.

La Taspine à 0,5 μ g/mL a quant à elle entraîné une augmentation de l' α -tubuline acétylée et une modification de la morphologie des cellules SK23.

- Etude des cycles cellulaires :

Le sang de dragon à 1 μ g/ml n'a montré aucun effet significatif sur les cellules SK23 après 24 heures d'incubation. A partir de 10 μ g/ml, on observe une augmentation du nombre de cellules en phase G1/G0 à hauteur de 17,7% et une baisse du nombre de cellules en phase S et G2/M de 7,9% et 11,7%. A 50 μ g/ml, on observe une forte diminution des cellules en phase G1/G0 et S et une augmentation du nombre de cellules en phase G0 ce qui est le reflet d'une activité cytotoxique.

La taspine a été testée à des concentrations de 0,1 et 0,5 μ g/ml et n'a pas montré de changements significatifs au niveau du cycle cellulaire (Figure 20).

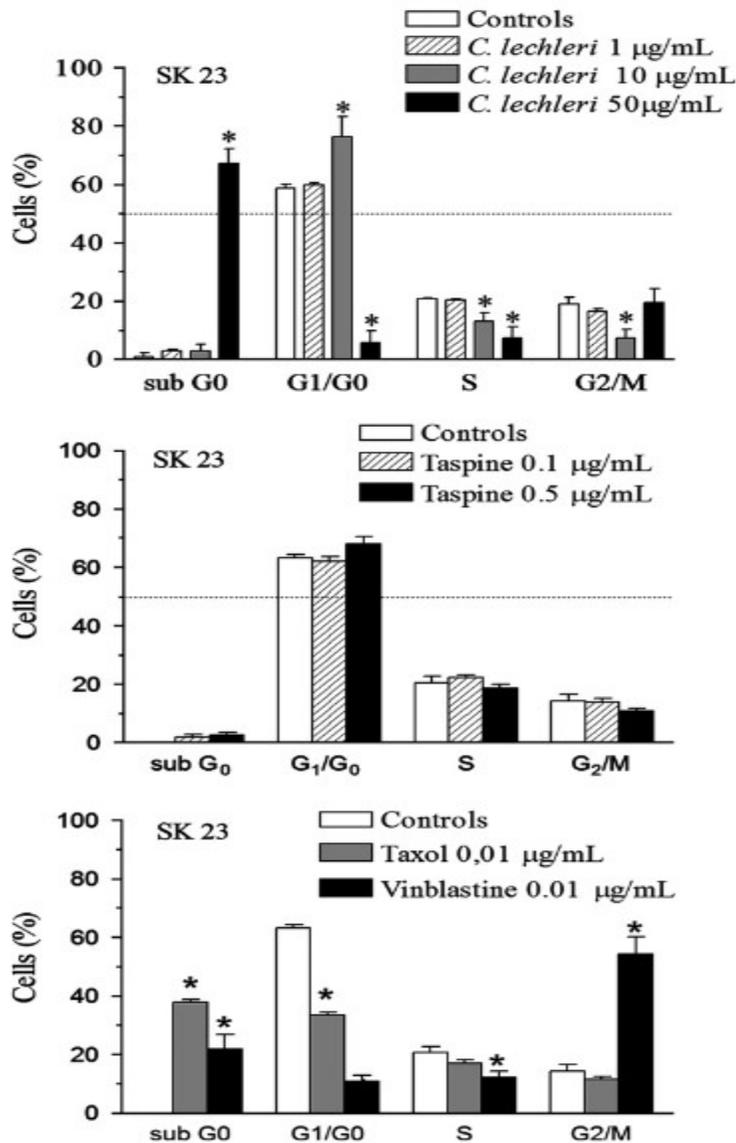


Figure 20 : Effets du sang du dragon et de la taspine sur les cycles cellulaires de lignées cellulaires cancéreuses issues de mélanome (Montopoli et al, 2012)

Le sang de dragon semble avoir un mécanisme d'action proche de la vinblastine alors que la taspine agit au niveau du cytosquelette. La taspine pourrait potentiellement s'inscrire dans une nouvelle classe d'agent anticancéreux dont le mécanisme d'action doit être étudié plus précisément. Le sang de dragon a, quant à lui, montré des actions similaires aux anticancéreux de référence, ce qui signifie que des molécules autre que la taspine interviennent dans les mécanismes cytotoxiques, antiprolifératifs et modificateurs du cycle cellulaire.

Ces découvertes représentent une nouvelle source d'agents anticancéreux potentiellement utilisables en thérapie humaine pour le traitement des cancers colorectaux et des mélanomes malins (Montopoli et al, 2012).

En 2015, un groupe de recherche de l'Université de pharmacie de Xian Jiaotong en Chine a élaboré et testé un dérivé synthétique de la Taspine nommé «12K»(Figure 21). Le but étant de mettre au point un nouvel agent anticancéreux actif sur des cellules A549 issues du carcinome pulmonaire.

Il a été observé un effet inhibiteur de croissance positif sur l'ensemble des tests réalisés. L'essai MTT a démontré un effet cytotoxique positif sur les cellules A549 à une concentration de 7,89 μM . L'étude des cycles cellulaires par cytométrie en flux a révélé un effet cytotoxique à 6 μM . Le mécanisme d'action est basé sur une modulation des protéines Cdks régulatrices du cycle cellulaire.

L'effet cytotoxique est démontré par une induction d'apoptose sur des plages de concentrations de 1,5 à 6 μM via l'augmentation des facteurs pro-apoptotiques que sont les protéines Bad, Bak et Bax et la réduction des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 (Dai et Wang, 2015).

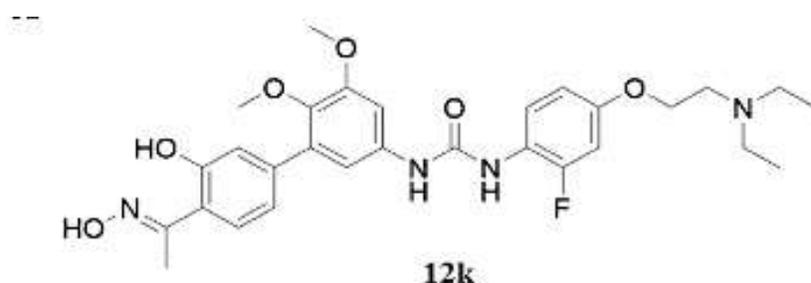


Figure 21 : Structure du 12k, dérivé synthétique de la taspine (Dai et Wang, 2015)

Une étude antérieure réalisée en 2012 avec un autre dérivé de la taspine « HMQ1611 » a démontré un effet inhibiteur de l'angiogénèse dans des cellules endothéliales via une inhibition de la sécrétion de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (LU et al, 2012).

Les tumeurs cancéreuses ont la nécessité de développer une néovascularisation locale afin de leur apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur croissance. La taspine pourrait s'inscrire dans une classe d'agent anticancéreux à visée anti-angiogénique en complément de la chimiothérapie.

Le cancer du poumon reste la première cause de mortalité dans le monde dans le domaine de l'oncologie. Il offre un taux de survie très faible et un traitement souvent peu efficace. La recherche au niveau de l'élaboration de nouvelles chimiothérapies efficaces reste une priorité et cette étude a démontré des résultats prometteurs.

En 2013, un autre dérivé de la Taspine (tas1611) a démontré un effet inhibiteur sur la prolifération de cellules cancéreuses SMMC-7721 issues d'une tumeur hépatique humaine. *In vitro*, l'inhibition a un lien avec les niveaux d'expression des métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-9. Il

s'est également montré efficace *in vivo* sur l'inhibition de la croissance tumorale chez une souris porteuse de xénogreffes SMMC-7721 (IC₅₀=12,3µM) (WANG et al, 2013).

IV-7) Activité anti-diarrhéique du SP303, un oligomère proanthocyanidique isolé du latex de *Croton lechleri*

La résine de *Croton lechleri* est largement utilisée en médecine traditionnelle amérindienne pour le traitement des diarrhées aqueuses et diarrhées induites par le choléra. L'extrait SP303 fut initialement étudié pour ses propriétés antivirales (Ubillas et al, 1994). Cet extrait a été testé empiriquement sur des souris infectées par la toxine cholérique et il a été observé une inhibition de la sécrétion de fluides et d'ions chlorure au niveau de la lumière intestinale (Gabriel et al, 1999). Cette étude a permis de mettre en évidence l'effet de blocage de la sécrétion d'ions chlorures dans les canaux CFTR AMPc dépendants par le SP303 avec une inhibition de 94% des flux.

Une étude clinique de phase II réalisée en 1999 a évalué l'efficacité du SP303 en traitement oral de la diarrhée induite par les traitements antirétroviraux chez des patients sidéens. La diarrhée est un effet secondaire majeur impactant fortement la qualité de vie des patients sous thérapie antirétrovirale. L'étude a été réalisée en double aveugle versus placebo sur un échantillon de 51 patients recevant un traitement antirétroviral ou au minimum un inhibiteur de protéase. Après 4 jours de traitement, le groupe recevant le SP303 a présenté une diminution de la fréquence et du poids des selles. L'examen physique des selles a également montré une diminution de la concentration en chlorures. Par ailleurs, aucun effet indésirable n'a été constaté pendant les 4 jours de traitement. Les résultats de l'étude se sont montrés encourageants et des études supplémentaires ont été envisagées pour évaluer l'efficacité et la tolérance d'un traitement à plus long terme (Holodniy et al, 1999).

Ce médicament initialement développé par la compagnie américaine Shaman Pharmaceuticals, Inc. et baptisé Provir® a nécessité des études cliniques de phase III imposées par la FDA que la compagnie n'a pas pu réaliser pour des raisons financières et le projet Provir a ainsi avorté.

Par ailleurs, cette même compagnie a mis sur le marché le NSF Normal Stool™ en 1999 à base de SB300, un dérivé du SP303 avec un degré de pureté inférieur, avec un statut de complément alimentaire à visée antidiarrhéique. Sa production a par la suite été interrompue définitivement par la firme.

La sécrétion abondante d'ions chlorure est un facteur entraînant des pertes importantes d'eau et de sel aggravant d'autant plus le risque de déshydratation. Jusqu'à lors, aucune molécule capable

de bloquer ces canaux n'était utilisable à des concentrations supportables chez l'Homme. Le SP303 possède un mécanisme d'action extracellulaire puisque son action est quasi-immédiate *in vitro* lors d'une exposition à l'épithélium intestinal. De plus, son poids moléculaire conséquent (~3000 Da) l'empêche de traverser les membranes et il n'est pas détecté dans le sérum des patients (Fischer et al, 2004).

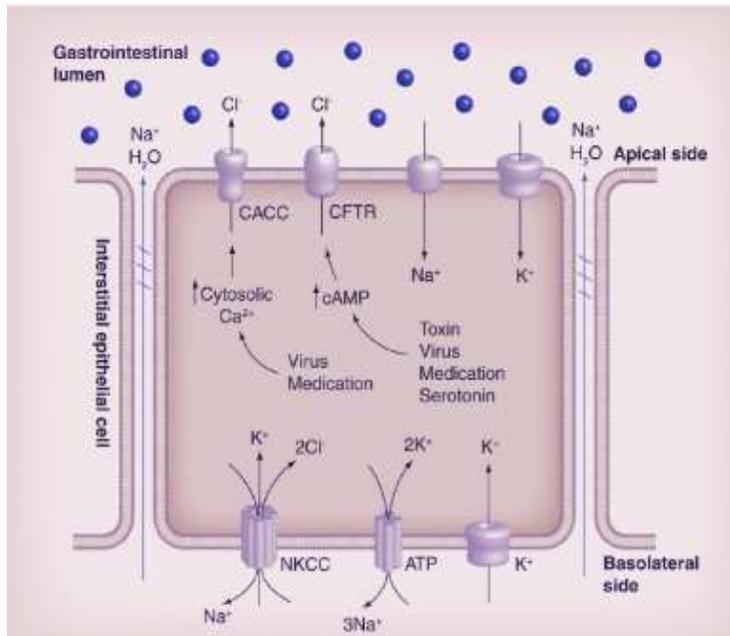


Figure 22 : Mécanisme d'action du SP303 (McAuliffe et al, 2017)

Le SP303 exerce son action pharmacologique au niveau de la membrane apicale des entérocytes par une inhibition de deux des trois canaux chlorures, le CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) et le CaCC (calcium activated chloride channel). Cela induit une réduction de la fréquence des selles par diminution de leurs poids via une sécrétion intestinale réduite (Tradtrantip et al, 2010).

En 2012, une nouvelle étude clinique de phase III a été réalisée avec Crofelemer, l'autre nom donné au SP303, sur un échantillon plus important de 376 patients sidéens.

Le traitement a été globalement bien toléré sur le court comme sur le long terme. Seul 3% des patients ont déclaré quelques effets indésirables : dyspepsie, nausées, constipation et douleurs abdominales.

Crofelemer a par la suite été approuvé par la FDA en 2012 et représente à ce jour le premier et unique extrait d'origine végétale indiqué dans le traitement des diarrhées sécrétoires non infectieuses et des diarrhées induites par traitement antirétroviral. Il s'est avéré efficace en traitement *per os* à une posologie de 250mg par jour (Frampton, 2013).

Le Fulyzaq® est un médicament à usage humain développé par la compagnie Napo Pharmaceuticals, Inc. et dont le principe actif est le SP303. Il est indiqué pour le traitement des diarrhées induites par les traitements antirétroviraux chez les patients sidéens. Ce médicament utilisé aux Etats-Unis n'est toutefois pas autorisé au niveau européen.

Une étude clinique de phase II a été programmée en 2016 pour l'évaluation du SP303 dans le traitement des diarrhées induites par le Pertuzumab chez des patientes atteintes de cancer du sein (Gao et al, 2017).

IV-7-1) Utilisation du SP303 en médecine vétérinaire

Devant le succès du SP303, le monde de la médecine vétérinaire s'est penché sur son utilisation potentielle chez les animaux. En effet, les diarrhées chez les nouveaux-nés représente un problème de santé majeur et il n'existait jusqu'à lors aucun médicament antidiarrhéique antisécrétoire à usage vétérinaire. Une étude du Collège vétérinaire de l'Ithaca a évalué l'effet d'un extrait de SP303 chez 60 veaux Holstein. Les diarrhées ont été induites par une entérotoxine d'*Escherichia coli* et les critères observés sont l'évaluation de la matière fécale sèche ainsi que le score fécal. Les extraits de Crofelemer ont été administrés deux fois par jour durant 3 jours sous deux formulations, une forme standard ainsi qu'une forme gastrorésistante. La formulation gastrorésistante s'est montrée beaucoup plus efficace et a considérablement augmenté le « fecal dry matter » ou l'évaluation du pourcentage de matière fécale sèche comparativement à la formulation standard et au placebo (Teixeira et al, 2015).

La compagnie Jaguar Animal Health, Inc a développé un médicament à usage vétérinaire à base de SP303, le Neonorm™ Foal, il s'agit d'une pâte gastrorésistante en seringue indiquée pour le traitement des diarrhées aqueuses chez le poulain

nouveau-né. Les diarrhées sont fréquentes chez les poulains dans leurs 30 premiers jours de vie et peuvent parfois être fatales ou impacter considérablement l'état de santé des animaux. Le Dr McAuliffe a réalisé la première étude clinique en Argentine en 2015 en collaboration avec des éleveurs afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité du Neonorm™ Foal en combinaison avec des probiotiques.

L'étude a été réalisée sur 61 poulains aléatoirement divisés où chaque groupe a reçu quotidiennement plusieurs doses de Neonorm™ Foal sous forme de seringues orales de 30mL. Le groupe 1 a reçu deux doses, le groupe 2 quatre doses et le groupe 3 une dose de placebo durant 3 jours. Les animaux recevant le Neonorm™ foal ont montré une bonne réponse au traitement et une amélioration clinique notable sur l'ensemble de la période d'observation. Le critère d'efficacité

du traitement atteint étant un score fécal inférieur à 3 maintenu durant 16 heures. Le poids des poulains variant de 37 à 140 kg, le traitement a été administré à des concentrations variant de 2 à 18 mg/kg et aucun effet adverse n'a été notifié. L'étude a donné lieu par la suite à une publication dans le journal vétérinaire *Analecta Veterinari*. Le Neonorm™ Foal est disponible à l'achat sans prescription médicale depuis 2017 sur le territoire américain exclusivement. La firme travaille actuellement sur le développement de nouvelles formulations à base de SB300 destinées aux animaux domestiques (McAuliffe et al. 2017).

Son utilisation devrait logiquement être prohibée chez le chien du fait de l'importante toxicité du SP303 relevée à 35 mg/kg dans l'étude de Ubillas et al.(1994).

IV-8) Activité immunomodulatrice de la sève brute et de l'alcaloïde taspine.

La modulation des paramètres immunitaires par la sève de *Croton lechleri* est citée dans les usages traditionnels mais jusqu'en 2003 les mécanismes d'action n'étaient pas clairement identifiés. Dans une étude expérimentale, Ester Risco et collaborateurs ont décidé d'apporter une accréditation scientifique à cette activité en réalisant des essais *in vitro* sur du sérum humain. L'étude a ciblé l'influence du sang du dragon brut et de l'alcaloïde taspine sur la modulation des voies classiques et alternes du système du complément. Elle porte également sur l'opsonisation de microsphères fluorescentes par cytométrie en flux ainsi que sur la prolifération des splénocytes.

Les résultats ont montré que le sang de dragon possédait un effet immunomodulateur. Il se traduit par une inhibition massive des voies de signalisation du système du complément.

La sève brute et la taspine isolée se sont montrés actifs sur des plages de concentrations de 5 µg/ml à 185 µg/ml. La taspine présente un effet inhibiteur de la voie classique (IC50=38 µg/ml). Cependant, elle ne présente aucune activité notable sur la voie alterne. Les acteurs responsables de l'inhibition de la voie alterne sont les proanthocyanidines. L'étude n'a pas permis de déterminer une relation entre la structure et l'activité de ces dernières bien que les oligomères soient généralement plus actifs que les monomères.

Concernant sa qualité d'opsonine, le sang de dragon est capable de stimuler ou d'inhiber le processus de phagocytose par recrutement de neutrophiles et de monocytes. L'effet observé est opposé en fonction des concentrations auxquelles il est utilisé. En effet, pour des concentrations de 5 µg/ml à 40 µg/ml, la phagocytose est stimulée avec un pic de stimulation à 20 µg/ml. A contrario, on observe une inhibition de 67% à partir de 50 µg/ml.

Cette relation dose-réponse est similaire à celle observée dans l'étude du potentiel antioxydant où l'on observe un effet prooxydant à faible dose et antioxydant à forte dose. La taspine n'a quant à elle montré aucune activité notable sur le recrutement de macrophages. L'activité d'opsonisation

du latex semble lui être conférée par d'autres constituants non identifiés.

Les splénocytes sont des cellules immunitaires issues de la rate pouvant évoluer vers tout type de globules blancs après activation par un antigène ou des cytokines. Le sang du dragon n'a montré aucune activité sur les splénocytes normaux. Il a cependant montré une inhibition importante sur la prolifération de splénocytes activés par de la Concanavaline A, avec une inhibition de 43% à une concentration de 100 µg/mL et une inhibition de 93% pour une concentration de 100 µg/mL. Il présente également un effet inhibiteur sur la prolifération de cellules leucémiques d'origine murine avec une inhibition de 30% à une concentration de 10µg/mL et de 76% pour une concentration de 100µg/mL. Le système du complément est un acteur majeur des mécanismes de défenses immunitaires, il interagit directement avec les voies de l'immunité cellulaire et humorale. Un dysfonctionnement du système du complément peut engendrer la formation de complexes attaquant les membranes à l'origine de nombreuses maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux ou encore la maladie d'Alzheimer. Le sang de dragon serait intéressant en ce sens dans une utilisation à visée inhibitrice du système du complément à l'origine de ces maladies (Risco et al, 2003).

IV-9) Evaluation de la résine de *Croton lechleri* comme milieu de stockage des dents avulsées

Le succès d'une replantation dentaire repose sur le maintien de l'intégrité du cément et du ligament parodontal de la dent avulsée. La sève de *Croton lechleri* a été testée comme milieu de stockage du fait de sa capacité à faciliter la production de collagène mais également pour ses propriétés cicatrisantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Une solution à 10% a été comparée au lait pasteurisé considéré comme le meilleur milieu de stockage existant et au DMEM. Le sang de dragon a démontré une efficacité égale au lait pasteurisé durant l'essai au bleu trypan et un effet supérieur lors du test au MTT. Il a permis de préserver toutes les membranes cellulaires et de maintenir la viabilité fonctionnelle du ligament parodontal (Martins et al, 2016).

Cette étude semble avoir permis de trouver le milieu de stockage parfait pour les dents avulsées. Son utilisation future dans le domaine de l'odontologie semble tout de même peu probable du fait de la difficulté d'obtention de la résine de *Croton lechleri* en milieu médical comparativement aux milieux de stockage actuellement utilisés.

V – Applications cliniques

Un collège de praticiens en médecine complémentaire des C.E.I.A de Lacenas et de Bruxelles a mis en place un vaste projet en 2006, Il repose sur l'utilisation de la sève de *Croton lechleri* comme traitement complémentaire chez des patients présentant divers types de pathologies à composante auto-immunes. Le latex a été préparé et administré en respectant les usages traditionnels et l'efficacité du traitement a quant à lui été évalué par un bilan CEIA. En protéomique fonctionnelle, un bilan CEIA permet d'étudier l'ensemble des protéines d'un organe, d'une cellule ou d'un fluide biologique. Il permet ainsi d'obtenir en temps réel et de façon évolutive une vision globale sur l'état de santé des patients à tout moment. Les cas cliniques présentés ci-après représentent un échantillon de patients traités pour lesquels une réponse significative au traitement a été constatée.

V-1) Traitement des pathologies auto-immunes

Dans le cas d'une patiente atteinte de myopathie nécrosante auto-immune, un traitement à base de sève de *Croton lechleri* a été entrepris pendant 6 mois à une posologie de 10 gouttes 2 fois par jour. La patiente a témoigné d'une disparition quasi-totale de ses douleurs. L'analyse protéomique a quant à elle montré un bilan globalement amélioré, une réactivation du système du complément et un ralentissement de la nécrose tissulaire.

Une autre patiente venue consulter pour une poussée récidiviste d'hépatite auto-immune a reçu un traitement par *Croton lechleri* selon le schéma posologique suivant : 2 gouttes 2 fois par jour pendant 2 semaines puis 5 gouttes 2 fois par jour pendant 10 jours.

A la suite du traitement, le bilan sanguin a montré une normalisation durable des paramètres hépatiques et le profil de protéomique est également amélioré.

V-2) Traitement des pathologies digestives

Les maladies inflammatoires de l'intestin que sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique associent une étiologie auto-immune, inflammatoire et bactérienne sur lesquelles l'utilisation du latex de *Croton lechleri* pourrait s'avérer bénéfique.

Une patiente chez laquelle une rectocolite hémorragique a été diagnostiquée a consulté dans le

cadre de besoins impérieux d'aller à la selle avec des épisodes diarrhéiques sanglants associés à des douleurs abdominales. Le bilan sanguin a montré une élévation de la VS et des neutrophiles, une diminution des lymphocytes et une hyperréactivité des immunoglobulines de surface. L'inefficacité du traitement initié par probiotiques a conduit à la prescription de *Croton lechleri* à raison de 10 gouttes matin et soir pendant 10 jours puis 5 gouttes matin et soir en traitement de fond. La patiente a présenté une évolution clinique favorable suite au traitement avec une normalisation des selles, une disparition des traces de sang, une normalisation de la VS et du ratio neutrophiles/lymphocytes ainsi qu'une diminution de l'hyperréactivité des immunoglobulines exogènes.

V-3) Traitement des pathologies respiratoires

Un adolescent asthmatique consultant en mars 2006 pour des épisodes récidivant d'infections respiratoires pendant la période hivernale présente un bilan de protéomique énonciateur d'une étiologie auto-immune.

La prise de *Croton lechleri* à raison de 10 gouttes matin et soir a permis de réduire les épisodes d'exacerbations infectieuses. Le traitement a été maintenu en continu jusqu'en 2009 et a permis d'améliorer le bilan de protéomique. Par la suite, une prise quotidienne pendant les périodes hivernales a permis d'obtenir une disparition totale des épisodes infectieux.

V-4) Traitement des pathologies ostéo-articulaires

Le latex de *Croton lechleri* a été prescrit chez certains patients comme traitement adjuvant de pathologies ostéo-articulaires à composante auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante, en complément de leur traitement de fond.

Un homme de 42 ans s'étant présenté en consultation pour des douleurs intenses au niveau cervical et lombaire présente une hernie discale C5-C6, une discarthrose et une sciatique gauche. Son traitement de fond à base d'antalgiques et de myorelaxants est insuffisant pour contrôler ses douleurs. L'infiltration à la cortisone n'a montré aucune amélioration. Après une séance de mésothérapie, un traitement est instauré avec le latex de *Croton lechleri* à la posologie de 5 gouttes 3 fois par jour en traitement d'attaque diminué à deux puis une prise par jour en traitement d'entretien. Les résultats obtenus après 2 mois de traitement dépassent les attentes, ce patient a témoigné d'une diminution quasi complète de ses douleurs arthrosiques ce qui lui a permis d'arrêter définitivement la prise d'antalgiques et de myorelaxants. A l'heure actuelle, cela fait plusieurs années qu'il utilise la sève de *Croton lechleri* quotidiennement comme unique traitement de fond à raison de 5 gouttes par jour avec une augmentation des doses si nécessaire lors des

poussées inflammatoires.

Ce même traitement a été prescrit chez une femme de 81 ans souffrant d'arthrose cervicale diffuse. Malgré une aggravation transitoire des douleurs en début de traitement, une amélioration progressive et durable a permis d'arrêter les séances de mésothérapie.

Enfin, une patiente de 69 ans consultant pour une gonalgie bilatérale induite par une destruction du cartilage et sur laquelle le paracétamol n'a aucun effet a reçu une prescription de *Croton lechleri* à raison de 5 gouttes matin et soir en complément de son traitement de fond. Elle a témoigné d'une diminution rapide et importante de ses douleurs et a maintenu le traitement pendant 4 ans.

V-5) Traitement des pathologies cutanéomuqueuses

Dans cet essai thérapeutique, le latex de *Croton lechleri* a été évalué en application topique pour le traitement des lésions du col utérin induites par HPV et des aphtes buccaux récidivants.

Dans le cas des lésions virales induites par le papillomavirus, le protocole de soin suggéré consiste en une irrigation vaginale 2 fois par jour avec une solution composée de 10 gouttes de *Croton* diluée dans 10 ml d'eau stérile.

Chez les patientes ayant suivi ce protocole, une négativation du virus a été observée et dans certains cas la conisation du col utérin a été évitée grâce au traitement.

Dans les cas des aphtes buccaux, deux protocoles de soin ont été proposés. Le premier repose sur l'utilisation de bains de bouche avec la même solution que décrite précédemment ou l'application directe d'une goutte de latex pur au niveau de la lésion.

Dans les 2 cas, il a été constaté une amélioration clinique notable, les patients ont vu leur « gêne » diminuée, la durée de cicatrisation est accélérée et l'inflammation locale réduite. La guérison totale est généralement obtenue en une dizaine de jours et les récurrences fortement réduites.

Ce projet de longue date a globalement été une réussite. Les patients ont répondu de manière surprenante au latex de *Croton lechleri*, parfois au-delà des attentes des prescripteurs. Les pathologies sur lesquelles le latex s'est montré efficace sont nombreuses et le traitement a parfois permis à ces patients de stopper des traitements lourds et devenant insuffisamment efficaces. L'avantage de l'utilisation de la sève de *Croton* est qu'elle est globalement bien tolérée, aucun effet indésirable majeur n'a été notifié. Dans le cas des maladies à caractère auto-immun, le traitement doit être conduit sur une longue période pour obtenir un rééquilibrage du bilan protéomique d'autant

que ces pathologies sont généralement installées depuis de nombreuses années (Dorfman et al, 2016).

La résine de *Croton lechleri* n'a pas la prétention de se substituer aux traitements de fond des pathologies chroniques mais pourrait s'inscrire dans le cadre du traitement global de certaines pathologies associant les médicaments, les règles hygiéno-diététiques et les thérapies complémentaires. De plus elle présente un bénéfice/risque positif total puisque les effets adverses sont quasiment inexistantes.

VI – Production, commercialisation et cadres réglementaires

Avant 1990, le sang de dragon était exclusivement commercialisé en Amazonie par des réseaux de fournisseurs locaux. La compagnie Shaman Pharmaceuticals, Inc. spécialisée dans le développement de médicaments à partir de plantes tropicales, a permis de faire connaître le sang de dragon dans le monde entier dans les années 90. La première plantation de *Croton lechleri* a vu le jour en 1990 en Amazonie équatoriale. L'exportation a alors commencé vers les Etats-Unis et la quantité exportée n'a fait que croître d'années en années, passant de 320kg en 1990 à 26 tonnes en 2002. A partir de 1996, le Chili, l'Italie, la Lituanie, l'Ukraine, la Russie et l'Espagne ont également commencé à s'intéresser au sang de dragon de par la publicité faite par les médias et ont commencé à en importer. Cette influence de la médiatisation appuyée par des études scientifiques a apporté du crédit au sang de dragon et les populations occidentales ont commencé à l'utiliser couramment. Le gouvernement péruvien a aidé les producteurs locaux à professionnaliser la production, le conditionnement et l'expédition en créant des structures et en modernisant le système ce qui apporte une valeur ajoutée au produit.

Par le biais d'accords contractuels avec les cultivateurs locaux, des organisations gouvernementales ainsi que des compagnies privées, Shaman Pharmaceuticals, Inc. a également promu et financé de nombreuses recherches sur le sang de dragon. Elle a encouragé la reforestation de *Croton lechleri* en Colombie, en Equateur et au Pérou dans un but écologique et pour permettre également d'apporter à ces pays une ressource économique importante. Il est essentiel de procéder à des reforestations et de maintenir une chaîne de production pérenne et responsable afin d'assurer un approvisionnement continu d'un produit de qualité et conforme aux normes pharmaceutiques. Les plantations de *Croton lechleri* ont également été entreprises dans une volonté de préservation de la flore locale et de respect des populations (Alexiades, 2002).

Le *Croton lechleri* se développe dans un biotope amazonien et sa culture est limitée à l'Amérique latine. De plus, nous savons que la récolte par coulée engendre la mort lente de l'arbre et qu'un délai de 7 à 8 années est nécessaire à l'obtention d'un latex de qualité ce qui rend sa production limitée et en fait un produit relativement onéreux lorsqu'il est pur.

Le sang de dragon peut facilement être acheté dans le commerce, dans des boutiques en ligne de produits naturels où il peut se présenter sous la forme de sève pure, d'extraits glycélinés ou de pommades. Il est dans ce cadre vendu avec le statut de « complément alimentaire à visée antioxydante et immunostimulante » ou en tant qu' « actif cosmétique à visée régénératrice et anti-âge ». Son utilisation par voie topique est tout à fait recommandée et n'expose à aucun risque particulier en dehors d'une réaction d'intolérance. Son utilisation par ingestion orale semble également acceptable du fait que les études réalisées ont montré une absence d'effets

indésirables directs et une absence de cytotoxicité et de génotoxicité. Il est toutefois important de « faire le tri » dans ce qu'il est possible de trouver. La sève de *Croton lechleri* a initialement été autorisée par les autorités belges en tant que complément alimentaire via l'attribution d'un numéro Nut. A ce jour, les fournisseurs français possédant l'agrément pour la vente de sève de *Croton lechleri* sont peu nombreux. L'obtention d'une autorisation nécessite l'élaboration d'un dossier auprès de la DGCCRF attestant que le produit commercialisé répond aux normes européennes en matière d'approvisionnement, de contrôle bactériologique avant flaconnage et de respect des taux limites imposés en taspine et en polyphénols ($\leq 10,5\%$ de polyphénols, $\leq 1,7\%$ de Taspine). Il est donc possible d'en commercialiser légalement en pharmacie en se fournissant auprès d'un fournisseur agréé. La boutique en ligne Pierre d'Astier, spécialisée dans la vente de produits de phytothérapie, possède cette autorisation. Le latex vendu par Pierre d'Astier provient du laboratoire espagnol RODA qui est le premier laboratoire, au niveau européen, à avoir obtenu l'autorisation de conditionnement et distribution de la sève de *Croton lechleri* en tant que complément alimentaire.



Figure 23 : Flacon de latex de *Croton lechleri* commercialisé par le laboratoire Pierre d'Astier (« LTX 5 - Croton L. Gouttes » s. d.)

Par ailleurs, le 14 mars 2013, le règlement d'exécution 230/2013 de la Commission européenne a interdit l'utilisation de tout type d'extraits de *Croton lechleri* en tant qu'additif dans l'alimentation animale.

Dans le domaine de la parapharmacie, de nombreuses marques de produits dermocosmétiques ont intégré de la résine de *Croton lechleri* dans la formulation de leurs produits, notamment pour ses vertus régénératrices et antioxydantes.

Dans la gamme Garancia, la crème hydratante et anti-âge « Diabolique Tomate ® » contient de la résine de *Croton lechleri*. On en retrouve également dans la BB crème « Le Chardon et le marabout ® » destinée aux peaux à imperfections ou présentant de petites cicatrices ainsi que dans le sérum anti-âge « Immortal express shot ® »

La gamme Uriage intègre du sang du dragon dans la formulation de tous les produits de leur gamme « Age protect ® multi-actions» excepté le soin destiné au contour des yeux.

On retrouve également de la résine de *Croton lechleri* dans la crème réparatrice Miel de thym de la marque Famille Mary et dans la lotion régénératrice de la marque Ekia.

Les produits cosmétiques ne sont pas des médicaments et il n'existe pas d'autorisation préalable de mise sur le marché pour l'intégration d'extraits de plantes. Les organismes commerciaux ont la responsabilité juridique en ce qui concerne la sécurité des produits mis sur le marché. Les études cliniques ont globalement démontré une innocuité quant à un usage du sang de dragon en application externe. Son intégration à des produits dermocosmétiques ne semblent pas exposer les utilisateurs à un risque particulier d'autant que les concentrations utilisées sont relativement faibles.

VII – Conclusion

La sève de *Croton lechleri* connue pour ses multiples propriétés représente un véritable trésor de la nature et un des piliers de la médecine traditionnelle amazonienne. Il ne faut pas oublier que cette médecine traditionnelle était autrefois l'essence même de la majorité des pratiques médicales et des enseignements en médecine. Les coutumes et observations ancestrales des guérisseurs d'Amazonie sont une richesse à prendre en considération et à exploiter d'avantage pour faire avancer la médecine moderne. Je suis convaincu que des études futures permettront de découvrir des composés avec des mécanismes d'action encore inconnus et pouvant pallier à des problèmes de Santé publique actuels tels que la résistance aux antibiotiques ou les effets indésirables de certains médicaments.

Des chercheurs du monde entier se sont penchés sur la sève de *Croton lechleri* afin d'élucider les mécanismes d'action impliqués dans les usages traditionnels. Dans la quasi-totalité des études menées, les résultats se sont montrés concluants et souvent au-delà des espérances.

Le latex de *Croton lechleri* est un mélange complexe, dont les principaux composés actifs identifiés sont des polyphénols, des terpènes et des alcaloïdes.

Le sang de dragon est un puissant cicatrisant. Il favorise également la cicatrisation des ulcères par ses actions anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne vis-à-vis de *Helicobacter pylori* et par une stimulation de la formation de mucus gastrique. Il possède par ailleurs un spectre d'action antibactérien très large ainsi que des activités fongicides, antiparasitaires et antivirales.

Il possède par ailleurs une activité immunomodulatrice en agissant principalement au niveau du système du complément.

La proanthocyanidine nommée SP303 présente dans la sève de *Croton lechleri* lui confère une activité anti-diarrhéique anti-sécrétoire via une inhibition de canaux chlorures au niveau de la paroi intestinale. Cette proanthocyanidine constitue par ailleurs le principe actif de plusieurs médicaments tels que le Fulyzaq® ou le Neomorm™ Foal distribués aux Etats-Unis.

Le sang de dragon et notamment son alcaloïde, la taspine, possède une activité anti-inflammatoire via une inhibition de libération de substance P et des gènes pro-inflammatoires.

Le mélange de polyphénols que contient le latex lui confère une activité anti-oxydante équivalente à supérieure aux antioxydants de référence tels que le Trolox ou l'acide ascorbique.

Enfin, la sève brute et la taspine ont également démontré des activités anticancéreuses par une action cytotoxique ou antiproliférative sur diverses lignées de cellules cancéreuses.

La sève de *Croton lechleri* est un produit qui mérite de se faire d'avantage connaître en Europe et d'être utilisée en médecine complémentaire où elle possède un réel potentiel et en automédication. Il est de la responsabilité du pharmacien de conseiller ce produit à certains patients, en

complément de leur traitement médicamenteux, dans un contexte de pathologies chroniques à composante inflammatoire et/ou immunitaire. En effet, sa prise concomitante aux médicaments ne peut être que bénéfique pour le patient car sa prise est simple, bien tolérée et constitue un traitement étiologique et symptomatique contrairement aux médicaments à visée symptomatique pure.

Les sources d'approvisionnement fiables du sang de dragon étant très limitées, il est toutefois primordial de les sélectionner avec précaution afin d'éviter les produits ne répondant pas aux normes européennes et toute contrefaçon.

Le sang de dragon sous ses diverses formulations a pour moi sa place derrière le comptoir d'une pharmacie. A l'instar d'une huile essentielle de lavande vraie, la sève de *Croton lechleri* est un produit multi-usage.

Les études concernant son utilisation par voie topique comme par ingestion orale sont rassurantes puisque le produit ne présente aucune toxicité chez l'homme et qu'aucun effet indésirable n'a été notifié dans les études cliniques réalisées. L'utilisation chez la femme enceinte ou allaitante est toutefois à éviter du fait du manque d'études à ce niveau pour le moment.

D'une manière générale, la synergie d'action apportée par les composés de la sève brute a permis d'obtenir une efficacité supérieure aux composés isolés. Dans certains cas, il n'a pas été possible d'associer une action avec un composé actif et un mécanisme d'action précis et pour ces raisons des études supplémentaires doivent encore être menées.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexiades, Miguel. 2002. « Sangre de drago (Croton lechleri) - Alexiades ». In .
Disponible sur :
https://www.academia.edu/446167/Alexiades_M._2002._Sangre_de_drago_Croton_lechleri_Chapter_edited_volume_
- Alonso-Castro, Angel Josabad, Elizabeth Ortiz-Sánchez, Fabiola Domínguez, Gabriela López-Toledo, Marco Chávez, Angel de Jesús Ortiz-Tello, et Alejandro García-Carrancá. 2012. « Antitumor effect of Croton lechleri Mull. Arg. (Euphorbiaceae) ». *Journal of Ethnopharmacology* 140 (2): pp. 438-442. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.009>.
- Cai, Y., Z. P. Chen, et J. D. Phillipson. 1993a. « Diterpenes from Croton lechleri ». *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry*, 32 (3): pp. 755-760.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95166-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95166-5).
- Cai, Y., Z. P. Chen, et J. D. Phillipson 1993b. « Clerodane diterpenoids from Croton lechleri ». *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry*, 34 (1): pp. 265-268.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90816-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90816-1).
- Cai, Y., F. J. Evans, M. F. Roberts, J. D. Phillipson, M. H. Zenk, et Y. Y. Gleba. 1991.
« Polyphenolic compounds from Croton lechleri ». *Phytochemistry* 30 (6): pp. 2033-2040.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85063-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85063-6).
- Castillo-Quiliano, Andrés, et Gilberto Domínguez-Torrejón. 2010. « Evaluation of the “dragon’s blood” (Croton lechleri) latex production, taking into consideration its diameter and four periods of rainfall in natural populations from Ucayali, Peru ». *Ecología Aplicada* 9 (2): pp. 61-69.
- Cayo, César. 2016. « Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del Croton lechleri sobre cultivos de Streptococcus mutans (ATCC 25175) ». *Ciencia y Desarrollo*,
<http://dx.doi.org/10.21503/CienciayDesarrollo.2014.v17i1.01>
- Cevallos-Verdesoto, Diego Omar, Carmita Jaramillo-Jaramillo, Osmany Cuesta-Rubio, Jorge Zaldua, Gaston Garcia-Simon, et Luisa Rojas de Astudillo. 2016. « Composicion quimica, actividad cicatrizante y toxicidad del latex de Croton lechleri ». *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, nº 2: 95.
- Chambilla, José Luiz Lazo, et Maria Pareja Vasquez. « Extracto de Croton lechleri y de Pelargonium robertianum L. en el tratamiento de la gingivitis asociada al embarazo ». *Kiru*. 2007; 4(2): pp. 52-59
- Chen, Zhen-Ping, Ya Cai, et J. Phillipson. 1994. « Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon’s Blood ». *Planta Medica* 60 (06): pp. 541-545.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-959567>.

- Corrales Ramírez, Lucia, Adriana Castillo Castañeda, et Andrea Melo Vargas. 2013. « Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas ». *instname:Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Nova* [online]. 11(19), pp. 51-63
- Dai, Bingling, et Wenjie Wang. 2015. « Novel taspine derivative 12k inhibits cell growth and induces apoptosis in lung cell carcinoma ». 2015. *Biomedecine & Pharmacotherapy* (70) pp. 227-233
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.024>
- De Marino, Simona, Fulvio Gala, Franco Zollo, Sara Vitalini, Gelsomina Fico, Francesco Visioli, et Maria Iorizzi. 2008. « Identification of Minor Secondary Metabolites from the Latex of *Croton Lechleri* (Muell-Arg) and Evaluation of Their Antioxidant Activity ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 13 (6): pp. 1219-1229.
<https://doi.org/10.3390/molecules13061219>
- Desmarchelier, C., F. Witting Schaus, J. Coussio, et G. Cicca. 1997. « Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals ». *Journal of Ethnopharmacology* 58 (2): pp. 103-108. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00087-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00087-1).
- Dorfman, Pierre, Sabine Fischer, Alain Reymond, Herbosch Sus, et Antonio Marco-Chover. 2016. « Applications cliniques du latex de *Croton lechleri*, plante majeure de la tradition amazonienne ». calameo.com. 2016.
 Disponible sur : <https://fr.calameo.com/books/00214290299c172f3be08>
- « Dračí krev - *Croton Lechleri* ». s. d. <http://www.jungle-medicine.eu/eshop/zluta-linie/croton-lechleri>.
- Ester, Rico, José Iglesias, et Canigüeral Salvador. 2001. « Intérêt thérapeutique du latex de *Croton lechleri* ». 12^{ème} Forum de Natura Rerum. Paris, 20-21 de Octobre. 2001
- Fayad, Walid, Mårten Fryknäs, Slavica Brnjic, Maria Hägg Olofsson, Rolf Larsson, et Stig Linder. 2009. « Identification of a Novel Topoisomerase Inhibitor Effective in Cells Overexpressing Drug Efflux Transporters. » *PLoS ONE* 4 (10): p. 7238.
 doi: [10.1371/journal.pone.0007238](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007238)
- Fischer, Horst, Terry E Machen, Jonathan H Widdicombe, Thomas J. S Carlson, Steven R King, John W. S Chow, et Beate Illek. 2004. « A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells ». *Journal of Ethnopharmacology* 93 (2–3): pp. 351-357.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.005>.
- Foddai, Marzia, Marianna Usai, Grazia Fenu, Mauro Marchetti, et Domenico Carotenuto. 2006. « Caratterizzazione della taspina ed attività su cute umana coltivata di “sangre de grado” (*Croton lechleri* Müll. Arg.) ». In . Cagliari, Italia: University of Sassari. Disponible sur : <http://eprints.uniss.it/968/#?>

- Frampton, James. 2013. « Crofelemer: A Review of its Use in the Management of Non-Infectious Diarrhoea in Adult Patients with HIV/AIDS on Antiretroviral Therapy ». *Drugs* 73 (10): pp. 1121-1129.
doi: 10.1007/s40265-013-0083-6
- Gabriel, S. E., S. E. Davenport, R. J. Steagall, V. Vimal, T. Carlson, et E. J. Rozhon. 1999. « A Novel Plant-Derived Inhibitor of CAMP-Mediated Fluid and Chloride Secretion ». *The American Journal of Physiology* 276 (1 Pt 1): pp. 58-63.
doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.1.G58.
- Gao, Jennifer J., Ming Tan, Paula R. Pohlmann, et Sandra M. Swain. 2017. « HALT-D: A Phase II Evaluation of Crofelemer for the Prevention and Prophylaxis of Diarrhea in Patients With Breast Cancer on Pertuzumab-Based Regimens ». *Clinical Breast Cancer* 17 (1): pp. 76-78.
<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.08.005>.
- Gupta, Deepika, Bruce Bleakley, et Rajinder K. Gupta. 2008. « Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses ». *Journal of Ethnopharmacology* 115 (3): pp. 361-380.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.018>.
- Herforth, Anna, Estéban Mosquera, Juan Ruiz, Maria Laux, et Eloy Rodriguez. 2001. « Amazonian Women's Medicine: Treatments for Mycoses ».
Disponible sur :
https://www.researchgate.net/publication/266266886_Amazonian_Women's_Medicine_Treatments_for_Mycoses
- Holodniy, Mark, Johannes Koch, Mark Mistal M.S.N, Jamey Maimares Schmidt R.D, Atul Khandwala, James E Pennington, et Steven B Porter. 1999. « A double blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the safety and efficacy of orally administered SP-303 for the symptomatic treatment of diarrhea in patients with AIDS ». *The American Journal of Gastroenterology* 94 (11): pp. 3267-3273.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00594-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00594-8).
- Iwanicki, Mark. 2017. « Dragon's Blood ». Dr. Mark Iwanicki, ND. 2017.
<https://drmarkiwanicki.com/blog/2017/1/24/a2596vran0fq433wiqepjlcfd5qkr>
- Llontop, Luis Felipe Gonzáles, et José Llanos Quevedo. 2014. « Efecto gastroprotector del extracto total de Solanum tuberosum L. var."papa blanca" y Croton lechleri L. "sangre de grado" EN Rattus rattus var. albinus con daño gástrico por acción del etanol ». *SCIÉND* 15 (2). Disponible sur :
<http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/486>.
- Lopes, Maria Inez Lopes e, Jenifer Saffi, Sérgio Echeverrigaray, João Antonio Pêgas Henriques, et Mirian Salvador. 2004. « Mutagenic and antioxidant activities of Croton lechleri sap in biological systems ». *Journal of Ethnopharmacology* 95 (2–3): pp. 437-445.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.025>.
- « LTX 5 - Croton L. Gouttes ». s. d. <https://www.pierredastier.com/complements-alimentaires/seve-de-croton-lechleri-ltx-5-gouttes,fr,4,3002.cfm>.

- LU, WEN, BINGLING DAI, WEINA MA, et YANMIN ZHANG. 2012. « A novel taspine analog, HMQ1611, inhibits growth of non-small cell lung cancer by inhibiting angiogenesis ». *Oncology Letters* 4 (5): pp. 1109-1113. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.855>.
- Martins, Christine Men, Elizane Ferreira Hamanaka, Thayse Yumi Hoshida, Ana Maria Sell, Mirian Marubayashi Hidalgo, Catarina Soares Silveira, Wilson Roberto Poi, et al. 2016. « Dragon's Blood Sap (Croton Lechleri) As Storage Medium For Avulsed Teeth: In Vitro Study Of Cell Viability ». *Brazilian Dental Journal* 27 (6): pp. 751-756. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600987>.
- McAuliffe, Siobhan, Martina Deferrari, Celina Ambrosoni, Amalia Tejera, Horacio Berrotarán, Bernardo Echaniz, et Juan Cortés. 2017. « Safety and Efficacy of a Combined Paste Formulation of a Botanical Extract of the Latex of Croton Lechleri (SB-300, Neonorm Foal™) with Probiotics for the Treatment of Watery Diarrhea in Nursing Foals ». *Analecta Veterinaria* 37 (2): p. 011. <https://doi.org/10.24215/15142590e011>.
- Milanowski, Dennis J., Rudolph E. K. Winter, Memory P. F. Elvin-Lewis, et Walter H. Lewis. 2002. « Geographic Distribution of Three Alkaloid Chemotypes of Croton lechleri ». *Journal of Natural Products* 65 (6): pp. 814-819. <https://doi.org/10.1021/np000270v>.
- Miller, Mark J. S., Wallace K. MacNaughton, Xiao-Jing Zhang, Jane H. Thompson, Randi M. Charbonnet, Paul Bobrowski, Juan Lao, Ann Marie Trentacosti, et Manuel Sandoval. 2000. « Treatment of Gastric Ulcers and Diarrhea with the Amazonian Herbal Medicine Sangre de Grado ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (1): pp. 192-200.
- Montopoli, Monica, Riccardo Bertin, Zheng Chen, Jenny Bolcato, Laura Caparrotta, et Guglielmina Froidi. 2012. « Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines ». *Journal of Ethnopharmacology* 2012 Dec 18;144(3):pp. 747-53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.032>.
- Namjoyan, Foroogh, Fatemeh Kiashi, Zahra Beigom Moosavi, Fatemeh Saffari, et Behzad Sharif Makhmalzadeh. 2016. « Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial ». *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 6 (1): pp. 37-40. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.029>.
- Ortiz, Tamariz, Jesús Humberto, Roberto Capcha Mendoza, Palomino Cadenas, Edwin Julio, et José Aguilar Olano. 2003. « Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (Croton lechleri) frente al Helicobacter pylori ». *Revista Medica Herediana* 14 (2): pp. 81-88.
- Perdue, Georgia Persinos, Ralph N. Blomster, David A. Blake, et Norman R. Farnsworth. 1979. « South American Plants II: Taspine Isolation and Anti-Inflammatory Activity ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 68 (1): pp. 124-126. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680145>.

- Pereira, Ulysse, Caridad Garcia-Le Gal, Grégoire Le Gal, Nicholas Boulais, Nicolas Lebonvallet, Germaine Dorange, Luc Lefeuvre, Agnès Gougerot, et Laurent Misery. 2010. « Effects of Sangre de Drago in an in Vitro Model of Cutaneous Neurogenic Inflammation ». *Experimental Dermatology* 19 (9): pp. 796-799.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01090.x>.
- Phillipson, J. David. 2007. « Phytochemistry and pharmacognosy ». *Phytochemistry, Highlights in the Evolution of Phytochemistry: 50 Years of the Phytochemical Society of Europe*, 68 (22): pp. 2960-2972. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.028>.
- Pieters, L, et T De Bruyne. « In vivo wound healing activity of Dragon's Blood (Croton spp.) a traditional South American drug, and its constituents ». 1995. *Phytomedicine*. 2(1):pp.17-22.
[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80043-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80043-7)
- Risco, Ester, Felipe Ghia, Roser Vila, José Iglesias, Elida Alvarez, et Salvador Cañigüeral. 2003. « Immunomodulatory Activity and Chemical Characterisation of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from Croton Lechleri ». *Planta Medica* 69 (9): pp. 785-794.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-43208>.
- Rossi, D., R. Bruni, N. Bianchi, C. Chiarabelli, R. Gambari, A. Medici, A. Lista, et G. Paganetto. 2003. « Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of Croton lechleri (Muell. Arg.) latex ». *Phytomedicine* 10: pp. 139-144.
- Roumy, Vincent, Andréa-Luz Gutierrez-Choquevilca, Jean Pierre Lopez Mesia, Lastenia Ruiz, Juan Celidonio Ruiz Macedo, Amin Abedini, Ameni Landoulsi, et al. 2015. « In Vitro Antimicrobial Activity of Traditional Plant Used in Mestizo Shamanism from the Peruvian Amazon in Case of Infectious Diseases ». *Pharmacognosy Magazine* 11 (44): 625.
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.172975>.
- Salatino, Antonio, Maria L. Faria Salatino, et Giuseppina Negri. 2007. « Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae) ». *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18 (1): pp. 11-33. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>.
- Santos, Ana Paula Azevedo, Selma Guidorizzi Antônio Pacheco, et Carolina Bioni Garcia Teles. 2015. « Efeito Leishmanicida in Vitro Do Látex de Croton Lechleri (Euphorbiaceae) ». *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 36 (3).
Disponível sur : <https://doaj-org.bases-doc.univ-lorraine.fr/article/67dbde0fbd6d4403af4ea749247cde74>
- Silva, Daniel Silveira da. 2016. « Evolução de úlceras em membros inferiores de pessoas com diabetes tratadas com pomada à base de Croton Lechleri Müll. Arg. », avril.
Disponível sur : <http://hdl.handle.net/10737/964>
- Taylor, Leslie. 2005. *The Healing Power of Rainforest Herbs*. Square One Publishers. 268 p.

- Teixeira, A.g.v., L. Stephens, T.j. Divers, T. Stokol, et R.c. Bicalho. 2015. « Effect of crofelemer extract on severity and consistency of experimentally induced enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in newborn Holstein calves ». *Journal of Dairy Science* 98 (novembre): pp. 8035-8043. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9513>.
- Tradtrantip, Lukmanee, Wan Namkung, et A. S. Verkman. 2010. « Crofelemer, an Antisecretory Antidiarrheal Proanthocyanidin Oligomer Extracted from *Croton Lechleri*, Targets Two Distinct Intestinal Chloride Channels ». *Molecular Pharmacology* 77 (1): 69. <https://doi.org/10.1124/mol.109.061051>.
- Ubillas, R, S.D Jolad, RC Bruening, et M.R Kernan. 1994. *SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of Croton lechleri (Sangre de Drago)*. Vol. 1. <https://www-sciencedirect-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/science/article/pii/S0944711311800267>. DOI: 10.1016/S0944-7113(11)80026-7
- Vásquez, Gallardo, Guillermo José, et Laura Barboza Mejía. 2015. « Healing effect of latex gel prepared with *Croton lechleri* “Sangre de Drago” ». *Revista Científica Ciencia Médica* 18 (1): pp. 10-16.
- WANG, NAN, LEI ZHENG, YINGZHUAN ZHAN, et YANMIN ZHANG. 2013. « A novel taspine derivative suppresses human liver tumor growth and invasion in vitro and in vivo ». *Oncology Letters* 6 (3): pp. 855-859. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1452>.
- Zhan, Yingzhan, et Yanmin Zhang. 2011. « Activity of Taspine Isolated from *Radix et Rhizoma Leonticis* against Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer ». *Fitoterapia*. 2011 Sep;82(6):pp. 896-902. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.05.004>.

N° d'identification : 10668

TITRE

LE SANG DE DRAGON : USAGES ANCESTRAUX DE LA SÈVE DE CROTON LECHLERI EN MÉDECINE TRADITIONNELLE AMÉRINDIENNE ET APPLICATIONS MÉDICALES EN OCCIDENT

Thèse soutenue le 26 avril 2019

Par Jonathan GOFFREDI

RESUME :

La forêt amazonienne rassemble une multitude d'espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle. Parmi elles, l'espèce d'arbre *Croton lechleri* occupe une place prépondérante et sa sève couramment nommée « sang de dragon » de par sa couleur « rouge sang » est largement utilisée dans de nombreuses indications depuis des siècles. Les ethnopharmacologues du monde entier se sont basés sur les usages traditionnels du sang de dragon pour réaliser de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* afin de comprendre les mécanismes d'actions de la sève dans ses différentes utilisations traditionnelles et dans la mesure du possible, d'identifier les molécules actives pharmacologiquement. L'utilisation de la sève de *Croton lechleri* en médecine moderne n'en est qu'à ses débuts mais les résultats des premiers essais cliniques sont prometteurs et ouvrent des possibilités d'utilisations futures nombreuses, notamment dans les domaines de la médecine complémentaire liée à l'oncologie et à l'immunothérapie. La compagnie américaine Shaman Pharmaceuticals a en grande partie contribué à l'essor de cette sève par le financement d'études, de programmes de reforestation de *Croton lechleri* et de développement de médicaments à base de composés isolés du latex. La sève de *Croton lechleri* concerne également le pharmacien puisqu'elle a initialement été autorisée à la vente en Belgique en tant que complément alimentaire et est donc distribuée en pharmacie où elle peut être conseillée dans de nombreux cas cliniques. Ce travail rédactionnel a pour objectif de rassembler les informations disponibles à ce jour sur le sang de dragon dont le potentiel thérapeutique colossal mérite de se faire connaître par les professionnels de santé et le grand public.

MOTS CLES : SANG DE DRAGON, SANGRE DE DRAGO, SANGRE DE GRADO, *CROTON LECHLERI*, ETHNOPHARMACOLOGIE, TASPINE, CROFELEMER, FULYZAQ®, NEONORM™ FOAL, ONCOLOGIE, AMAZONIE, MÉDECINE TRADITIONNELLE, DIARRHÉES, ANTIBIOTIQUE, ANTIOXYDANT, ULCÈRES, CICATRISATION, ANTIVIRAL, IMMUNOMODULATION

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|---|--|---|
| Madame Dominique LAURAIN-MATTAR, Professeur des Universités | SRS MC UMR 7565 CNRS Faculté de Pharmacie | Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/> |

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
③ – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle