

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2013

THESE 2013 TOU3 2121

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par

Sandrine Cabanel

***Houttuynia cordata* Thunberg Saururaceae**

Le 16 décembre 2013

Directrice de thèse : Mme Ha Dang Thi Bang Tam

JURY

Président : Mr Nicolas Fabre
1er assesseur : Mme Ha Dang Thi Bang Tam
2ème assesseur : Mr Christophe Sala

Remerciements

A Monsieur Nicolas FABRE, Président de Jury,

Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Merci beaucoup d'avoir accepté de présider le jury lors de la soutenance de cette thèse.

A Madame Thi Bang Tam HA DANG,

Maitre de Conférences en Pharmacognosie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Je vous suis très reconnaissante pour m'avoir aidée tout au long de ce travail, pour ces informations, pour l'attention que vous m'avez accordée.

A Monsieur Christophe Sala,

Docteur en Pharmacie

Un grand merci tout d'abord pour avoir accepté d'être membre du jury lors de ma soutenance, mais aussi pour tous les conseils, les informations que j'ai pu apprendre et tout le temps accordé.

A ma « Rousquille »

Qui me supporte et m'encourage au quotidien. Tu as été là pour moi aux moments où j'en avais le plus besoin...

A ma Maman,

Tu as toujours cru en moi, merci pour ta patience et ton soutien.

A Vivi, Jean-François, Ophélie,

Merci pour votre soutien, même si on se voit peu souvent, je sais que je peux compter sur vous. Ça me fait chaud au cœur.

A Florence,

Merci à toi aussi pour m'avoir intégré aussi vite dans notre petite équipe...

A toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à ce travail à mes côtés

Une pensée pour toi Papa, j'avais toujours pensé que tu serais là, fier de moi, pour ce jour si important.

Table des matières

Table des matières	1
Introduction.....	5
1. Généralités.....	6
1) <i>Houttuynia cordata</i>	6
2) La Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC)	7
3) La Pharmacopée Chinoise	8
2. Description botanique	10
1) Taxonomie :.....	10
2) Géographie et distribution :.....	11
3) Ecologie, habitat :.....	12
4) Description :	12
3. Intérêt, utilisation	16
1) Une plante ornementale	16
2) Une plante comestible	16
3) Une plante médicinale	16
4. Composition chimique	18
1) Variation de la composition chimique dans l'huile d' <i>Houttuynia cordata</i>	18
2) Détermination des constituants de <i>Houttuynia cordata</i>	22
a) Houttuynoside A.....	23
b) Houttuynamide A.....	28
c) Autres constituants identifiés.....	30
3) Variation quantitative des flavonoïdes dans <i>Houttuynia cordata</i> de différentes origines géographiques en Chine	38
a) Les flavonoïdes	38
b) Analyse des flavonoïdes	39
5. Propriétés.....	45
1) Activité anti-infectieuse.....	45
a) Variation de la composition chimique et activités antibactériennes de l'huile essentielle d' <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	45
b) Les constituants d' <i>Houttuynia cordata</i> et leurs bioactivités.....	46

c)	Activités anti-SRAS et immunomodulatrice d' <i>Houttuynia cordata</i>	48
d)	Activités biologique et antibactérienne de l'extrait aqueux de la plante <i>Houttuynia cordata</i> contre le pathogène bactérien intracellulaire <i>Salmonella</i> chez les macrophages RAW 264.7.....	55
e)	La supplémentation diététique à base d'un probiotique fermenté composé de quatre plantes améliore l'activité immunitaire chez les poulets infectés expérimentalement ainsi que leur survie contre <i>Salmonella gallinarum</i>	60
f)	Activités inhibitrices de l'extrait aqueux d' <i>Houttuynia cordata</i> sur le virus de la Dengue et les cellules infectées par le virus.....	68
g)	Un dérivé de phytoanticipine, l'houttuyfonate de sodium, induit des effets synergiques <i>in vitro</i> contre la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lorsqu'il est associé à la lévofloxacine	73
h)	L'analyse transcriptionnelle et fonctionnelle montre que l'inhibition de l'autolyse de <i>Staphylococcus aureus</i> est médiée par l'houttuyfonate de sodium	77
2)	Activités immunologiques et anti-inflammatoires.....	78
a)	Liaison aux protéines et distribution tissulaire	78
b)	Effet anti-inflammatoire de l'injection d' <i>Houttuynia cordata</i>	80
c)	Effets anti-inflammatoires de l'extrait supercritique d' <i>Houttuynia cordata</i>	82
d)	Activité anti-inflammatoire de certaines plantes médicinales traditionnelles chinoises.....	83
e)	<i>Houttuynia cordata</i> , un nouvel inhibiteur sélectif, de la COX-2 doté d'une activité anti-inflammatoire	83
f)	Effets anti-inflammatoires de l'extrait supercritique d' <i>Houttuynia cordata</i> dans le modèle d'inflammation de la poche d'air au carraghénane	84
g)	Effets suppresseurs d' <i>Houttuynia cordata</i> sur la réponse immune Th2.....	85
h)	L'extrait aqueux d' <i>Houttuynia cordata</i> supprime la réaction anaphylactique et la réponse allergique médiée par les IgE en inhibant plusieurs étapes de la voie de signalisation FcεRI chez les mastocytes.....	86
i)	Effets inhibiteurs de l'extrait aqueux d' <i>Houttuynia cordata</i> sur la réaction anaphylactique et l'activation des mastocytes.....	88
j)	Effet protecteur de l'extrait d' <i>Houttuynia cordata</i> sur la fibrose pulmonaire induite par bléomycine chez les rats.....	90
k)	Effets de l'houttuyfonate de sodium sur l'expression de NF-kappaB et MCP-1 dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse	92
l)	Effet inhibiteur de l'extrait d' <i>Houttuynia cordata</i> sur la migration des cellules HMC-1 induite par le facteur de cellules souches.....	92

m)	Effets de l'houttuyfonate de sodium sur la phosphorylation de CaMK II, CREB et ERK ½ et sur l'expression de c-Fos chez les macrophages.....	93
n)	Etudes sur la capacité en tant qu'adjuvant de l'houttuyfonate de sodium et ses mécanismes	94
3)	Activité anticancéreuse	96
a)	Activité antileucémique de l'extrait d' <i>Houttuynia cordata</i> Thunb. sur les cellules leucémiques humaines U937 et Jurkat.....	96
b)	La fraction d' <i>Houttuynia cordata</i> Thunb induit l'apoptose des cellules leucémiques humaines Molt-4 via la voie du stress du reticulum endoplasmique.....	98
c)	L'extrait d' <i>Houttuynia cordata</i> Thunb. induit l'apoptose via la voie mitochondrie-dépendante chez les cellules humaines d'adénocarcinome du colon HT29.....	99
d)	L'extrait éthanolique fermenté d' <i>Houttuynia cordata</i> induit l'apoptose des cellules leucémiques humaines HL60 et Molt-4 via la voie du stress oxydatif et la voie mitochondriale.....	99
e)	L'extrait d' <i>Houttuynia cordata</i> module l'arrêt en phase G ₀ /G ₁ et la mort médiée par le récepteur de mort apoptotique Fas/CD95 chez les cellules humaines de cancer du poumon A549.....	100
f)	L'houttuyninum, un constituant actif de la plante médicinale chinoise, inhibe la phosphorylation du récepteur tyrosine kinase HER2/neu et la croissance tumorale des cellules cancéreuses surexprimant HER2/neu.....	101
4)	Propriétés diverses.....	102
a)	Propriétés antioxydantes et antimutagènes	102
b)	Effet "anti-obésité"	103
c)	Potentiel de régénération	105
d)	Capacité adjuvante	105
e)	Chimiluminescence.....	105
f)	Propriété inhibitrice de la rénine.....	106
g)	Importance de la taille de la chaîne aliphatique dans l'affinité pour la rénine et l'enzyme de conversion	106
h)	Effet protecteur sur l'hypertrophie du myocarde.....	107
i)	Inhibition du remodelage ventriculaire.....	107
6.	Effets indésirables d' <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	109
1)	Choc anaphylactique et anaphylaxie létale causés par l'injection d' <i>Houttuynia cordata</i> , un traitement traditionnel chinois	109
2)	Effets indésirables à l'injection d' <i>Houttuynia</i> : une revue systématique	111

Conclusion	113
Glossaire	114
Table des figures.....	118
Références.....	121
Abstract	133

Introduction

Houttuynia cordata Thunberg fait partie des plantes médicinales traditionnelles chinoises et elle est inscrite en tant que telle à la Pharmacopée de la République Populaire Chinoise [1]. De plus, elle a fait l'objet ces dernières années de nombreuses études et expériences (que nous allons étudier ici), afin de démontrer tout d'abord sa non toxicité mais aussi son efficacité dans différents domaines.

C'est suite à ces recherches qui montrent tout le potentiel de la plante, qu'elle a été ajoutée sur une liste de plantes pharmacologiquement intéressantes, susceptibles d'être inscrites à la Pharmacopée Européenne. C'est donc dans cet objectif que nous allons étudier *Houttuynia cordata*.

La médecine traditionnelle chinoise se base sur des connaissances et un savoir-faire multimillénaires [2].

Les bases théoriques de cette « médecine traditionnelle » sont vieilles de plus de 4000 ans. C'est un ensemble de théories et de pratiques [3] qui repose sur l'existence de deux entités à la fois opposées et complémentaires (le yin et le yang) ; et qui doivent respecter un certain équilibre [2].

Cette science, surnommée « médecine parallèle », « médecine douce » ou « alternative », « complémentaire » a été introduite en Europe et plus particulièrement en France au XIX^e siècle, grâce au retour des jésuites de Chine. Malgré une propagation mondiale, notamment dans les années 1970 où elle a connu un véritable essor dans sa pratique et l'organisation de son enseignement ; cette médecine douce reste malgré tout relativement peu connue en Occident.

Ce type de médecine traditionnelle présente donc un recul et une expérience sur de nombreuses années et de nombreux patients, ce qui lui confère une certaine reconnaissance et une efficacité.

1. Généralités

1) *Houttuynia cordata*

Houttuynia cordata Thunberg est une plante originaire d'Asie connue sous différents synonymes : *Gymnotheca chinensis* Decaisne., *Polypara cochinchensis* Lour., *Polypara cordata* Lour., *Polypara cordata* Kuntze, *Houttuynia foetida* Loudon ou encore *Houttuynia emeiensis* Z.Y. Zhu et S.L.Zhang.

On la connaît aussi sous différents noms communs : plante caméléon ou queue de lézard, à cause de ses feuilles qui changent de couleur selon l'exposition à la lumière et passent ainsi du vert au rouge ; ou encore plante ou herbe poisson (« fishy-smell herb »), du fait de l'odeur qu'elle dégage.

Au Vietnam, elle est appelée « giáp cá » ou « diệp cá », alors qu'en Inde on la connaît sous le nom de « Ja Murdoh » ; et « Yu xing cao » en Chine.



Fig 1 : Photographie de *Houttuynia cordata*

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Houttuynia_cordata_C.jpg

Houttuynia cordata est une plante originaire d'Asie du Sud Est, commune dans les lieux marécageux. On la retrouve ainsi dans de nombreux pays comme le Japon, la Corée du Nord, la Chine... Elle a été introduite dans ces pays en tant que plante ornementale dans les jardins. Cependant, elle présente une croissance végétative et reproductive rapide, ce qui fait d'elle un risque important d'invasion pour les habitats naturels d'origine de ces régions. D'autre part, le contrôle de l'espèce est difficile car elle peut se reproduire à partir de fragments de rhizomes.

Houttuynia cordata est une plante rustique, utilisée pour agrémenter les jardins, mais elle est aussi consommée dans de nombreux pays en tant que condiment ou légume. Enfin, *Houttuynia cordata* Thunb. est utilisée en tant que plante médicinale traditionnelle pour diverses activités. Elle est en effet inscrite à la Pharmacopée de la République Populaire de Chine [1].

2) La Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC)

Selon elle, le potentiel thérapeutique d'une plante dépend de l'ensemble de ses caractéristiques [4] :

- ✓ Sa couleur
- ✓ Sa nature : chaude, froide, neutre
- ✓ Sa configuration : forme, texture, teneur en humidité
- ✓ Ses propriétés : disperser, consolider, purger ou tonifier



Fig 2 : Herbes médicinales chinoises

<http://sante-medecine.commentcamarche.net/contents/medecines-chinoises>

La MTC repose sur un autre élément fondamental : les plantes sont choisies spécifiquement en fonction de la personne à traiter. Autrement dit, le « bon » médicament pour la « bonne » personne. Il y a donc un « terrain », qui correspond à la cause sous-jacente des symptômes et à la dynamique propre au patient.

Il faut noter que, comme toutes les médecines, la Médecine Traditionnelle Chinoise n'est pas dénuée de risques puisqu'elle utilise des plantes contenant des substances actives et donc pouvant potentiellement provoquer des effets indésirables. D'une façon générale, la MTC privilégie dans un premier temps des plantes non toxiques, visant à renforcer le système « d'auto guérison » et elle réserve dans un second temps les plantes possédant des propriétés toxiques aux cas les plus graves.

A noter aussi que dans la plupart des cas, les herbes chinoises se prennent en décoction, ce qui nécessite un certain temps de préparation et que ces « tisanes » peuvent avoir un goût prononcé et pénible à boire. Ce qui fait que certains patients (occidentaux notamment) peuvent renoncer à cette médecine alternative.

3) La Pharmacopée Chinoise

Elle correspond à une des cinq pratiques de la Médecine Traditionnelle Chinoise (les 4 autres étant : l'acupuncture, la diététique chinoise, le massage Tui Na, et les exercices énergétiques : Qi Gong et Tai-Chi) [4]

La Pharmacopée chinoise est un recueil officiel de médicaments, compilé par la Commission de la Pharmacopée du ministère de la Santé de la République Populaire de Chine [5]. C'est un ouvrage reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé qui regroupe la médecine chinoise traditionnelle et la médecine occidentale (médicaments et préparations) ; et donne les informations sur les normes de pureté, la description, les tests, la posologie, les précautions, le stockage et l'efficacité de chaque médicament [1].

Dans l'édition anglaise [1], la version de 2005 se compose de trois volumes (ISBN 7117069821). Elle comporte au total 2691 monographies, dont 992 correspondent à des médicaments traditionnels chinois et 1699 à des médicaments occidentaux modernes.

- ✓ Le **volume I** contient les monographies des huiles végétales et animales ainsi que leurs extraits, les médicaments traditionnels brevetés, et les ingrédients pour les préparations de drogues brutes.

- ✓ Le **volume II** traite des drogues chimiques, antibiotiques, préparations biochimiques, radiopharmaceutiques et des excipients à usage pharmaceutique.
- ✓ Le **volume III** contient les produits biologiques.

Comme la Médecine Traditionnelle Chinoise, la Pharmacopée Chinoise repose sur des connaissances millénaires et compte plusieurs milliers de substances. Certaines des plantes qui sont utilisées dans cette médecine asiatique nous sont familières : réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) ou verveine odorante (*Aloysia citrodora*) par exemple. Alors que beaucoup nous sont inconnues et constituent une réserve considérable de principes actifs. C'est le cas de *Houttuynia cordata*.

Il faut noter qu'en pharmacologie occidentale, on considère souvent un principe actif pour traiter un symptôme ou une pathologie, alors que dans cette médecine traditionnelle, on attend un effet conjugué des divers composants de la plante. De plus, on utilise souvent plusieurs plantes en même temps, c'est une « préparation », pour créer une synergie d'action entre les différents composants ayant des propriétés similaires. Ceci a pour but non seulement de créer cette synergie mais aussi de diminuer les effets secondaires potentiels après la prise d'une seule plante en grande quantité.

2. Description botanique

Houttuynia cordata a été décrite pour la première fois en 1784, par le naturaliste suédois Carl Peter Thunberg, dans *Flora japonica*, à partir de matériel collecté au Japon [6].

1) Taxonomie :

Il existe principalement deux classifications dans le règne végétal.

La classification de Cronquist (1981) est une classification des Angiospermes, basée essentiellement sur des critères morphologiques, anatomiques et chimiques des plantes à fleurs. Elle est toujours utilisée dans de nombreux ouvrages et bases de données.

- Règne : Plantae
- Sous-Règne : Tracheobionta
- Sous-Règne : Angiospermes (ou Magnoliophyta)
- Classe : Dicotylédones (ou Magnolopsida)
- Sous classe : Magnoliidae
- Ordre : Pipérales
- Famille : Saururaceae
- Genre : *Houttuynia* (Thunb.)
- Espèce : *Houttuynia cordata* Thunb.

La classification phylogénétique, ou APG III (2009) est composée de clades, qui ont pour but de rendre compte du degré de parenté entre les différentes espèces et ainsi comprendre leur évolution (ou phylogénie). Elle est basée sur l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques (anatomie comparée et embryologie), des caractères moléculaires (biochimie et biologie moléculaire)...

- Clade : Angiospermes
- Clade : Magnoliidées
- Ordre : Pipérales
- Famille : Saururaceae
- Genre : *Houttuynia*
- Espèce : *Houttuynia cordata* Thunberg

2) Géographie et distribution :

La répartition native de *Houttuynia cordata* est très vaste et va du Népal à l'Inde à l'Ouest, puis comprend la Chine et l'Indochine à l'Est et au Sud, de la Thaïlande aux montagnes de Java (Indonésie).

On la retrouve près du niveau de la mer et jusqu'à 2 500m d'altitude dans l'Himalaya par exemple.

Elle a ensuite été introduite en Australie, Nouvelle Zélande, certaines îles du Pacifique et en Amérique du Nord, où on la considère souvent comme une « mauvaise herbe ».

Cette plante est donc très répandue et n'est pas menacée. Au contraire, elle aurait même tendance à devenir envahissante, de par sa propagation rapide et la difficulté à la contrôler une fois introduite dans un milieu favorable.



Fig 3 : Asie du Sud Est
Sources.asie.free.fr/SIG/asiaSE.html

3) Ecologie, habitat :

Houttuynia cordata se plaît dans les sols humides et chauds, comme par exemple le bord des cours d'eau, les bois et prairies humides, en marge des rizières ou encore au bord des routes. Elle peut même être légèrement immergée.

Le pH du sol peut être acide, neutre ou basique.

Enfin, elle préfère une exposition en plein soleil ou mi ombragée.

C'est une plante assez rustique puisqu'elle peut supporter des températures allant jusqu'à -12°C voire -15°C, mais dont le feuillage est caduc en hiver.

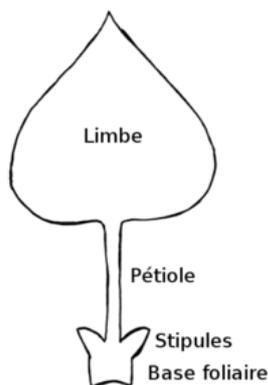
4) Description :

Plante fraîche [1]:

Houttuynia cordata est une plante herbacée et couvrante de la famille des Saururacées. Elle est la seule espèce représentante du genre *Houttuynia*.

Elle peut mesurer de 20 à 80 cm de hauteur. Les tiges sont cylindriques, mesurant de 20 à 45 cm de long et de 2,5 à 4,3 cm de diamètre.

Les feuilles :



C'est une plante vivace à feuillage caduc, panaché. Les feuilles sont alternes, larges et le limbe est en forme de cœur (cordiforme ou cordé), ce qui lui vaut le surnom de « heart leaf ». Elles mesurent de 3 à 10 cm de long et de 3 à 11 cm de large. L'apex est acuminé (le limbe se termine en pointe fine) et la marge est entière.

Fig 4 : Pièces foliaires
Blatt Gliederung fr.png



Fig 5: *Houttuynia cordata*

Houttuynia cordata Thunb : a review of phytochemistry and pharmacology and quality control [115]

La partie proximale inférieure porte des nœuds distincts, glabres ou pubescents (poils fins et espacés, mous ou courts), sur lesquels prennent naissance des radicelles adventives (c'est-à-dire des petites racines secondaires qui naissent latéralement sur la tige). Alors que la partie distale de la tige pousse verticalement.

La surface supérieure est de couleur jaune et présente des points glandulaires répartis de façon dense. La partie inférieure est souvent rouge violacé.

En dehors de l'espèce sauvage aux feuilles vertes, il existe des cultivars à feuilles rouges, rose, or ou bien blanches.

Le pétiole est mince, avec des stipules accumulés à la base et formant une gaine.

Les fleurs :

La floraison a lieu de préférence en été et les fleurs sont de couleur jaune-verdâtre. Les fleurs sont hermaphrodites. Elles sont portées par un épi terminal et sont composées de bractées basales blanches pouvant mesurer de 3 à 8 cm.



Fig 6: photographie de l'appareil reproductif

<http://commons.wikimedia.org/wiki/User:KENPEI>

Il est à noter que *Houttuynia cordata* Thunberg présente une odeur de poisson et un goût astringent.

Drogue sèche [1] :

La tige est cylindrique et tordue, de couleur jaune-brunâtre à l'extérieur et elle présente plusieurs nervures longitudinales.

La texture est fragile et elle casse facilement.

Le limbe est enroulé et chiffonné. Sur la face supérieure, il est de couleur vert jaunâtre foncé à brun foncé et sur la face inférieure, il est vert grisâtre ou brun grisâtre.

Les fleurs sont des épis terminaux, de couleur brun jaunâtre.



Fig 7 : Drogue sèche
<http://lavendelfoto.com/>

3. Intérêt, utilisation

1) Une plante ornementale

Houttuynia cordata est utilisée pour son intérêt décoratif, en tant que plante ornementale, notamment grâce à ses feuilles aux teintes vives, mais aussi parce que c'est une plante rampante, couvrante.

Les tiges et surtout les feuilles de la plante libèrent une odeur acidulée et poivrée lorsqu'elles sont froissées, rappelant une odeur de poisson. Ce qui vaut à la plante son surnom de « plante poisson ».

2) Une plante comestible



Elle est aussi utilisée comme condiment. Dans la cuisine asiatique, elle est utilisée de différentes façons, crue ou cuisinée. Au Vietnam, les pousses sont consommées avec les nems ; en Chine dans les provinces du Yunnan, du Ghizou ou encore du Sichuan, on consomme les racines comme des légumes ; alors qu'au Nord Est de l'Inde elle est préparée en salades ou cuisinée avec d'autres légumes.

Fig 8 : Plat à base d'*Houttuynia cordata*
<http://www.hewiki.com/view/30971.htm>

3) Une plante médicinale

Par ailleurs, *Houttuynia cordata* est utilisée depuis longtemps en tant que plante médicinale traditionnelle grâce à ses diverses propriétés [1, 6, 8]:

- Tonifiant général
- Renforce le système immunitaire et l'organisme face aux agents extérieurs (virus, bactéries, champignons, parasites)
- Aide à augmenter la production d'anticorps
- Inhibe les germes producteurs de toxines
- Diminue l'irritation et l'inflammation des tissus (notamment du tube digestif)

- Préserve les muqueuses digestives et uro-génitales
- Améliore la défense de l'organisme en cas de terrain sensible aux allergies

Au Népal, le jus des racines est utilisé pour traiter l'indigestion et est appliqué sur la peau pour traiter les blessures et les maladies de peau.

On utilise aussi une décoction des feuilles et tiges fraîches de la plante par voie interne pour traiter différentes maladies comme le cancer, la toux, la dysenterie, l'entérite ou encore la fièvre. Ce jus est considéré comme antidote.

Les parties aériennes sont utilisées en Chine et au Japon. En médecine traditionnelle chinoise, elles sont utilisées pour traiter les infections du tractus respiratoire et des voies urinaires, et pour traiter les plaies (exemple : morsures de serpent) et les problèmes de peau (furoncles).

Enfin, de façon plus générale, la plante entière est utilisée comme antimicrobien (abcès du poumon avec expectoration purulente, abcès, douleurs mictionnelles avec fièvre), diurétique, dépuratif... Alors qu'on l'utilise en décoction par voie orale dans le traitement de certains cancers, de la crise de toux avec mucosités, la dysenterie avec fièvre, le traitement de toxines.... [1, 7]

4. Composition chimique

Les différents effets de *Houttuynia cordata* sont dus à la diversité de ses constituants. Ils ont été étudiés dans plusieurs travaux [9, 10, 16].

1) Variation de la composition chimique dans l'huile d'*Houttuynia cordata*

Ce que l'on constate tout d'abord c'est que la teneur des différents constituants de la plante varie selon la partie de la plante considérée et la région où elle a été cultivée [9].

Dans cette première étude de 2006, on a fait subir aux plantes fraîches coupées en petits morceaux une hydrodistillation de 3 heures, suivie par un séchage à l'aide de sulfate de sodium anhydre. Une fois cette huile limpide, incolore et inodore obtenue, on l'a soumise à une chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC-2010), couplée à un spectromètre de masse (Shimadzu QP 2010).

Grâce à cette analyse, on a pu identifier 55 composants, qui représentent 96,5 à 99,6% des huiles totales. Les trois composés les plus abondants sont :

- ✓ le méthylnonylcétone (qui représente de 2,10 à 40,36% des composés selon la partie et l'origine considérée),

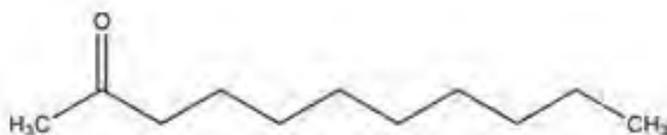


Fig 9 : méthylnonylcétone

<http://purandarfine.tradeindia.com/methyl-nonyl-ketone-584730.html>

✓ l'acétate de bornyle (représentant de 0,40 à 8,61% des constituants de l'huile)

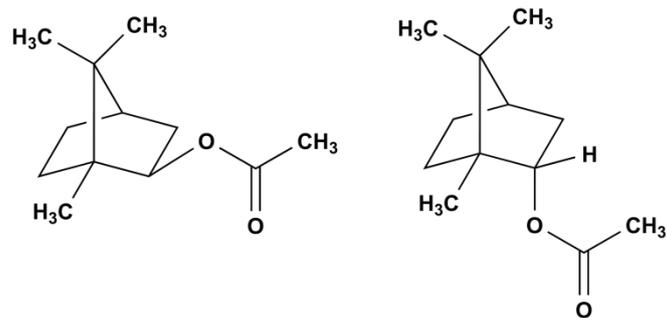


Fig 10 : Isomères de l'acétate de bornyle
Wikimedia commons

✓ et le β -myrcène (2,58 à 18,47%)

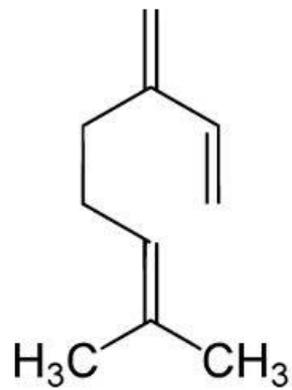


Fig 11 : β -myrcène
Wikimedia commons

Les autres composants sont présents à des concentrations variables selon la partie de la plante analysée et selon que la plante soit sauvage ou cultivée. Ces différentes teneurs sont reprises dans le tableau suivant [9] :

Tr (mn)	Composants ^(a)	Composition (%) ^(b)			
		1	2	3	4
12.489	α -pinène	0.20	tr	10.2	9.21
12.827	Camphène	tr	0.17	1.55	1.64
13.367	Sabinène	—	tr	0.85	0.97
13.493	β -pinène	0.28	tr	23.29	21.88
13.744	β -myrcène	12.57	13.75	14.29	13.90
14.36	α -terpinène	—	—	tr	—
14.416	Cymène	tr	—	—	—
14.634	D-limonène	0.51	0.24	11.14	10.51
14.688	<i>trans</i> - β -ocimène	2.52	2.11	—	—
14.929	<i>cis</i> - β -ocimène	tr	—	—	—
15.218	γ -terpinène	—	—	tr	tr
15.624	2-nonanone	tr	—	—	—
15.791	2-méthyl-6-méthylène-oct-3,7-diène-2-ol	—	—	—	—
15.820	2,6-diméthyl-3,7-octatriène-2-ol	0.52	0.43	—	—
15.841	4-carène	—	—	—	—
15.850	(Z)-2-nonèn-1-ol	—	—	—	—
15.884	2-carène	—	—	0.29	0.35
15.910	β -linalol	0.61	0.78	—	—
15.957	Perillène	tr	—	—	—
16.411	(Z)- β -terpinéol	—	—	—	—
16.544	4,4,6,6-tétraméthyl-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène	0.73	0.63	—	—
16.909	2,6-diméthyl-2,7-octadiène-1,6-diol	tr	tr	—	—
17.187	Nonanol	0.77	0.62	tr	tr
17.464	4-terpinéol	tr	tr	0.23	0.51
17.635	α -terpinéol	tr	0.21	0.29	0.43
17.761	<i>n</i> -décanal	3.37	3.51	—	—
18.743	Acétate de <i>trans</i> -pinocarvyl	0.94	0.82	—	—
18.937	Décanol	2.64	3.01	—	—
19.157	Carvacrol	—	—	tr	tr
19.298	Méthylnonylcétone	36.07	34.96	23.96	25.02
19.301	Acétate de bornyle	6.03	8.23	8.61	7.01
19.428	2-décanol	tr	tr	—	—

19.474	Dodécène	tr	tr	–	–
19.550	Undécanal	0.42	0.38	–	–
19.719	Acétate de α -cyclogéranol	0.24	0.29	tr	tr
19.831	Néodihydrocarvéol	tr	tr	tr	tr
20.367	Acide <i>n</i> -décanoïque	4.20	3.99	0.67	0.59
20.556	Ester d'acide Acétique de géranol	6.22	6.75	0.72	0.54
20.621	3-méthylène-undécane	1.63	1.57	0.40	0.42
20.813	2-dodécanone	1.07	1.14	0.30	0.23
21.025	Lauraldéhyde	0.21	0.23	–	–
21.723	Caryophyllène	2.68	2.38	1.02	1.2
21.871	β -farnésène	0.23	tr	–	–
21.983	Dodécanol	–	–	–	–
22.238	4-tridécanone	3.14	3.13	1.64	1.93
22.340	Ester 9-bromononyl d'ac. phénylcarbamique	0.27	0.28	–	–
22.443	Patchoulène	0.21	tr	–	–
22.556	α -farnésène	tr	–	–	–
22.739	7-méthoxy-3,7-diméthyl-octanal	tr	–	–	0.26
23.057	Ac. tétradécanoïque	0.21	0.25	–	–
23.285	<i>trans</i> -nérolidol	0.79	0.77	–	–
23.572	Tridécanoate d'éthyle	–	–	0.23	0.31
23.644	Ester d'éthyle de l'ac. Docosanoïque	5.93	5.72	–	–
23.877	Tétradécanal	–	–	–	–
23.909	Oxyde de caryophyllène	0.44	0.59	–	–

Tr : temps de rétention, en minutes, dans la colonne à chromatographie gazeuse

tr : traces (<0,2)

– : non détecté

(a) : liste des composants selon leur ordre d'élution de la colonne

(b) : 1 : partie aérienne d'*Houttuynia cordata* cultivée (dans une plantation de recherche à Huaihua, en Chine Centrale)

2 : partie aérienne d'*Houttuynia cordata* sauvage (récoltée à Huaihua, en juillet 2004)

3 : partie souterraine d'*Houttuynia cordata* cultivée

4 : partie souterraine d'*Houttuynia cordata* sauvage

Fig 12 : Tableau des différents phytoconstituants des huiles essentielles d'*Houttuynia cordata* Thunb.

2) Détermination des constituants de *Houttuynia cordata*

D'autres travaux ont donc permis de compléter le profil des constituants de *Houttuynia cordata* [10].

Dans cette étude de 2009, Chou *et al* ont étudié la composition d'*Houttuynia cordata* à partir d'un échantillon de plante entière séchée à l'air libre. On a pu isoler deux nouveaux composants : l'houttuynoside A et l'houttuynamide A ainsi que 38 autres composés déjà connus.

Le mode opératoire a consisté à séparer l'extrait méthanolique d'*Houttuynia cordata* avec du chloroforme (CHCl₃) et de l'eau (H₂O). On a ainsi obtenu deux extraits différents :

- ✓ Extrait au chloroforme condensé, qui a été séparé avec du *n*-hexane et du méthanol aqueux à 80%.
- ✓ Extrait hydrosoluble, séparé avec du *n*-butanol et qui a donné un sirop marron foncé.

On a ensuite isolé les sous-fractions ainsi obtenues en réalisant des chromatographies en gel de silice avec gradients de concentrations. Au final, on a pu identifier 2 nouveaux constituants et 38 autres déjà connus.

a) Houltuynoside A

Il a été isolé sous forme d'un sirop incolore, optiquement actif

On lui a ensuite fait subir différentes techniques analytiques afin de préciser sa formule chimique et sa structure :

ii. *Spectrométrie de masse haute résolution à ionisation par bombardements atomiques rapides (HR-FAB-MS) :*

La spectrométrie de masse est une méthode de détection très sensible, qui permet de déterminer les structures moléculaires des composés étudiés [11]. On couple souvent le spectromètre de masse (méthode d'identification) à une chromatographie en phase gazeuse (méthode séparative). Cette association permet d'étudier des mélanges complexes où les constituants sont présents à de très faibles concentrations, voire à l'état de trace.

Après une première étape de séparation par chromatographie, le composé organique étudié est introduit dans le spectromètre de masse où il va subir une ionisation par bombardement électronique (c'est l'ionisation FAB). L'ion ainsi obtenu (ou ion moléculaire) va permettre de déterminer la masse molaire du composé d'origine.

Il est à noter qu'il peut y avoir des ruptures de liaisons chimiques au sein même de l'ion moléculaire, qui donnent naissance à des ions fragments caractéristiques. En effet, ces dissociations ne se font pas au hasard, mais selon des mécanismes bien déterminés.

Les ions fragments vont ensuite être séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), par l'application d'un champ électrique et/ou magnétique et enfin, ils seront collectés par un détecteur.

L'ensemble de ces ions moléculaires et fragments constitue le spectre de masse, à partir duquel on va pouvoir identifier la structure moléculaire.

Ici, on a pu identifier un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 451,1244$.

Ce pic est compatible avec une formule moléculaire : **C₂₁H₂₂O₁₁**

iii. *Spectrométrie infrarouge*

La spectroscopie infrarouge est utilisée comme technique d'identification, pour déterminer la nature des liaisons chimiques ou groupements fonctionnels présents dans une molécule et donc de déduire la composition d'un échantillon par exemple.

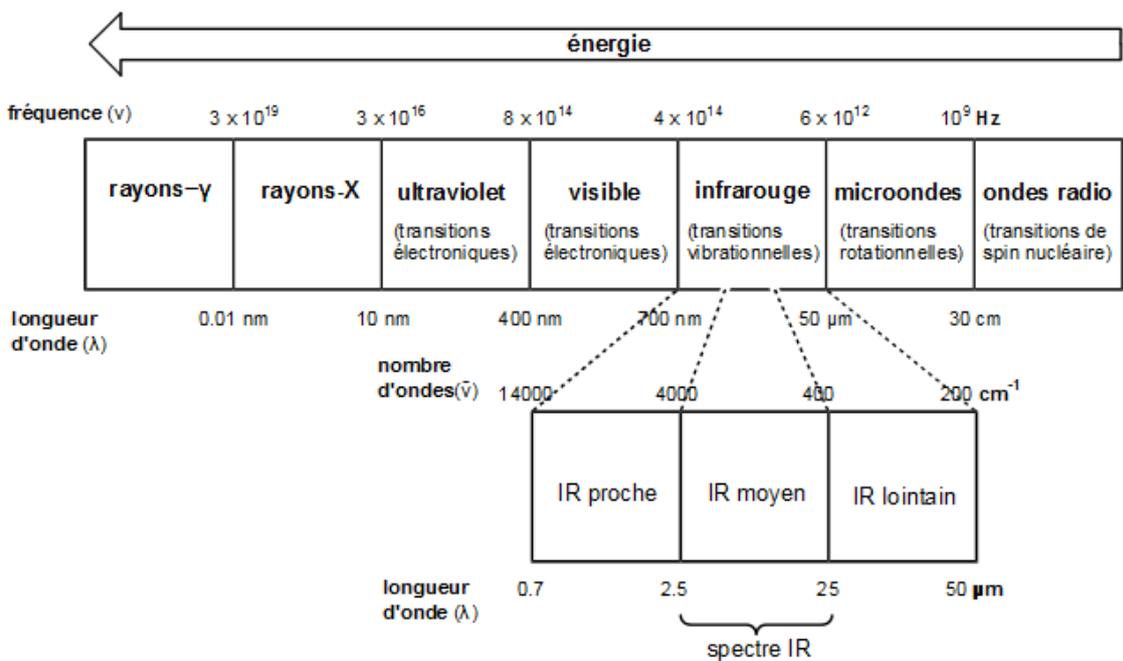


Fig 13 : Spectre électromagnétique

<http://www.chimie.umontreal.ca/cours/giassonr/partie2.pdf>

Cette technique est basée sur l'absorption de radiations électromagnétiques dans le domaine de l'infrarouge, comprises entre 4000 et 400 cm⁻¹, ce qui induit une transition vibrationnelle [12].

Grâce à cette méthode, on a pu observer des bandes d'absorption à 3392 et 1688 cm⁻¹

Qu'on peut assigner à des **groupements hydroxyle et carbonyle**.

iv. Le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H et ¹³C)

Les noyaux sont tous caractérisés par un spin nucléaire et un moment magnétique nucléaire, qu'on peut quantifier [13].

$$\mu = \gamma S$$

μ : moment magnétique nucléaire

γ : rapport gyromagnétique

S : nombre quantique de spin

On s'est aperçu que si on applique un champ magnétique extérieur B_0 à une molécule, les noyaux vont interagir de façon différente selon leur moment magnétique [13]. Ils ont alors des énergies différentes. On dit qu'il y a « levée de dégénérescence du niveau d'énergie »

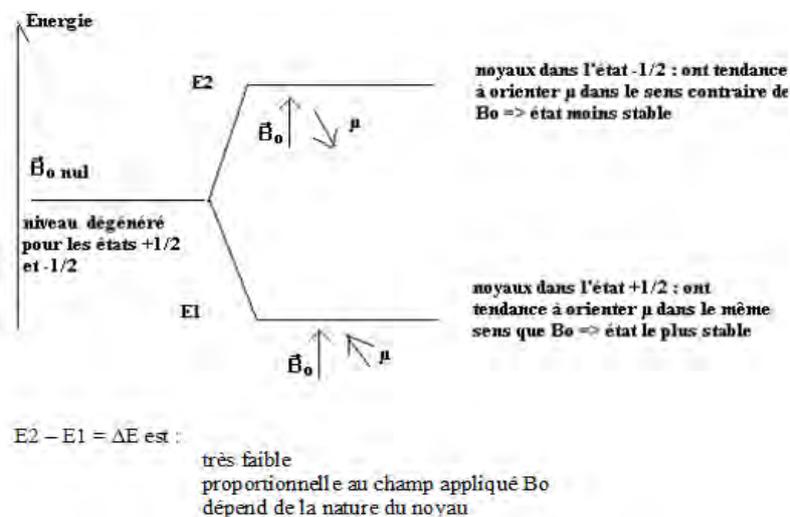


Fig 14 : Levée de dégénérescence du niveau d'énergie

<http://eduscol.education.fr/rnchimie/phys/magnet/rmn/rmn.pdf>

Des noyaux dans l'état E_1 peuvent absorber de l'énergie (sous forme de photons par exemple) pour passer dans l'état E_2 . La spectroscopie RMN va donc consister à observer les transitions entre ces deux niveaux d'énergie très proches, d'un noyau soumis à un champ magnétique extérieur.

On a donc analysé l'échantillon avec cette méthode et elle a révélé la présence d'un ensemble de protons ABX à :

- δ_H 7,50 (1H, d, $J=2,9$ Hertz, H-2)
- δ_H 7,33 (1h, dd, $J=9,0, 2,9$ Hz, H-6)
- δ_H 6,79 (1H, d, $J=9,0$ Hz, H-5)

Elle a aussi montré un ensemble de protons aromatiques de type A_2B_2 a :

- δ 7,88 (2H, d, $J=8,6$ Hz, H-2'', H-6'')
- δ 6,90 (2H, d, $J=8,6$ Hz, H-3'', H-5'')

Ainsi qu'une unité **glucopyranose** :

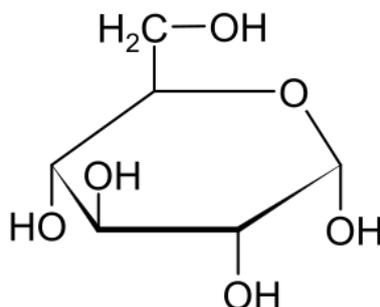


Fig 15 : D-glucopyranose
Wikimedia commons

Enfin, un signal de 3 protons singulets à δ 3,84 peut être attribué à un groupe **méthoxy**.

Les spectres ^1H et ^{13}C -RMN indiquent aussi la présence de différents groupements :

- ✓ 4-hydroxybenzoate
- ✓ 3,4-dihydroxybenzoate
- ✓ Glucopyranosyl

Les groupements 4-hydroxybenzoate et 3,4-dihydroxybenzoate sont reliés par un groupement glucosyl à C-6' et C-1' (selon l'analyse du spectre RMN) [10].

v. *Hydrolyse acide*

L'hydrolyse consiste à décomposer une substance en présence d'ions acides (ici on a utilisé les ions H^+ de l'acide chlorhydrique : HCl). On a ensuite réalisé une étape de purification par chromatographie, qui a finalement révélé du D-glucose (comparé à un échantillon de D-glucose pur).

Après analyse du signal anomérique à δ 4,33 (1H, dd, $J=11,7$ et $7,2$ Hz), il s'avère être du **β -D-glucose** :

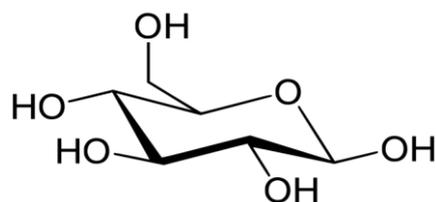


Fig 16 : β -D-glucose
Wikimedia commons

vi. Analyse HMBC :

C'est une forme de RMN en deux dimensions hétéronucléaire, qui donne les corrélations hétéronucléaires qui existent entre les carbones (^{13}C) et les hydrogènes (^1H) séparés par une, deux ou trois liaisons [14, 15].

Ainsi, on a pu déterminer que les groupements 4-hydroxybenzoate et 3,4-dihydroxybenzoate sont reliés par un groupement glucosyl à C-6' et C-1'. Avec H-6' ($\delta_{\text{H}} = 4,70$ à $4,33$, chaque 1H) à C-7'' ($\delta_{\text{C}} 165,8$). Et H-1' ($\delta 4,90$) à $\delta 150,3$ (C-3)

Grâce à ces différentes méthodes analytiques combinées, on a pu déterminer la structure de l'houttuynoside A :

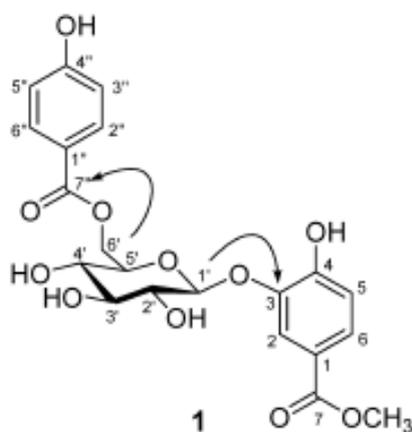


Fig 17 : Houttuynoside A
The constituents and their bioactivities of *houttuynia cordata* [10]

b) Houttuynamide A

Il a été isolé sous forme d'un sirop incolore.

i. HR-FAB-MS :

Le spectre de masse couplé à l'ionisation par bombardement atomique [11] a permis de déterminer la formule moléculaire de l'houttuynamide A : $C_{15}H_{15}NO_2$

ii. Spectre IR :

On observe des bandes d'absorption [12] à 3353 et 1700 cm^{-1} qui sont dues aux groupements **hydroxyle** et **carbonyle**.

iii. RMN ^{13}C et 1H :

Elle a révélé un système ABX [13] à :

- δ_H 7,24 (1H, d, J=2,0 Hz, H-2)
- δ_H 7,15 (1H, dd, J=8,4 et 2,0 Hz, H-6)
- δ_H 6,78 (1H, d, J=8,4 Hz, H-5)
- δ_C 115,7 (C-2)
- δ_C 115,8 (C-5)
- δ_C 120,5 (C-6)
- δ_C 127,2 (C-1)
- δ_C 146,3 (C-3)
- δ_C 150,0 (C-4)

Et la fixation d'un groupement $-CONCH_2-CH_2-$ au noyau aromatique :

- δ_H 3,49 (2H, t, J=7,5 Hz, H-8')
- δ_H 2,78 (2H, t, J=7,5 Hz, H-7')
- δ_C 170,2 (C-7)

Les spectres ^1H et ^{13}C RMN de l'houttuynamide A ont aussi révélé la présence d'un groupement phényle para-substitué (système A_2B_2) :

- δ_{H} 7,06 (2H, d, $J=8,6$ Hz, H-2', H-6')
- δ_{H} 6,71 (2H, d, $J=8,6$ Hz, H-3', H-5')
- δ_{C} 116,5 (C-3', C-5')
- δ_{C} 130,1 (C-2', C-6')
- δ_{C} 131,5 (C-1')
- δ_{C} 156,9 (C-4')

iv. Analyse ^3J -HMBC :

Les corrélations HMBC [14] ont mis en évidence que le groupement phényle para-substitué est attaché par le groupe $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ à partir de H-7' à C-2', C-6' et C-8'.

Ces données nous indiquent que le noyau phényle est lié par une liaison $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHCO}-$

A partir de toutes ces données spectroscopiques, on a pu établir la structure de l'Houttuynamide A :

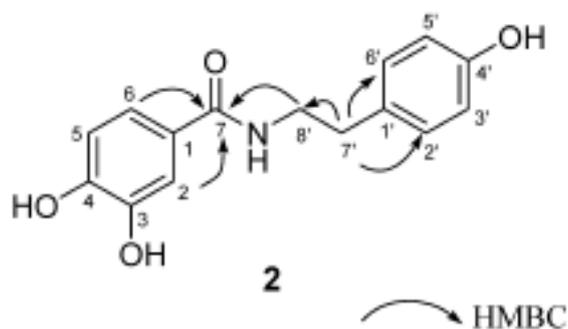


Fig 18 : Houttuynamide A

The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata* [10]

c) Autres constituants identifiés

On a identifié les 38 composés suivants à partir des comparaisons de leurs données physiques et spectroscopiques avec celles des échantillons purs correspondants, ou avec les valeurs de la littérature. On a ainsi pu classer ces constituants en plusieurs groupes selon leur structure chimique :

✓ Les aristolactames, avec quatre dérivés :

- L'aristolactame AII

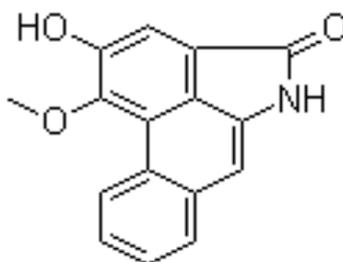


Fig 19 : Aristolactame AII
<http://www.chemblink.com>

- L'aristolactame BII

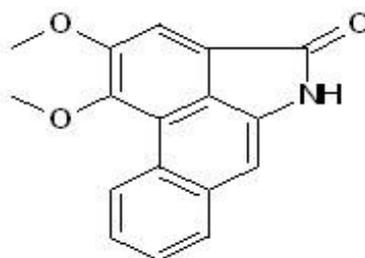


Fig 20 : Aristolactame BII
<http://www.chemfaces.com>

- Le pipérolactame A

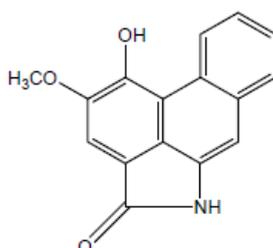


Fig 21 : Pipérolactame A
<http://www.chemfaces.com>

- Le 3,4-diméthoxy-N-méthylaristolactame

- ✓ Les oxo aporphines
 - La splendidine

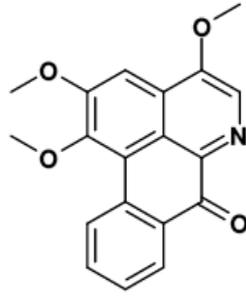


Fig 22 : Splendidine
<http://wildflowerfinder.org.uk>

- La lysicamine

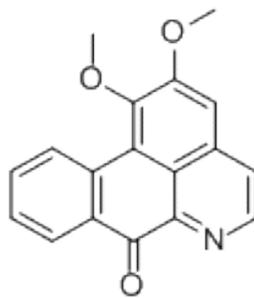


Fig 23 : Lysicamine
<http://www.chemicalbook.com>

- ✓ Les 4,5-dioxoaporphines :
 - La cépharadione B

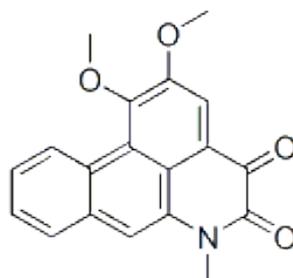


Fig 24 : Cépharadione B
<http://www.chemicalbook.com>

- La norcépharadione B
- La noraritodione

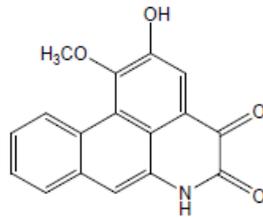


Fig 25 : Noraritodione
<http://www.chemicalbook.com>

✓ Les amides :

- Le N-(1-hydroxyméthyl-2-phényléthyl)benzamide
- Le N-(4-hydroxyméthyl-2-phényléthyl)benzamide
- Le benzamide

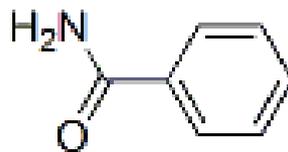


Fig 26 : Benzamide
<http://www.chemicalbook.com>

- Le 4-hydroxybenzamide
- Le 4-hydroxy-3-méthoxybenzamide
- Le 6,7-diméthyl-1-ribitol-1-yl-1,4-dihydroquinoxaline-2,3-dione
- Le (1H)-quinolinone

- ✓ Un dérivé indole : l'acide indole-3-carboxylique

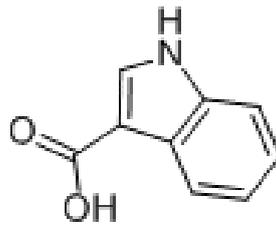


Fig 27 : Acide indole-3-carboxylique
<http://www.chemicalbook.com>

- ✓ Les ionones :

- Le vomifoliol

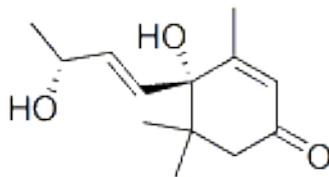


Fig 28 : Vomifoliol
<http://www.chemicalbook.com>

- Le déhydrovomifoliol
- Le réséoside
- Le 7-(3,5,6-trihydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexyl)-but-3-èn-2-one
- Le 6-(9-hydroxy-but-7-éthyl)-1,1,5-triméthylcyclohexane-3,5,6-triol

- ✓ Les flavonoïdes :

- La quercitrine

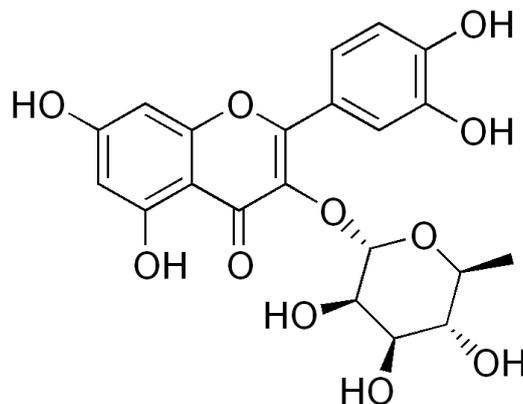


Fig 29 : La quercitrine
Wikimedia commons

- La quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside aussi appelée hypérine ou hyperoside

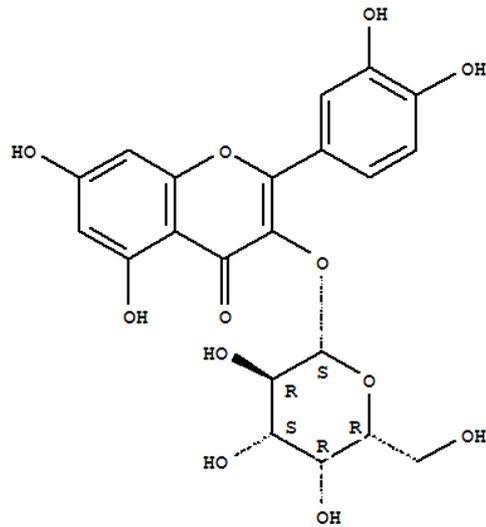


Fig 30 : Quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside (Hypérine)
<http://www.lookchem.com>

- L'afzéline

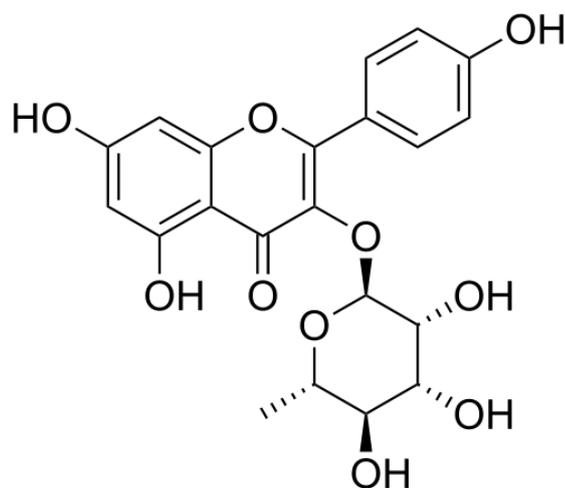


Fig 31 : Afzéline
 Wikimedia commons

✓ Les benzénoïdes :

- L'Acide vanillique

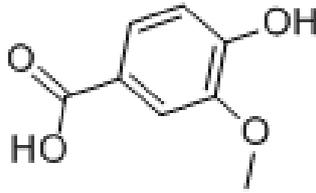


Fig 32 : Acide vanillique
<http://www.chemicalbook.com>

- Le méthyl vanillate

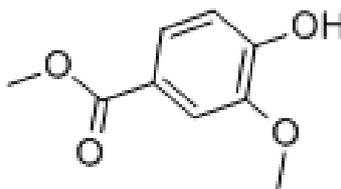


Fig 33 : Méthyl vanillate
<http://www.chemicalbook.com>

- La vanilline

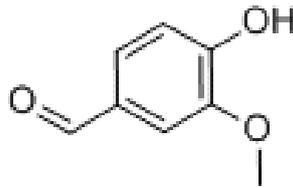


Fig 34 : Vanilline
<http://www.chemicalbook.com>

- L'acide protocatéchique

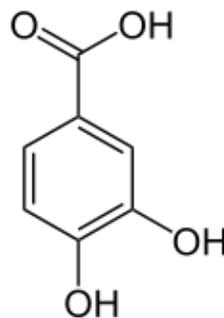


Fig 35 : Acide protocatéchique
Wikipédia

- L'acide 4-hydroxybenzoïque

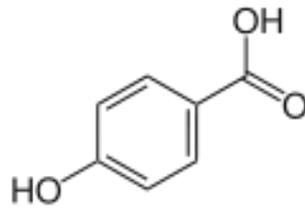


Fig 36 : Acide 4-hydroxybenzoïque
Wikimedia commons

- Le méthylparaben

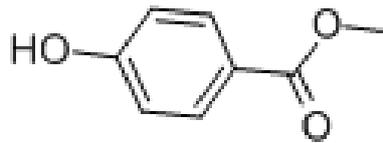


Fig 37 : Méthylparaben
<http://www.chemicalbook.com>

- Le p-hydroxybenzaldéhyde



Fig 38 : p-hydroxybenzaldéhyde
<http://www.chemicalbook.com>

- Les *cis* et *trans*-méthylférulate

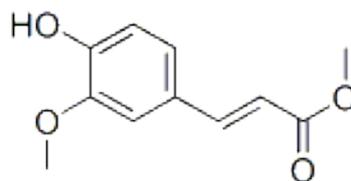


Fig 39 : Méthylférulate
<http://www.chemicalbook.com>

- Le benzyl-β-D-glucopyranoside

- ✓ Les stéroïdes :
 - Le β -sitostéryl glucoside
 - Le β -sitostérol

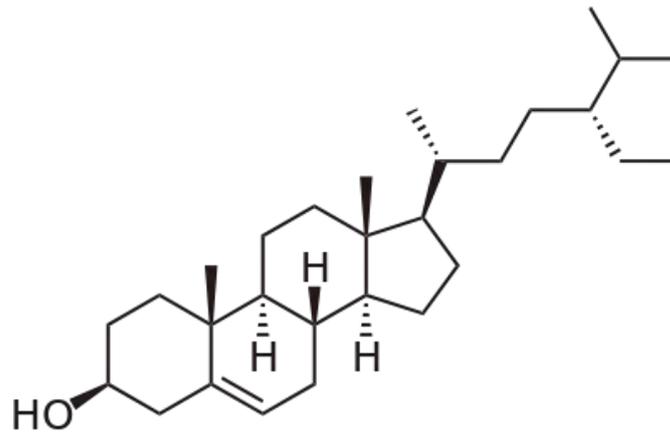


Fig 40 : β -sitostérol
Wikimedia commons

- ✓ Un dérivé triterpénoïde : le cycloart-25-ène-3- β -24-diol

3) Variation quantitative des flavonoïdes dans *Houttuynia cordata* de différentes origines géographiques en Chine

Dans une autre publication de 2009, les chercheurs, WU *et al* se sont penchés sur la composition en flavonoïdes de la plante [16].

a) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés très répandus dans le monde végétal et responsables de la couleur des végétaux, appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des métabolites secondaires des plantes qui ont une structure de base commune composée de deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (soit un squelette de base de 15 atomes de carbone) [17].

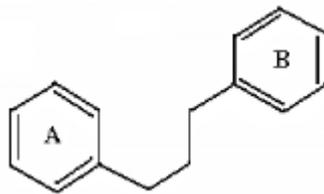


Fig 41 : Structure de base des flavonoïdes
<http://www.memoireonline.com>

Cette chaîne est souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa ou pentagonal. Les composés peuvent être répartis en différentes classes de flavonoïdes en fonction du nombre, de la position, de la nature et de la conformation des substituants sur les deux cycles aromatiques et la chaîne intermédiaire.

Selon la nomenclature de l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), on peut classer les flavonoïdes en trois groupes, qui contiennent tous une fonction cétonique :

- ✓ Les flavonoïdes, dérivés de la structure 2-phenylchromèn-4-one (ou 2-phenyl-1,4-benzopyrone), par exemple : quercétine, rutine

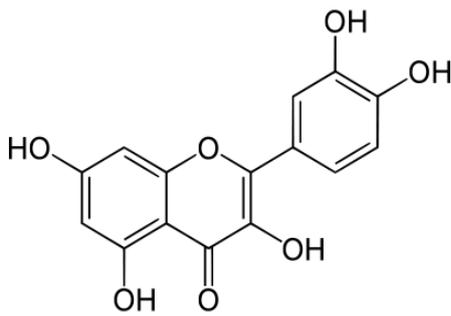


Fig 42 : Quercétine
Wikimedia commons

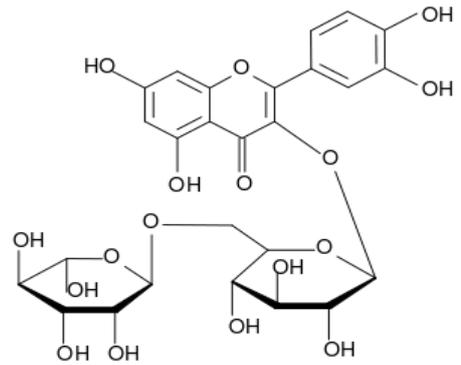


Fig 43 : Rutine
Wikimedia commons

- ✓ Les isoflavonoïdes, dérivés de la 3-phénylchromen-4-one (ou 3-phényl-1,4-benzopyrone)
- ✓ Les néoflavonoïdes, dérivés de la 4-phénylcoumarine (ou 4-phényl-1,2-benzopyrone)

Les flavonoïdes sont des composés présents dans toutes les parties des plantes, qui sont responsables de leur coloration, peu toxiques et qui peuvent présenter des propriétés diverses et variées (antiallergique, anti-inflammatoire, antimicrobien, anti-cancer [17]).

C'est donc parce que les flavonoïdes représentent des composés très répandus et potentiellement actifs qu'ils ont été étudiés.

b) Analyse des flavonoïdes

Dans cette étude [16], les chercheurs ont mesuré la concentration des trois principaux flavonoïdes dans des plantes de différentes provenances par HPLC. On a ensuite étudié la corrélation entre la teneur en flavonoïdes et les caractéristiques biologiques et la région d'origine de la plante.

i. Mode opératoire

L'étude a porté sur des individus d'*Houttuynia cordata* de 22 provenances représentatives récoltés dans 11 provinces chinoises (Anhui, Chongqing, Fujian, Guangxi, Guizhou, Henan, Hunan, Ji-angxi, Sichuan, Yunan and Zhejiang).

Ces plantes ont séché naturellement, puis on a broyé les tiges aériennes pour les réduire en poudre fine. On les a ensuite extraites au méthanol à 70% à 85°C, 3 fois pendant 30 minutes chacune puis filtrée par aspiration. Le filtrat a été concentré et le culot obtenu remis en suspension dans de l'éthanol à 80%. Chaque solution a été filtrée avant l'analyse HPLC.

Pour l'analyse HPLC, on a utilisé une colonne à chromatographie en phase inverse, en C18 ; une phase mobile constituée de méthanol (solution A) et d'acide phosphorique de pH 2,5 (solution B) ; un débit de 0,6 ml/mn ; la colonne est thermostatée à 30°C durant l'analyse et enfin, on a utilisé une méthode de détection par absorption ultra-violet à 360nm.

ii. Résultats

On a établi des courbes standards à partir de l'analyse HPLC d'échantillons purs des 3 flavonoïdes (hypérine, quercitrine et quercétine) dont la concentration est connue (spectre A).

On a analysé par HPLC les 3 flavonoïdes contenus dans les 23 échantillons des plantes de 22 provenances (spectre B). On a ensuite calculé l'aire sous la courbe (AUC) du pic du spectre d'absorbance moyenne pour chaque flavonoïde présent dans les échantillons, grâce à la courbe étalon correspondante établie précédemment.

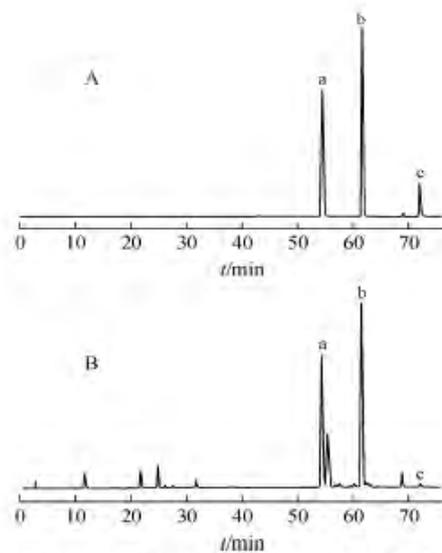


Fig. 2 Chromatogram of HPLC analysis
 A. Profile of standard flavonoids. a. hyperin ($0.48 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), b. quercitrin ($0.62 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), and c. quercetin ($0.066 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).
 B. Profile of a sample of *H. cordata*. Absorbance peaks of the corresponding hyperin, quercitrin and quercetin were marked with a, b and c, respectively.

Fig 44 : Spectre HPLC des flavonoïdes

Quantative Variation of Flavonoids in *Houttuynia cordata* from Different Geographic Origins in China [16]

L'analyse statistique des résultats est basée sur l'analyse des variances (méthode ANOVA). Et un résultat est considéré comme significatif si $p < 0,05$.

Les résultats montrent que les quantités d'hypérine (fig 28), de quercitrine (fig 27) et de quercétine (fig 40) ont toutes varié de façon significative :

- ✓ La teneur en hypérine a varié de 178,6 à 622,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (soit un rapport de 3,5)
- ✓ La teneur en quercitrine est passée de 319,3 à 789,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (un facteur 2,5)
- ✓ La teneur en quercétine a varié de 6,8 à 12,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (un facteur 1,8)

On remarque aussi que les teneurs en hypérine et en quercitrine sont relativement élevées par rapport à celle de la quercétine. En effet, on a obtenu en moyenne 4,313 mg d'hypérine et 5,738 mg de quercitrine à partir d'1g de tige aérienne de plante séchée, alors qu'on n'en a obtenu que 0,096 mg de quercétine dans la même quantité d'échantillon. La quercétine est donc minoritaire dans les échantillons analysés.

iii. Teneur en flavonoïdes et caractéristiques morphologiques

Dans un second temps, on a voulu savoir si le contenu en flavonoïdes de *Houttuynia cordata* est significativement lié à ses caractéristiques morphologiques. Pour cela, on a divisé les individus en 2 catégories basées sur leurs traits morphologiques principaux : couleur des feuilles, internode long ou court, couleur des feuilles matures, bordure du limbe ondulé ou presque lisse, couleur de la tige).

Table 2 Biological characteristics of *H. cordata* plants originated from twenty-two provenances

#	Provenance	Type	Geographic origin		Growth trait			Morphological characteristics			
			Longitude ^o	Latitude ^o	Height (cm)	Stem size (cm.id)	Leaf color (early)	Internode (early)	Leaf color (late)	Leaf edge	Stem color
1	Yongfeng, Jiangxi	1	115°5'	27°4'	23.8	0.29	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
2	Guiyang, Guizhou	1	106°7'	26°6'	25	0.29	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
3	Liandu, Zhejiang	1	119°9'	28°5'	28.8	0.29	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
4	Qingyuan, Zhejiang	1	119°1'	27°6'	23.1	0.32	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
5	Changsha, Hunan	1	113°0'	28°2'	28.6	0.28	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
6	Jiashan, Zhejiang	1	120°9'	30°8'	18.1	0.29	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
7	Yongkang, Zhejiang	1	120°0'	28°9'	21.3	0.31	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
8	Taishun, Zhejiang	1	119°7'	27°5'	23.1	0.26	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
9	Shengzhou, Zhejiang	1	120°6'	29°5'	19.6	0.25	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
10	Changxing, Zhejiang	1	120°0'	30°9'	20.7	0.2	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
11	Jinyun, Zhejiang	1	120°1'	28°6'	22.4	0.3	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
12	Yunhe, Zhejiang	1	119°6'	28°1'	21.5	0.23	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
13	Qingtian, Zhejiang	1	120°3'	28°2'	23.2	0.34	Green	Long	Emerald green	Wavy	Light red
14	Shaxian, Fujian	2	117°8'	26°4'	23.2	0.31	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Purplish red/ Green
15	Huize, Yunnan #1	2	102°7'	26°2'	15.3	0.28	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Green
16	Huize, Yunnan #2	2	102°7'	26°2'	18.6	0.37	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Purplish red
17	Anshun, Guizhou	2	105°9'	26°3'	20.1	0.29	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Purplish red/ Green
18	Zhengyang, Henan	2	114°4'	32°7'	17.3	0.23	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Purplish red/ Light red
19	Liuzhou, Guangxi	2	109°4'	24°3'	23	0.36	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Light red/ Green
20	Kaixian, Chongqing	2	106°5'	29°5'	16.2	0.25	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Light red/ Green
21	Xichang, Sichuan	2	102°3'	27°9'	8.1	0.2	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Light red/ Green
22	Kailua, Zhejiang	2	118°4'	29°2'	9.2	0.27	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Light red/ Green
23	Jixi, Anhui	2	118°6'	30°1'	11.3	0.24	Purplish red	Short	Blackish green	Nearly smooth	Light red/ Green

Fig 45 : Caractéristiques biologiques des plantes de 22 provenances

Quantative Variation of Flavonoids in *Houttuynia cordata* from Different Geographic Origins in China
[16]

Il ressort donc deux catégories de plantes :

- ✓ **Type 1** : plantes avec les feuilles vertes, une tige longue en début de croissance puis des feuilles matures vert émeraude et ondulées
- ✓ **Type 2** : plantes avec des feuilles vertes et une tige courte en début de croissance puis des feuilles vert noirâtre et presque lisses en fin de croissance

Lorsqu'on analyse les résultats des teneurs en flavonoïdes dans ces deux groupes différents, on remarque :

- ✓ Une teneur en hyperine dans le type 1 supérieure à celle du type 2, mais qui est non significative ($p = 0,097$)
- ✓ Une teneur en quercitrine dans le type 1 inférieure à celle du type 2 significative ($p = 0,012$)
- ✓ Une teneur en quercétine non significativement différente ($p = 0,43$)

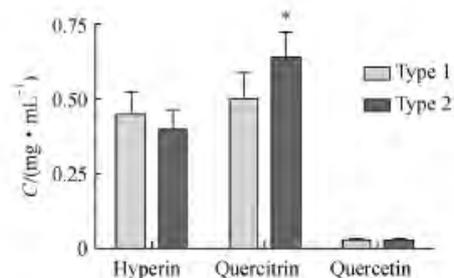


Fig. 3 Comparison of flavonoids in *H. cordata* plants with two different types of morphological traits. $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$

Fig 46 : Comparaison des flavonoïdes dans les 2 types de plantes

Quantitative Variation of Flavonoids in *Houttuynia cordata* from Different Geographic Origins in China

[16]

Ces résultats suggèrent donc que la teneur en quercitrine est significativement associée aux caractéristiques morphologiques d'*Houttuynia cordata*. Alors que ni les quantités d'hyperine ou de quercétine ne sont significativement corrélées à la morphologie des plantes.

iv. Teneur en flavonoïdes et région géographique

L'analyse de corrélation n'a pas permis de montrer un lien significatif entre la teneur en flavonoïdes de *Houttuynia cordata* et la région d'origine de la plante (longitude et latitude) ou leur trait de croissance des plantes (hauteur et taille des tiges, diamètre au sol).

5. Propriétés

Les chercheurs ont abondamment étudié les différentes propriétés, *in vitro* et *in vivo*, qu'on peut attribuer à *Houttuynia cordata*. On peut les classer dans plusieurs catégories.

Les chercheurs ont aussi cherché à déterminer la liaison aux protéines et la distribution dans les tissus de l'houttuynine, qui peuvent expliquer les effets bénéfiques et éventuellement néfastes d'*Houttuynia cordata* Thunb.

1) Activité antiinfectieuse

L'activité antibactérienne et antivirale a été étudiée dans plusieurs travaux dont les suivants :

a) Variation de la composition chimique et activités antibactériennes de l'huile essentielle d'*Houttuynia cordata* Thunb.

Dans cette publication [9], les chercheurs ont étudié la croissance bactérienne de 2 microorganismes (*Staphylococcus aureus* et *Sarcina ureae*) en présence de différentes concentrations d'*Houttuynia cordata*.

Ces deux souches : *Staphylococcus aureus* et *Sarcina ureae*, ont été choisies car ce sont les souches les plus sensibles à l'huile essentielle d'*Houttuynia cordata* et qu'elles sont à l'origine de nombreuses infections chez l'Homme.

On a donc évalué la croissance des cultures, à 37°C, pour environ 10⁵ UFC (unités formant colonies) par millilitre.

La première méthode est celle de la dilution en série dans du bouillon, où on a mélangé 0,1ml de suspension bactérienne avec 0,5ml de chaque dilution d'huile essentielle [9]. Les cultures sont ensuite incubées pendant 16 heures, à 37°C.

La seconde méthode a consisté en une dilution en gélose. L'agar est fondu dans un bain de vapeur à 30°C, pour éviter sa solidification. On a pré-inoculé 5 boîtes de Pétri avec 0,1ml de suspension bactérienne, auxquelles on a ajouté 25ml de gélose MH fondue. On a enfin

introduit dans chaque boîte de Pétri étiquetée une quantité connue d'huile essentielle d'*Houttuynia cordata*, avant de les laisser incuber à 37°C pendant 24h.

On a utilisé de l'ampicilline sodique comme contrôle positif, à des concentrations allant de 0,0975 à $1,56 \cdot 10^{-3}$ mg/ml.

La dernière étape de l'expérience a été l'évaluation à l'œil nu de la croissance ou de la non croissance des bactéries. On a ainsi pu définir la concentration minimale inhibitrice (CMI), comme étant la concentration la plus faible capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible. La CMI correspond à l'absence de turbidité visuelle.

Les résultats montrent que l'huile essentielle présente une activité antibactérienne contre les deux souches testées, allant d'une efficacité comparable à celle de l'ampicilline à une activité modérée.

Cette activité est liée aux différents composants présents dans l'huile essentielle et à leur synergie d'action. En effet, certains composés sont moins efficaces seuls qu'associés à un mélange complexe d'éléments dans une huile essentielle. Les chercheurs pensent que ces effets peuvent être de plusieurs ordres : perturbation de l'intégrité de la membrane et donc augmentation de la perméabilité membranaire et perte de cytoplasme, inhibition des processus de respiration cellulaire et de transport d'ions par exemple.

b) Les constituants d'*Houttuynia cordata* et leurs bioactivités

Dans l'étude "The Constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata*" [10], on a voulu comparer l'activité des différents composants d'*Houttuynia cordata* sur le virus de l'Herpès Simplex 1 (HSV-1).

Pour cela, on a utilisé des cellules Véro, qu'on a cultivées sur un milieu minimal essentiel, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. On les a incubées à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂.

Pour préparer le stock d'HSV-1 (souche KOS, VR-1493, ATCC), les cellules Vero ont été infectées par HSV-1 à une multiplicité d'infections (Multiplicity Of Infection, MOI) de 3 unités formant des plaques (PFU) / cellule et récoltées 24 heures après l'infection.

Les cellules Vero ($3,5 \cdot 10^5$ par plaque) sont ensuite recouvertes avec les composants d'*Houttuynia cordata* que l'on va tester (100 $\mu\text{mol/litre}$ chacun) et 100 unités formant colonie (UFC) de HSV-1 par plaque. Les virus sont adsorbés pendant une heure à 37°C et on ajoute 1% de méthylcellulose à chaque puits.

Après cinq jours, on compte les plaques de virus formées dans les cellules Vero par coloration au cristal violet. On calcule ensuite les activités de formation ou d'inhibition des composés testés et de l'aciclovir (contrôle positif).

Les résultats montrent :

- La **norcépharadione B** a significativement supprimé la réplication du virus (46,38% +/- 1,06%, pour une concentration de 100 μM). Cette **suppression de la réplication virale** pourrait être impliquée dans l'activité thérapeutique antivirale d'*Houttuynia cordata*.
- Le **pipérolactame**, le **réséoside** et l'**afzéline** (fig 29) ont montré une **activité antivirale** modérée avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 20,48% +/- 0,00 ; 20,45% +/- 1,76 et 25,44% +/- 1,76.
- On a étudié les composés 4-hydroxybenzamide ; 4-hydroxy-3-méthoxybenzamide ; quercitrine ; quercétine-3-O- β -D-galactopyranoside ; afzéline ; acide vanillique ; vanilline ; acide protocatéchique et méthylparaben pour leurs **propriétés antioxydantes** dans le test de neutralisation des radicaux libres du DPPH. Il en ressort que la **quercitrine**, la **quercétine-3-O- β -D-galactopyranoside** et l'**afzéline** sont actifs pour une concentration de 250 μM (avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 84, 82 et 50 %). La quercitrine et la quercétine-3-O- β -D-galactopyranoside (CI_{50} = 31 et 63 μM respectivement) sont même comparées au composé de référence qui est la vitamine E (CI_{50} = 80 μM).
- Enfin, on a testé l'**activité tyrosinase** (enzyme qui catalyse l'oxydation des phénols), sur les composés aristolactame AII, aristolactame BII, cépharadione, norcépharadione B, 4-hydroxybenzamide, méthyl vanillate et p-hydroxybenzaldéhyde. La **cépharadione** montre une activité inhibitrice (CI_{50} = 170 μM) comparable à celle du composé de référence, l'acide kojique (CI_{50} = 160 μM)

Ici aussi, on constate que plusieurs composants sont impliqués dans l'activité anti-HSV-1 d'*Houttuynia cordata*.

c) Activités anti-SRAS et immunomodulatrice d'*Houttuynia cordata*

Dans cette publication de 2007 [18], Laua *et al* ont étudié l'activité d'*Houttuynia cordata* sur le coronavirus SRAS (SRAS-CoV).

Le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) est une forme potentiellement mortelle de pneumonie, causée par un coronavirus. De la fin de l'année 2002 au début de l'année 2003, il a infecté plus de 8 000 personnes sur la planète selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), dont la majorité en Chine. En raison de l'absence de traitement définitif parmi les médicaments « occidentaux » et du fait qu'*Houttuynia cordata* est habituellement utilisée pour traiter la pneumonie, des scientifiques chinois ont sélectionné la plante pour étudier son activité sur le virus.

i. Préparation de l'extrait d'*Houttuynia cordata*

On a préparé l'extrait à partir d'*Houttuynia cordata* récoltée dans la province du Sichuan en Chine. On a obtenu l'extrait aqueux à partir de 300g d'*Houttuynia cordata*, porté à ébullition dans 3 litres d'eau distillée, sous reflux, pendant deux fois une heure. L'extrait est ensuite centrifugé et filtré pour éliminer les petits débris présents. Enfin, on a lyophilisé le filtrat en une poudre sèche. Le rendement de l'extraction avoisine les 14 %.

On a établi le profil HPLC de cet extrait standard avec une détection par photodiode.

On a ensuite dissout l'extrait dans de l'éthanol à 30 % afin d'obtenir une solution de concentration égale à 10 mg/mL, puis on a filtré sur une membrane de 0,45 µm.

On injecte 10 µL de la solution dans le système HPLC [18], puis on procède à l'élution.

ii. Préparation des lymphocytes spléniques

Dans cette expérience, on a utilisé des souris femelles Balb/c, fournies par le Laboratory Animal Center de la Chinese University of Hong Kong, maintenues dans une pièce à température comprise entre 22 et 25°C, avec des cycles jour/nuit de 12 heures, une nourriture standard et un accès libre à l'eau.

On sacrifie les animaux et on retire la rate en vue d'obtenir une suspension cellulaire unique, par pression des rates à travers un tamis stérile et dans un milieu RPMI complet (voir

glossaire). On dispose ensuite cette suspension cellulaire unique en plusieurs couches dans une solution Ficoll-Paque Plus, avec un gradient de densité de 1,077 g/mL. On collecte les lymphocytes spléniques à l'interface après centrifugation à 660 tours/mn pendant 20 minutes à température ambiante. Les lymphocytes spléniques sont ensuite lavés avec du milieu RPMI et remis en suspension dans un milieu RPMI à une concentration de 5.10^6 cellules par millilitre.

iii. Essai d'incorporation de thymidine 3H

L'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* est dissout dans du milieu RPMI complet et incubé avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de sulfate de polymyxine B à 37°C pendant 1 heure pour masquer l'effet de la présence probable d'endotoxine dans l'extrait.

On ensemence les lymphocytes spléniques sur une plaque 96 puits (5.10^6 cellules par puits) et on incube avec l'extrait d'*Houttuynia cordata* à différentes concentrations (0, 50, 100, 200 ou 400 $\mu\text{g/mL}$), pendant 48 ou 72 heures.

On ajoute ensuite de la Thymidine tritiée, puis on incube 6h à 37°C.

On collecte les cellules et on mesure l'incorporation de Thymidine tritiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

L'indice de stimulation est alors égal à :

$$\frac{\text{cpm des cellules traitées}}{\text{cpm des cellules non traitées}}$$

Cpm : coup par minute (voir glossaire)

iv. Détermination de la population cellulaire T

Les lymphocytes spléniques sont traités pendant 24, 48 ou 72 h à 37°C dans des plaques 12 puits en présence de différentes concentrations d'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* [18], lui-même pré-incubé avec du sulfate de polymyxine B, comme décrit plus haut.

Les lymphocytes sont ensuite lavés avec du tampon de coloration à froid, 0,05 % d'azoture de sodium dans du PBS et sont immobilisés avec un IgG de souris et de rat.

On incube sur de la glace pendant 30 mn avec de l'isocyanate de fluorescéine (FITC) conjugué à un anticorps de rat anti-CD₄ de souris et de la phycoérythrine (PE) conjuguée à un anticorps de rat anti-CD₈ de souris.

Enfin, on lave les cellules avec du tampon de coloration et on les fixe avec 0,8 mL de paraformaldéhyde à 1%. On va ensuite les analyser en cytométrie de flux (voir glossaire).

v. Test ELISA

Le surnageant de la culture cellulaire des lymphocytes spléniques est traité par *Houttuynia cordata* pendant 24, 48 ou 72 h. Et on va tester la présence de cytokines (dont IL₂, IL₄, IL₁₀ et IFN γ).

vi. Essai protéase-like SRAS CoV 3C (3CL^{pro})

On va construire un plasmide à partir d'un fragment d'ADN codant pour la protéine principale de SRAS CoV, qu'on va amplifier par PCR en utilisant deux amorces :

- ✓ [5' TAG CTA GAA TTC GGA TCC AGT GGT TTT AGG AAA ATG 3']
- ✓ [5' TAA CTA AAG CTT TTG GAA GGT AAC ACC AGA 3']

On va ensuite digérer les fragments produits par Bam H₁ et Hind III. L'ADN est ensuite ligué avec un plasmide digéré par pET 3a contenant le gène de la maltose binding protein (MBP).

On obtient donc un plasmide résultant qui encode la protéase, avec un tag N-terminal : His-MBP.

De la même façon, les chercheurs ont construit un fragment d'ADN de la séquence du substrat, à l'aide de la protéine fluorescente jaune (yellow fluorescent protein ou YFP), digéré par SacI et KpnI, puis ligué à un plasmide linéarisé pET 3a (précédemment cloné avec la protéine fluorescente cyan : CFP).

On obtient donc un plasmide résultant qui encode une séquence du substrat, clonée avec CFP et YFP.

On va ensuite exprimer cette protéine recombinante pET 3a-3CL^{pro} à l'aide de la bactérie *Escherichia coli* marquée BL 21, purifier la protéine SRAS CoV 3CL^{pro} tagguée par Histidine et exprimer et purifier la protéine GST-fusion SRAS CoV RdRp [18].

vii. Résultats

Les résultats montrent que l'extrait d'*Houttuynia cordata* a significativement stimulé la prolifération des lymphocytes spléniques de souris, et ceci de façon dose-dépendante (test de Mann-Whitney, statistiquement significatif pour $p < 0,05$). On remarque aussi que la stimulation est plus importante après 48 heures qu'après 72 heures.

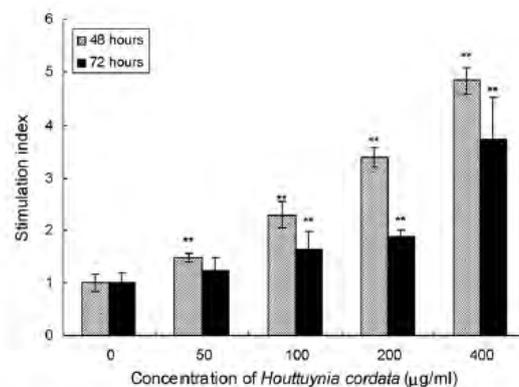


Fig. 1. Lymphoproliferation activity of *Houttuynia cordata* extract on mouse splenic lymphocytes after 48 and 72 h treatment. The results are expressed as mean \pm S.D. of six values from one representative experiment. ** $p < 0.01$ vs. control (0 μ g/ml).

Fig 47 : Effet lymphoprolifératif de *Houttuynia cordata* sur les lymphocytes spléniques de souris
Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata* [18]

On s'intéresse ensuite plus particulièrement à la population cellulaire T stimulée par l'extrait d'*Houttuynia cordata*. Pour cela, on utilise la cytométrie de flux afin de mesurer le nombre de lymphocytes T CD4+ et T CD8+.

On constate que l'extrait d'*Houttuynia cordata* augmente la proportion de lymphocytes T CD4+ de façon dose-dépendante [18], mais il augmente aussi le nombre de lymphocytes T CD8+ après traitement. Les deux sous populations lymphocytaires sont donc stimulées *in vitro*.

L'étude sur la sécrétion de cytokines par le test d'ELISA a permis d'évaluer l'effet d'*Houttuynia cordata* sur l'activation des cellules T, mais aussi son rôle dans la différenciation des lymphocytes T helper (mesure de la sécrétion d'IL₂, IL₄, IL₁₀ et IFN γ). Après 48 et 72 heures de traitement, on remarque que :

- ✓ le niveau d'IL₂ est augmenté de façon dose-dépendante (graphe A). L'interleukine 2 est produite principalement par les cellules Th1, qui aident à l'activation des macrophages et des Tc, utiles à l'élimination de l'infection intracellulaire.
- ✓ la sécrétion d'IL₁₀ par les lymphocytes spléniques murins est elle aussi significativement augmentée (graphe B). L'interleukine 10 est produite par les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) qui jouent un rôle clé dans la suppression de la réponse cellulaire Th1, ainsi qu'un rôle de protection de l'hôte contre les effets nocifs d'une réponse immune cellulaire exacerbée durant une infection aigue.

Il semble que l'induction des Tr1 par *Houttuynia cordata* peut aider à arrêter la réponse immunitaire après l'élimination du pathogène et ainsi prévenir un effet nocif.

- ✓ Par contre, le niveau d'IL₄ (graphe C) reste inchangé et celui d'IFN γ (graphe D) est quant à lui significativement diminué et de façon dose-dépendante. L'interleukine 4 est surtout produite par les cellules Th2, qui médient la réponse anti-allergique et anti-helminthique. L'interféron γ est lui sécrété par les cellules Th1.

L'essai d'incorporation de Thymidine tritiée montre aussi que la réponse stimulatrice provoquée par *Houttuynia cordata* est supérieure après 48 heures, par rapport à 72 heures. Ceci peut être dû au rétrocontrôle négatif de la part des cellules Tr1 qui suppriment la réponse Th1.

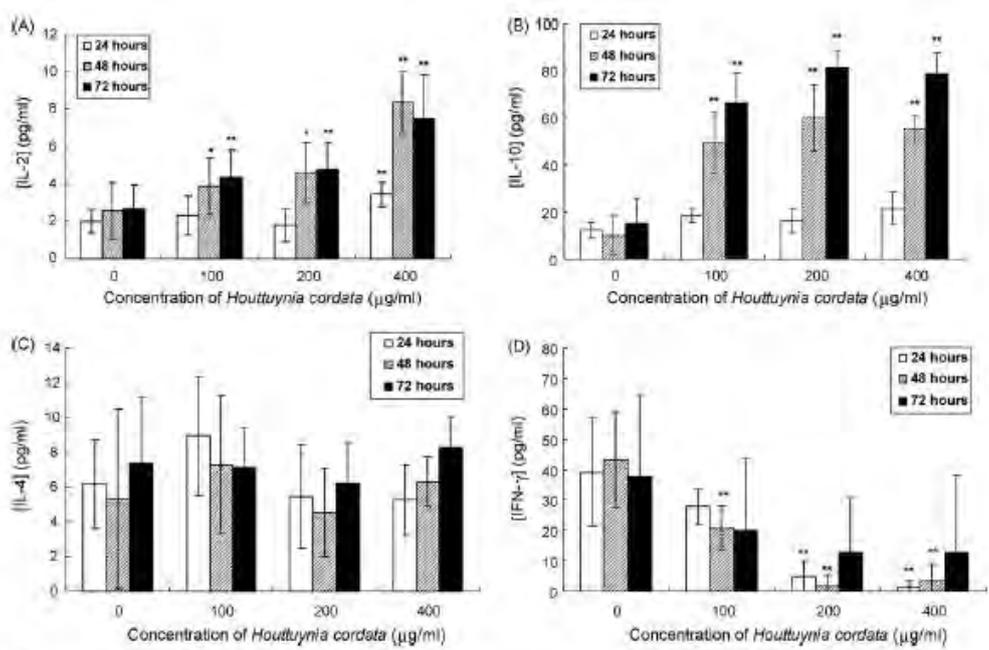


Fig. 2. Effect of *Houttuynia cordata* on IL-2 (A), IL-10 (B), IL-4 (C) and IFN- γ (D) production in mouse splenic lymphocytes. Mouse splenic lymphocytes were treated with HC extract for 24, 48 and 72 h. Cytokine production was measured by ELISA. Data are expressed as mean \pm S.D. of values from at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (0 $\mu\text{g/ml}$).

Fig 48 : Effet d'*Houttuynia cordata* sur la sécrétion de cytokines par les lymphocytes spléniques murins

Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata* [18]

L'évaluation de l'effet sur SRAS CoV-3CL_{pro} par dosage à base de protéines fluorogéniques [18] montre qu'avec une concentration supérieure ou égale à 200 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait d'*Houttuynia cordata*, on inhibe significativement l'activité de 3CL^{pro} ($p < 0,05$) et avec une dose plus forte (1000 $\mu\text{g/ml}$), l'activité de 3CL^{pro} est diminuée de 50% par rapport au contrôle. On en déduit que *Houttuynia cordata* inhibe de façon dose-dépendante l'activité de l'enzyme virale 3CL_{pro} : principale protéase de SRAS-CoV, responsable du relargage d'enzymes répliquatives clés (Rd-Rp et hélicase par exemple) à partir de précurseurs polyprotéiques.

Dans cette publication, les chercheurs ont aussi étudié la toxicité orale de l'extrait en administrant une dose unique d'extrait à 20 souris Balb/c (10 femelles et 10 mâles). Il en résulte que tous les animaux semblent normaux après 7 jours d'observation : il n'y a pas de différence de poids entre groupe contrôle et groupe ayant reçu l'extrait ($p < 0,05$). L'extrait est donc considéré comme non toxique pour les animaux de laboratoires après une administration orale de 16 g/kg de poids.

Cette publication montre donc le rôle essentiel des cellules T dans l'immunité acquise contre les infections virales.

- ✓ Les lymphocytes T helper CD_4^+ antiviraux aident à la production d'anticorps spécifiques de virus par les lymphocytes B.
- ✓ Les lymphocytes cytotoxiques CD_8^+ (Tc) peuvent tuer des cellules hôtes infectées par un virus.
- ✓ On observe généralement une lymphopénie chez les patients atteints de SRAS, lors de la phase initiale de l'infection.
- ✓ On a suggéré comme cause de cette lymphopénie l'apoptose des lymphocytes, induite par le virus.
- ✓ Les monocytes et lymphocytes T sont impliqués dans les deux types de réponses immunitaires (innée et acquise). La destruction de ces lignées cellulaires pourrait mener à une réponse immunitaire compromise et au développement de la maladie.

D'après tous ces résultats, on note que les actions de *Houttuynia cordata* sur le coronavirus sur SRAS peuvent être biphasiques :

- ✓ **Avant l'invasion par le SRAS-CoV** : l'extrait d'*Houttuynia cordata* pourrait activer l'immunité médiée par les cellules, en stimulant la prolifération des lymphocytes T CD_4^+ helper et T CD_8^+ afin de prévenir l'infection virale.
- ✓ **Dans le cas d'une infection par le SRAS** : *Houttuynia cordata* pourrait ralentir le processus de réplication virale en inhibant les enzymes virales clés et en déclenchant un rétrocontrôle négatif du système immunitaire.

d) Activités biologique et antibactérienne de l'extrait aqueux de la plante *Houttuynia cordata* contre le pathogène bactérien intracellulaire *Salmonella* chez les macrophages RAW 264.7

Dans cette publication de Kim *et al*, parue en 2008 [19], on a cherché à étudier l'activité antibactérienne de *Houttuynia cordata* contre la salmonellose, une infection bactérienne, provoquée par des entérobactéries du genre *Salmonella* [20] causant divers syndromes allant de l'entérite « autolimitée » à une infection fatale chez les animaux et d'une infection alimentaire à la fièvre typhoïde chez l'Homme.

i. La Salmonellose

La Salmonellose est une zoonose (affection transmise à l'Homme par l'animal).

La plupart des bactéries du genre *Salmonella* sont des parasites de l'intestin des animaux vertébrés. Ce sont des pathogènes intracellulaires facultatifs, caractérisés par leur mobilité, une forme de tige et un type Gram négatif.

La transmission à l'Homme se fait le plus souvent par l'ingestion d'aliments contaminés [20]. Compte tenu du large spectre d'animaux porteurs de *Salmonella*, la transmission peut avoir lieu via une grande diversité de produits, notamment s'ils sont consommés crus ou insuffisamment cuits : les volailles, les produits carnés, œufs, et produits laitiers. La contamination peut aussi intervenir après la cuisson par l'intermédiaire de l'Homme (contamination dite manuportée). A noter aussi que la contamination est possible, mais rare, lors d'un contact direct avec un animal atteint (la plupart des reptiles sont des porteurs sains de la bactérie).

L'émergence récente de multirésistances chez ces bactéries constitue un problème de santé mondial. En effet, pour neutraliser les bactéries intracellulaires telles que les *Salmonella*, on doit trouver des antibiotiques de plus en plus performants.

Dans cette étude, on observe les effets antibactériens ainsi que l'activation des macrophages par l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* : changements morphologiques des macrophages, production de monoxyde d'azote, activité phagocytaire...

On utilise un extrait aqueux préparé à partir de poudre d'*Houttuynia cordata* [19].

On utilise des sérovirs *Salmonella enterica Typhimurium* (*S. typhimurium*), cultivés dans du glycérol ou du bouillon d'agar à 37°C [19].

ii. *Activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'Houttuynia cordata*

On évalue l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux après avoir dilué les bactéries avec une solution saline de tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 et différentes concentrations d'extrait aqueux. Après incubation à 37°C pendant 0, 2, 4 et 8 heures, on étale 100µL de chaque solution sur de l'agar afin d'évaluer les unités formant colonies bactériennes (UFCs).

On observe une activité antibactérienne significative sur *S. typhimurium* de la part de l'extrait aqueux, par rapport aux bactéries incubées sans l'extrait aqueux [19].

En effet, sans *Houttuynia cordata*, il y a une légère prolifération des bactéries après 8 heures.

Pour les bactéries incubées avec l'extrait aqueux, on constate une légère augmentation des effets antibactériens, de façon dose-dépendante.

iii. *Effets cytotoxiques et changements morphologiques des macrophages*

Pour cela, on a tout d'abord procédé à un examen microscopique des macrophages [19]

Chez les cellules traitées par l'extrait d'*Houttuynia cordata*, on observe des changements dendritiques que l'on n'observe pas chez les cellules non traitées. On en déduit que notre extrait affecte la morphologie cellulaire des macrophages, de façon dose-dépendante. Ces modifications atteignent jusqu'à 50% des cellules après 8 heures d'incubation.

On a par ailleurs réalisé un essai cytotoxique au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) avec différentes concentrations d'extrait aqueux [19] pour

étudier la viabilité cellulaire par mesure de l'absorbance à 540 nanomètres à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats montrent un taux de survie des macrophages de 99 +/- 1% dans le groupe 25 µg/mL d'extrait aqueux ; 98 +/- 2% dans le groupe 50 µg/mL et 98 +/- 1% dans le groupe 100 µg/mL, comparé aux macrophages non traités (taux fixé à 100%). L'extrait aqueux n'est donc pas cytotoxique pour les macrophages.

iv. Détermination de l'internalisation bactérienne et de la croissance intracellulaire de *Salmonella typhimurium*

On a voulu étudier ici l'internalisation et la croissance intracellulaire de la bactérie. Pour cela, on infecte les macrophages avec *S. typhimurium* (1.10^4 bactéries). On les incube ensuite à 37°C [19] sur un milieu contenant de la gentamycine (30 µg/mL) pendant 30 minutes pour neutraliser les bactéries extracellulaires. Ensuite, on compte les cellules viables (à 30 et 60 minutes), on lave les monocouches de macrophages infectés puis on les lyse. Les aliquots de lysats sont ensuite disposés sur de l'agar LB en vue d'obtenir des UFCs bactériennes.

Les résultats [19] montrent une internalisation bactérienne augmentée, de façon dose-dépendante, chez les cellules traitées par HCWE (*Houttuynia cordata* water extract). Le taux d'absorption bactérienne des macrophages traités par HCWE est 2 à 2,5 fois plus élevé que chez les macrophages non traités, après 60 minutes d'incubation.

v. Essai du nitrite et expression ARNm iNOS

Pour cette expérience, on incube les cellules RAW 264.7 sur des plaques 12 puits en présence de HCWE (0, 25, 50, 100 µg/mL) pendant 2, 4 et 8 heures. On prélève le surnageant sans cellule, qu'on transfère sur une plaque 96 puits, qu'on incube avec des volumes égaux de réactif de Griess (servant à déterminer la présence de nitrate réductase) dans l'obscurité pendant 10 minutes. On détermine alors l'absorbance à 450 nm en vue de déterminer la concentration en nitrite (en utilisant le nitrite de sodium comme étalon).

D'autre part, on prépare l'ARN en incubant des cellules RAW 264.7, avec ou sans HCWE (100 µg/mL) pendant 4 heures avant de les traiter par de la gentamycine puis de les mettre en présence de *Salmonella*. Après une incubation de 4 ou 8 heures, on isole l'ARN total, qu'on va quantifier par absorption à 260 nm.

On effectue ensuite une RT-PCR afin d'étudier l'expression de gène house-keeping : glyceraldéhyde-3-phosphate-déhydrogénase (GAPDH) comme contrôle [19].

D'après les résultats [19], on remarque que la production de monoxyde d'azote par les macrophages après 2 et 4 heures d'incubation est similaire, voire légèrement augmentée dans les cellules traitées par HCWE et non traitées.

Par contre, pour les macrophages ayant reçus 100 µg/mL de HCWE, la production de monoxyde d'azote est multipliée par 2, par rapport aux cellules non traitées, après 8 heures d'incubation.

Par ailleurs, on sait que l'infection par *Salmonella sp.* induit une forte réponse inflammatoire et l'enzyme iNOS (oxyde nitrique synthase inductible) chez les macrophages.

La RT-PCR menée pour déterminer si l'augmentation de production de NO, due à HCWE, est médiée par des changements de l'expression de l'ARNm de iNOS montre que :

- ✓ Chez les cellules RAW 264.7 non traitées par *S. typhi* ni HCWE, l'ARNm d'iNOS n'est exprimé dans aucune expérience
- ✓ Chez les cellules RAW 264.7 non traitées par HCWE mais traitées par *S. typhi*, l'expression de l'ARNm est temps-dépendante après 8 heures
- ✓ Et chez les cellules RAW 264.7 traitées par *S. typhi* et HCWE, le taux d'ARNm est similaire après 4 heures et augmenté significativement après 8 heures.

vi. Traitement de la Salmonellose murine par HCWE

Dans cette expérience, on va infecter des souris femelles Balb/c par une dose intra-péritonéale létale de *S. typhimurium*, puis on va ensuite leur administrer du sérum physiologique ou de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* (25, 50, 100 mg/ml), afin de déterminer la viabilité des souris infectées après 24 heures.

Cette expérience montre qu'après 7 jours, les souris non traitées sont toutes mortes de l'infection. Alors que pour les groupes traités par HCWE, on observe une survie jusqu' à J11 (groupe 25 mg/ml HCWE), J17 (groupe 50 mg/ml) et J23 (groupe 100 mg/ml).

Ce travail nous montre donc que :

- ✓ Les cellules traitées par de fortes concentrations d'extrait aqueux présentent des modifications morphologiques.
- ✓ L'activité phagocytaire des macrophages semble renforcée chez les cellules traitées par la plante.
- ✓ HCWE active l'internalisation de la bactérie ainsi que l'activité phagocytaire des macrophages
- ✓ Le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène ont été identifiés comme étant des molécules effectrices importantes, produites par les macrophages et impliquées dans la défense de l'hôte contre les micro-organismes et les cellules tumorales. Ici, on a pu constater que les taux de NO et de l'enzyme clé de sa synthèse : iNOS, ont été augmentés lorsque les cellules infectées par *S. typhimurium* ont été traitées par HCWE (100 mg/ml, 8 heures).
- ✓ Par contre la réplication bactérienne n'a pas été affectée.

En conclusion, on peut dire que le traitement par HCWE induit indirectement l'augmentation de production de NO et l'expression d'iNOS, en stimulant l'activation phagocytaire dans les cellules infectées.

L'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* semble présenter une activité antibactérienne contre les pathogènes intracellulaires.

e) La supplémentation diététique à base d'un probiotique fermenté composé de quatre plantes améliore l'activité immunitaire chez les poulets infectés expérimentalement ainsi que leur survie contre *Salmonella gallinarum*

Cette étude menée en 2010 par Jung *et al* [21] s'est intéressée au potentiel en tant que stimulant immunitaire et antimicrobien d'un probiotique à base de 4 plantes : *Curcuma longa*, *Houttuynia cordata*, *Prunus mume* et *Rubus coreanus*.

En effet, on constate une surconsommation mondiale d'antibiotiques vétérinaires, qui conduit peu à peu à des problèmes de développement et de propagation de souches résistantes, ainsi que des gènes de résistance transmis de l'animal à l'Homme par la consommation de produits d'origine animale contenant des résidus d'antibiotiques. Ceci explique le besoin urgent d'identifier et de développer des compléments alimentaires respectueux de l'environnement et permettant de diminuer l'utilisation d'antibiotiques, notamment par un mécanisme de renforcement du système immunitaire.

i. Probiotiques et « aliments santé »

Les plantes étudiées ici sont connues pour être des médicaments traditionnels et des « aliments santé » :

- ✓ *Curcuma longa* : curcuma, plante herbacée vivace, rhizomateuse, du genre *Curcuma* et de la famille des Zingibéracées, originaire d'Asie du Sud [22].
- ✓ *Houttuynia cordata*
- ✓ *Prunus mume* : abricotier du Japon, qui est un arbuste à fruits à noyaux, du genre *Prunus* et de la famille des Rosacées [23]
- ✓ *Rubus coreanus* : [24]

On a récemment rapporté que ces plantes sont de potentiels immunostimulants et ont des propriétés antibactériennes :

- ✓ En effet, l'administration alimentaire de *Curcuma longa* augmente le nombre total de globules blancs et le taux d'anticorps circulants, ainsi que l'activité phagocytaire des macrophages de souris [25].
- ✓ Quant à *Houttuynia cordata*, on a montré qu'elle augmente la production de monoxyde d'azote (NO) et de cytokines par les macrophages activés par du LPS [18, 19, 26].

- ✓ *Prunus mume* présente des effets antimicrobiens potentiels contre de nombreux pathogènes (*Helicobacter pylori*, *Influenza virus A*) [27, 28].
- ✓ Enfin, *Rubus coreanus* est actif contre le virus de l'hépatite B [29].

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont administrés à la bonne dose, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte [30]. Les genres bactériens les plus fréquemment rencontrés dans les probiotiques sont : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* et *Streptococcus*. Certaines souches fongiques appartenant au genre *Saccharomyces* ont aussi été utilisées.

Les probiotiques ont un rôle important dans la régulation du système immunitaire :

- ✓ Les souches *Lactobacillus* induisent la maturation des cellules dendritiques [31]
- ✓ *Lactobacillus* et *Streptococcus* stimulent les cellules mononucléaires sanguines afin de promouvoir la production d'interféron γ , d'interleukine 12 et 18 [32]. Ils activent aussi le NF κ B et les voies de signalisation STAT dans les macrophages humains [33].
- ✓ Ils ont aussi des effets antimicrobiens potentiels contre des pathogènes graves : *Listeria monocytogenes* [34], *Salmonella typhimurium* [21, 35], *Escherichia coli* [36]

Dans cette étude, on a étudié l'effet d'un probiotique composé des quatre plantes citées précédemment sur le typhus de la volaille. Il s'agit d'une maladie septicémique bactérienne qui affecte les gallinacés de tous âges. Elle est causée par *Salmonella enterica* (sérovary *gallinarum*, *S. gallinarum*) et elle est caractérisée par une anémie, une leucocytose et une hémorragie. Même si cette maladie a été éradiquée en Australie, Amérique du Nord et dans la plupart des pays européens, c'est encore un problème important en Asie, en Afrique, en Amérique centrale et en Amérique du Sud.

ii. Préparation du probiotique fermenté

On a utilisé pour créer ce probiotique trois types de microorganismes : *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* et *Lactobacillus acidophilus* ; et les quatre plantes précédemment citées [21].

Dans chaque expérience indépendante, les poulets ont été randomisés selon 3 groupes d'alimentation : le groupe contrôle a reçu une nourriture nutritionnellement complète et sans antibiotique ; alors que les groupes exposés ont reçu le même complément alimentaire « probiotic fermented four-herbs » (PFH), mais à 1 % ou 2% (m/m).

iii. Détermination de l'activité du lysozyme dans le sérum et la rate

On détermine tout d'abord l'activité du lysozyme dans le sérum. Pour cela on collecte le sang de la veine de l'aile de chaque poulet (n=6 dans chaque groupe) à J 15. On obtient le sérum après centrifugation. On fait ensuite une dilution en série à partir de lysozyme standard, dilué dans du tampon phosphate (pH 6,2) afin d'obtenir une gamme de concentrations allant de 0,5 à 6,0 µg/ml [21]. On dispose chacune des solutions dans une plaque 96 puits, où le témoin négatif sera du tampon phosphate et le témoin positif une solution de *Micrococcus lysodeikticus*. On va ensuite déterminer l'absorbance à 540 nm après 15, 30, 45 et 60 minutes d'incubation à 41°C.

Pour chaque concentration, dans les échantillons de sérum et les solutions standards, on va déterminer le coefficient de régression (b) entre absorbance et temps. Enfin, on détermine l'activité du lysozyme (lyse de *M. lysodeikticus*) à partir de la corrélation du coefficient b et de la concentration en lysozyme.

Concernant l'activité du lysozyme dans la rate, on sacrifie les poulets et on prélève la rate. L'homogénat obtenu à partir de la rate est dilué dans du tampon phosphate pour obtenir une concentration de 1 mg/ml. L'activité du lysozyme de l'homogénat dilué est déterminée de la même façon que pour le sérum. Chaque échantillon est testé deux fois.

Les résultats montrent que [21] :

- ✓ la concentration en lysozyme dans le sérum du groupe PFH 2% (3,04 +/- 1,57 µg/ml) est significativement supérieure à celle du groupe contrôle (0,79 +/- 0,60 µg/ml).
- ✓ La concentration en lysozyme dans le sérum du groupe PFH 1% (2,43 +/- 1,86 µg/ml) montre aussi une tendance à la hausse comparé au groupe contrôle, même si elle n'est pas significative (p = 0,07)
- ✓ La concentration en lysozyme dans la rate du groupe PFH 2% (3,95 +/- 0,90 µg/ml) est ici aussi significativement supérieure au groupe contrôle (2,24 +/- 0,31 µg/ml) et au groupe PFH 1% (2,40 +/- 0,42 µg/ml)
- ✓ Cependant, on remarque qu'il n'y a pas de différence significative dans la concentration du lysozyme entre groupes contrôles et groupes PFH 1%.

iv. Evaluation de la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique

Ici, on va détecter les cellules vivantes obtenues par collecte du sang [21]. Les suspensions cellulaires sont diluées à une concentration finale de 1.10^7 cellules par millilitre dans du milieu RPMI 1640 avec 2% d'antimycosique et antibiotique et 100 µg/ml de LPS (mitogène).

Après 24 heures d'incubation dans un milieu à 5% de CO₂ à 41°C, on ajoute l'agent cytotoxique MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) puis on incube pendant 4 heures avant d'ajouter du solvant DMSO (diméthylsulfoxyde) [21].

On lit l'absorbance de chaque échantillon à 540 nm en utilisant un lecteur de plaque ELISA.

Les résultats montrent que la prolifération des cellules mononucléées périphériques du groupe PFH 2% (DO : 0,526 +/- 0,08) co-incubées avec le mitogène (LPS) est significativement augmentée par rapport au groupe contrôle (DO : 0,379 +/- 0,05). La prolifération des cellules mononucléées du groupe PFH 1% (DO : 0,460 +/- 0,06) montre une tendance à la hausse par rapport au groupe contrôle, sans être significative (P>0,05).

v. Mesure de PGE₂ dans le sérum et les cellules mononuclées

On va analyser le sérum et le milieu de culture des cellules mononuclées pour déterminer le taux de synthèse de prostaglandine E₂ [21].

On remarque que la synthèse systémique et la synthèse par les lymphocytes du sang périphérique de PGE₂ dans les groupes nourris par PFH est significativement diminuée en comparaison au groupe contrôle, et ceci de façon dose-dépendante.

vi. Détermination de la sous-population lymphocytaire T dans la rate

On a obtenu des suspensions unicellulaires par pression de la rate de chaque poulet à travers un tamis. L'analyse de ces cellules isolées va permettre de déterminer la proportion de cellules T helper (CD₃⁺, CD₄⁺) et de lymphocytes T cytotoxiques (CD₃⁺, CD₈⁺).

Les **T helper** : les cellules sont marquées avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), conjugué à un anticorps de souris anti-CD₃ de poulet et la phycoérythrine (PE) conjuguée à un anticorps anti-CD₄ de poulet.

Les **CTL** (lymphocytes T cytotoxiques) : les cellules sont marquées avec du FITC conjugué à un anticorps anti-CD₃ de poulet et du PE conjugué à un anticorps anti-CD₈ de poulet.

On analyse les sous-populations cellulaires par cytométrie de flux :

- ✓ Le pourcentage de lymphocytes T CD₃⁺, CD₄⁺ (T helper) dans la rate des groupes PFH est supérieur au groupe contrôle, de façon dose-dépendante [21]
- ✓ Inversement, le pourcentage de lymphocytes T CD₃⁺, CD₈⁺ (CTL) dans la rate des groupes PFH est inférieur à celui du groupe contrôle
- ✓ Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les CTL des groupes PFH 1% et PFH 2%
- ✓ Le pourcentage de cellules CD₄⁺, CD₈⁺ dans la rate des groupes PFH est significativement supérieur à celui du groupe contrôle. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les groupes PFH 1% et PFH 2%.

vii. Mesure de la production d'anticorps dans le sérum après un régime d'inoculation de l'antigène

Ici, on va introduire l'antigène *Pasteurella multocida* de type A, inactivé par la formaline, par injection sous-cutanée chez les poulets (2 injections à J7 et J21, additionnées d'adjuvant complet de Freud). On va analyser par absorbance à 405 nm les échantillons obtenus avant immunisation (J1) et à J28 [21].

Le taux de production d'anticorps du groupe PFH 2% est supérieur à celui du groupe contrôle. Par contre, il n'y a pas de différence significative pour le groupe PFH 1%.

viii. Infection expérimentale par *S. gallinarum* et survie

Tous les poulets (n=20 dans chaque groupe) sont acclimatés à leur régime particulier pendant 2 semaines avant infection bactérienne expérimentale [21].

On collecte pour analyse des échantillons fécaux à J1, J5, J10 et J15 après infection. On prélève aussi la rate, le foie et le coecum des poulets survivants à la fin de l'expérience.

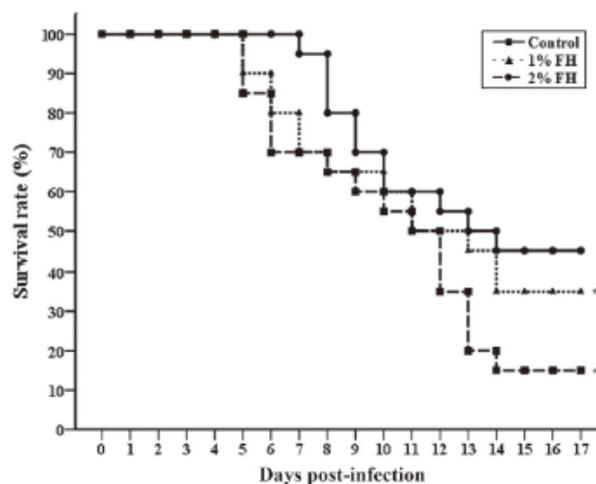


Fig 49 : Effet prophylactique de PFH contre l'infection par *S. gallinarum*

Dietary supplementation with a probiotic fermented four-herb combination enhances immune activity in broiler chicks and increases survivability against *Salmonella gallinarum* in experimentally infected broiler chicks [21]

On observe la mortalité chez les groupes contrôle et PFH 1% dès J5, alors qu'elle est retardée de 2 jours dans le groupe PFH 2%.

Le taux de survie dans le groupe PFH 2% reste le plus élevé des groupes d'essai tout au long de la période expérimentale.

A J17, le taux de survie du groupe contrôle est de 15% (soit 3 des 20 poulets), 35% (soit 7 poulets) dans le groupe PFH 1% et 45% (soit 9 poulets) dans le groupe PFH 2%.

On note des différences significatives dans le taux final de survie entre le groupe contrôle et les groupes PFH 1 et 2%, mais il n'y a pas de différence significative entre les groupes PFH 1% et PFH 2%.

Le nombre de bactéries viables des échantillons fécaux n'est pas significativement différent entre les groupes durant la période totale. De même, ce taux n'était pas non plus significativement différent dans les tissus des différents groupes à la fin de l'expérience.

L'ensemble de ces résultats montre que [21]:

- ✓ L'ingestion continue de PFH peut stimuler l'activation ou la présentation de l'antigène chez le phagocyte, ce qui améliore la fonction immunitaire du corps.
- ✓ La prolifération de lymphocytes induite par le LPS indique que la mitogénicité (surtout contre les bactéries à Gram -) des lymphocytes est améliorée par l'ingestion de PFH.
- ✓ La baisse significative de la synthèse de PGE₂ dans le sérum et le milieu de culture des cellules mononucléées est en accord avec la hausse du niveau de production d'anticorps et de prolifération des cellules mononucléées. De plus, on sait que c'est un des eicosanoïdes les plus importants : c'est un inhibiteur endogène de la réponse immunitaire qui supprime la différenciation des cellules T helper et les fonctions des lymphocytes B.
- ✓ La répartition des lymphocytes T CD₃⁺, CD₄⁺ et CD₄⁺, CD₈⁺ montre que PFH confère un bénéfice sur la fonction immunitaire et peut améliorer la résistance aux maladies infectieuses.
- ✓ La production d'anticorps augmentée indique que l'immunité humorale est elle aussi améliorée par l'ingestion de PFH.
- ✓ La mortalité observée après infection expérimentale montre que l'ingestion de PFH prolonge la survie, ce qui pourrait être une conséquence du renforcement de l'immunité générale.

L'ensemble de ces résultats suggère que certains composants du probiotique améliorent l'activité immunitaire et augmentent la survie contre *Salmonella galinarum* chez les poulets infectés, probablement grâce à une stimulation puissante des réponses immunitaires non spécifiques.

f) Activités inhibitrices de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* sur le virus de la Dengue et les cellules infectées par le virus

En 2011, Leardkamolkarn *et al* [37] se sont intéressés à l'activité antivirale de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* contre le virus de la Dengue de sérotype 2 (DEN-2), de souche 16681.

En effet, l'infection virale par la Dengue est un problème de santé mondiale, puisqu'il n'existe aucun vaccin ou traitement antiviral spécifique. Il s'agit d'un virus à ARN simple brin, positif, responsable de fièvre, fièvre hémorragique ou encore d'un syndrome de choc. La transmission à l'Homme a lieu par l'intermédiaire d'un vecteur : *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, des moustiques présents dans tout le monde.

Il existe 4 sérotypes de virus de la Dengue : DEN-1 à DEN-4. L'infection par un des sérotypes conduit à la production d'anticorps spécifiques de ce sérotype, mais pas des autres.

Dans cette étude, on étudie l'activité antivirale de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* contre DEN-2 sur des cellules humaines d'une lignée cellulaire d'hépatocarcinome (HepG2) et des cellules de rein de singe (LLC-MK2).

i. Essai de cytotoxicité

On incube les cellules pendant 24 (HepG2) ou 48 (LLC-MK2) heures avec *Houttuynia cordata*. On effectue ensuite une réaction colorée au MTT, puis on détermine l'absorbance à 570 nm.

ii. Essai antiviral

On va tester trois choses différentes : la protection, le traitement et le blocage direct chez les cellules HepG2 et LLC-MK2.

Après avoir préparé les cellules [37], l'ARN total est extrait des cellules HepG2 infectées par DEN-2, puis on procède à une RT-PCR en temps réel [37].

On détermine la quantité d'ARN intracellulaire viral grâce à une courbe de référence établie avec des quantités connues (de 9.10^2 à 9.10^6 copies) de transcrits d'ARN.

En parallèle, on étudie la production de protéine E en réalisant une cytométrie de flux. Les cellules HepG2 sont marquées avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine E d'enveloppe de DEN-2 et une immunoglobuline de chèvre anti-souris, conjuguée à un marqueur coloré, le FITC.

Concernant le blocage direct, on effectue un essai sur plaque directement après incubation du virus et de l'extrait.

iii. Essai d'aberration chromosomique

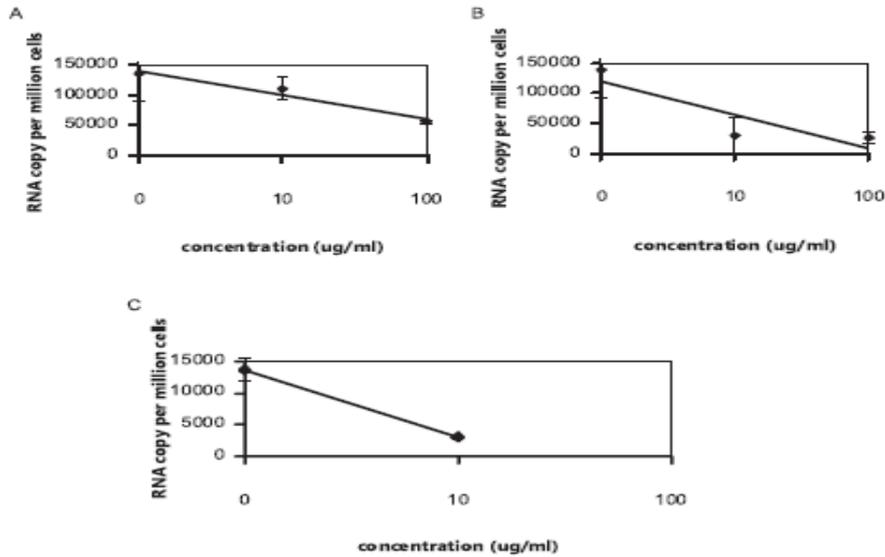
On traite les lymphocytes sanguins périphériques humains avec différentes concentrations d'*Houttuynia cordata* allant de 1 à 10 mg/ml, du DMSO (contrôle négatif) ou de la mitomycine C (contrôle positif) pendant 70 heures. On ajoute de la colchicine pour stopper la division cellulaire et ainsi analyser les aberrations chromosomiques en métaphase [37].

iv. Résultats

L'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* a présenté une activité inhibitrice de la production d'ARN de DEN-2 chez les cellules HepG2 à tous les stades étudiés : prévention, traitement et blocage direct.

Cependant, on constate une plus grande activité inhibitrice dans le stade préventif (fig 50).

On constate qu'une concentration d'*Houttuynia cordata* de 100 µg/ml est efficace pour protéger les cellules de l'infection par le virus DEN (fig 50, A) ; diminue la synthèse intracellulaire d'ARN viral (fig 50, B) ; et inactive le virus (fig 50, C).



A : stade préventif, B : stade traitement, C : blocage direct

Fig 50 : Effet antiviral d'*Houttuynia cordata* contre le virus de la Dengue, chez les cellules HepG2

The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on dengue virus and dengue-infected cells [37]

On observe une bonne corrélation entre le nombre de copies de l'ARN viral et la diminution de l'expression de la protéine DEN2-E chez les cellules HepG2 (fig 51).

TABLE 1. EFFECT OF *H. CORDATA* EXTRACT ON THE EXPRESSION OF DEN-2 PROTEIN E IN HEPG2 CELLS

Experiment	% Positive cells*
HepG2 cells + DEN-2 virus	3.95 ± 0.25
HepG2 cells + <i>H. cordata</i> extract + DEN-2 virus (protective mode)	0.70 ± 0.05
HepG2 cells + DEN-2 virus + <i>H. cordata</i> extract (treatment mode)	1.25 ± 0.27

* Data are mean ± SE of three independent measurement (P < 0.05).

Fig 51 : Effet d'*Houttuynia cordata* sur l'expression de la protéine E des cellules HepG2

The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on dengue virus and dengue-infected cells [37]

Concernant les cellules LLC-MK2, l'inhibition du virus est dépendante de la concentration en extrait d'*Houttuynia cordata* :

- ✓ Il y a une baisse significative du relargage de virus DEN2 lorsque les cellules sont pré- ou post-incubées avec l'extrait d'*Houttuynia cordata* pendant 1 heure.
- ✓ Effet le plus puissant d'*Houttuynia cordata* sur les cellules LLC-MK2 obtenu lors du stade de blocage direct : CE₅₀ (concentration effective qui cause 50% de baisse de formation de virus) égale à 0,8 µg/ml

On remarque qu'il n'y a pas ou peu d'effet toxique sur les 2 types de cellules (concentration cytotoxique : CC₅₀ de 1,24 et 1,99 mg/ml chez les cellules LLC-MK2 et HepG2 respectivement), ainsi qu'aucune aberration chromosomique [37]. On peut dire que les composés de l'extrait sont considérés comme sûrs, sains pour les consommateurs [37].

v. *Identification des substances bioactives d'Houttuynia cordata*

Afin d'identifier les composants actifs, on quantifie par HPLC 4 composés flavonoïdes : quercétine, acide chlorogénique, quercitrine et hyperoside [37].

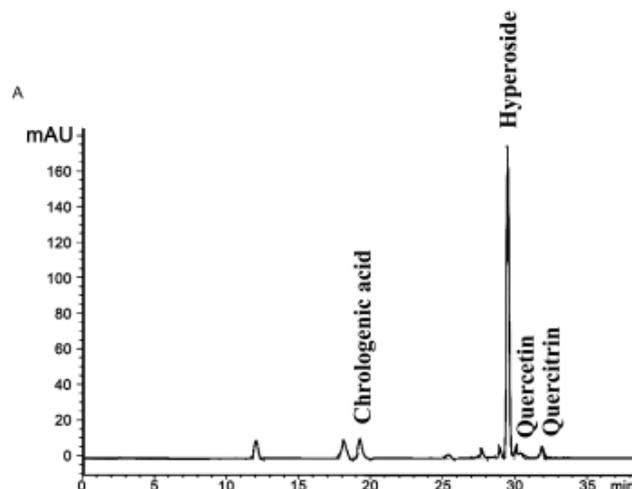


Fig 52 : Analyse HPLC des composés flavonoïdes d'*Houttuynia cordata*
The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on dengue virus and dengue-infected cells [37]

On trouve un taux élevé d'hyperoside (fig 28), supérieur aux autres flavonoïdes. On pense qu'il s'agit du composant actif sur le virus de la Dengue.

La structure chimique de l'hyperoside, ou quercétine-3-O-galactoside, comprend un dérivé phénolique de quercétine et un glucoside en C3.

Cette étude a permis de mettre à jour une activité inhibitrice de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* sur le virus de la Dengue, en plus de ses activités déjà connues contre le virus Herpès Simplex 1 (HSV-1), le VIH-1 et le virus de l'Influenza [38].

Les chercheurs ont posé l'hypothèse selon laquelle le mode d'action inhibitrice de la plante serait dû à une interaction directe et une désactivation des particules virales du virus de la Dengue. Ce mode d'action est similaire au mode d'action bactéricide d'*Houttuynia cordata* étudié contre les agents *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [39].

Cette activité antivirale pourrait être attribuée aux groupements hydroxyles qui pourraient former des polymères et au groupement glycosidique qui pourrait complexer de nombreuses molécules de la surface virale. En effet, la structure se rapproche de celle du fucoidan, un polysaccharide sulfaté extrait d'une algue marine, *Cladosiphon okamurannus*, et qui interagit directement avec les glycoprotéines de surface du virus de la Dengue [40], ce qui produit une puissante inhibition du virus (modifications conformationnelles ou affaiblissement de sa fixation et donc diminution de sa virulence).

g) Un dérivé de phytoanticipine, l'houttuyfonate de sodium, induit des effets synergiques *in vitro* contre la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* lorsqu'il est associé à la lévofloxacine

Dans cette nouvelle étude de 2011, Jing Chao *et al* [39] ont testé l'action synergique d'une phytoanticipine, l'Houttuyfonate de sodium (SH) ; et d'un antibiotique, la lévofloxacine (LFX), sur l'agent pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*.

Les phytoanticipines [41] sont des agents antimicrobiens qui dérivent des plantes médicinales. Ils diffèrent des antibiotiques microbiens traditionnels. Ils agissent contre les invasions de pathogènes et d'insectes [42] et présentent ainsi un fort potentiel d'éradication du biofilm et anti pathogénique. Ce sont des composés intéressants en tant que complément aux antibiotiques [43].

En comparaison aux antibiotiques traditionnels, les phytoanticipines présentent une faible toxicité, un plus large spectre d'action et moins de résistances bactériennes à long terme.

La théorie du biofilm a été proposée par Costerton [44] en 1978. Les bactéries peuvent se présenter selon deux modes de vie différents : en culture planctonique, c'est-à-dire en libre flottaison dans un milieu liquide [45] ; ou en biofilm. Le biofilm correspond à une communauté de microorganismes (bactéries, champignons...) fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice [46]. Le biofilm représente donc un mécanisme auto défensif, contre les agents antimicrobiens par exemple, et un système structurel et dynamique [47].

i. L'houttuynine

C'est le premier dérivé isolé à partir d'extrait d'*Houttuynia cordata* Thunb. par Kosuge en 1952 [48]. C'est une des phytoanticipines les plus efficaces, possédant des activités antimicrobiennes [19, 21, 49], antivirales [37, 38, 50] et antiinflammatoires [51, 53].

ii. L'houttuylfonate de sodium

L'houttuylfonate de sodium (SH) est un composé d'addition du bisulfite de sodium et de l'houttuynine, synthétisé pour la première fois en 1971. Il possède lui aussi une activité antibactérienne à large spectre, inhibe l'hypertrophie du myocarde et prévient la fibrose cardiaque [49, 52, 53].

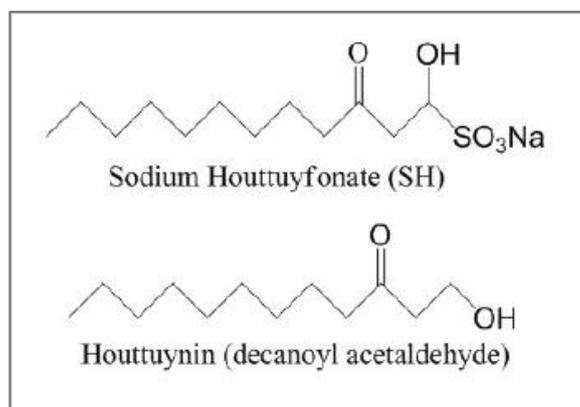


Fig 53 : Houttuylfonate de sodium et Houttuynine

A phytoanticipin derivative, sodium houttuylfonate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [39]

Différentes études, dont celle de Ye *et al* [54], ont rapporté que l'houttuylfonate de sodium et ses dérivés sont plus efficaces sur la suppression des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*...) que Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*...), car ils se lient directement aux protéines de membranes des bactéries à Gram positif par liaison homophile et exercent ainsi une plus forte activité antibactérienne sur ce type de bactéries.

Cependant ces rapports se limitent à l'étude de bactéries planctoniques et ne se penchent pas sur les biofilms et bactéries encapsulées, qui représentent pourtant la majorité des bactéries.

Dans l'étude présente, on a d'abord étudié l'houttuylfonate de sodium seul comme agent antimicrobien sur la suppression du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et de son alginate, un des principaux composants du biofilm. Puis on a utilisé l'houttuylfonate de sodium comme agent synergique de la lévofloxacine.

iii. Résultats

On a déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la lévofloxacine (CMI= 512 µg/ml) et de l'houttuynonate de sodium (CMI = 2 µg/ml). Puis on a calculé l'indice de concentration inhibitrice fractionnée (FICI) selon la formule :

$$FICI = \frac{\text{MIC of SH in combination}}{\text{MIC of SH alone}} + \frac{\text{MIC of LFX in combination}}{\text{MIC of LFX alone}}$$

Avec CMI LFX combiné = 0,25 µg/ml et CMI SH combiné = 128 µg/ml

On trouve donc FICI = 0,375, ce qui démontre une synergie d'action relativement forte (FICI<0,5)

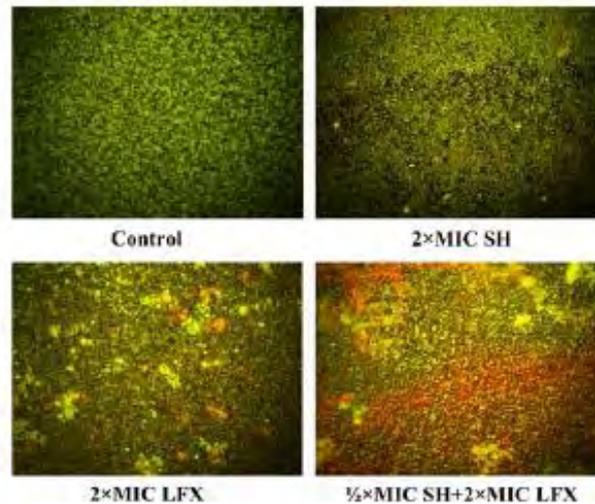
L'effet de SH seul sur la croissance du biofilm est limité, même pour une forte concentration (2 CMI) [39].

Cependant, la combinaison de SH et LFX montre une inhibition forte et persistante du biofilm : plus de 50% de la croissance est inhibée, pendant 7 jours.

Concernant la suppression de l'alginate, un polymère acétylé composé de monomères non répétitifs d'acides aminés [39], on remarque qu'elle est similaire lors d'un traitement par SH seul ou par LFX seule. En revanche, elle est augmentée lorsqu'on utilise LFX et SH ensemble, ce qui indique une synergie d'action.

On sait que l'alginate est sécrété par les bactéries pour former une matrice extracellulaire qui va envelopper les bactéries et les aider à se protéger des effets toxiques des agents antimicrobiens.

L'observation des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* (fig 54) et de la morphologie du biofilm (fig 55) confirment une tendance à l'effet antibactérien.



Bactéries vivantes colorées en vert et bactéries mortes en rouge

Fig 54 : Observation au microscope à fluorescence des colonies de *Pseudomonas aeruginosa*. A phytoanticipin derivative, sodium houttuynonate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [39]

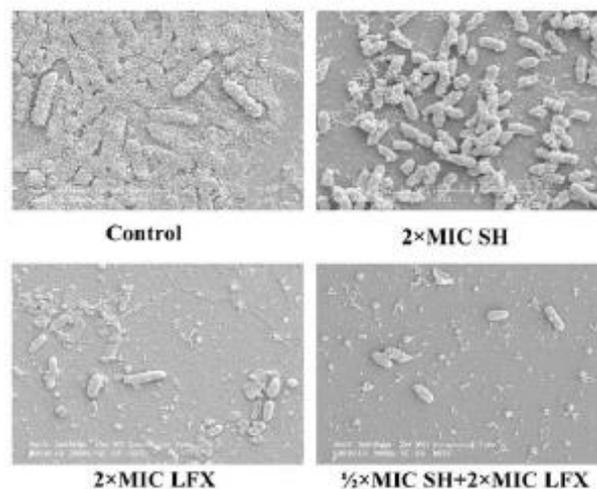


Fig 55 : Observation de la morphologie du biofilm de *P. aeruginosa*. A phytoanticipin derivative, sodium houttuynonate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [39]

On peut donc conclure de ce travail que l'houttuynonate de sodium montre une certaine activité antimicrobienne *in vitro*, qui est boostée par l'ajout de la lévofloxacine (effet synergique).

h) L'analyse transcriptionnelle et fonctionnelle montre que l'inhibition de l'autolyse de *Staphylococcus aureus* est médiée par l'houttuyfonate de sodium

Ici, Guoxing *et al* ont étudié l'effet de l'houttuyfonate de sodium sur l'autolyse d'une bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus* [49].

En effet, on sait que l'houttuyfonate de sodium possède une activité antimicrobienne *in vitro* contre 21 souches de *S. aureus* en culture planctonique.

i. Staphylococcus aureus

Il s'agit d'un pathogène important, rencontré à l'hôpital comme dans la communauté, responsable de nombreuses infections : sepsis, pneumonie, infections sur cathéters, infections des plaies... De plus, plus de 60% des *S.aureus* nosocomiaux isolés sont maintenant résistants à la méticilline et certaines souches ont montré des résistances à plus de 20 agents antimicrobiens différents [55].

Le *Staphylococcus aureus* possède la caractéristique importante de pouvoir former un biofilm et donc endommager des tissus et biomatériaux implantés.

ii. Résultats

On a pu établir les CMI de l'houttuyfonate de sodium contre 21 souches de *S. aureus* (dont 17 multirésistantes). Elles sont comprises entre 4 et 128 µg/ml.

On a observé pour 16 des 17 souches multirésistantes une CMI de l'houttuyfonate inférieure à celle de l'oxacilline et de la ciprofloxacine, deux agents antimicrobiens bien connus. Ces résultats montrent l'efficacité antibactérienne de l'houttuyfonate de sodium.

Par contre, l'houttuyfonate de sodium n'est que faiblement actif contre la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus*.

2) Activités immunologiques et anti-inflammatoires

L'inflammation fait partie du système immunitaire. Un déséquilibre de ce système peut provoquer une pathologie.

L'inflammation est classiquement caractérisée par plusieurs symptômes : douleur, œdème, rougeur, chaleur et gonflement. Elle est responsable de nombreuses pathologies, pouvant évoluer de façon chronique.

Les activités immunologiques et anti-inflammatoires de *Houttuynia cordata* Thunb. constituent une part importante des propriétés attribuées à la plante et elles ont donc été abondamment étudiées [56, 68, 69, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 83].

a) Liaison aux protéines et distribution tissulaire

Dans la publication « Covalent protein binding and tissue distribution of houttuynin in rats after intravenous administration of sodium houttuynfonate » [58], Deng et *al* ont étudié la fixation aux protéines puis la distribution tissulaire de l'houttuynine après administration d'houttuynfonate de sodium.

L'houttuynine (ou acétaldéhyde décanoyl) est un des principes actifs majoritaires contenus dans les « préparations d'*Houttuynia* » utilisées dans cette expérience en administration orale ou intraveineuse.

On a rapporté dans des travaux antérieurs que certains composés aldéhydes comme : le formaldéhyde [59, 60], l'acétaldéhyde [61], l'acroléine [62, 63], le 2-nonanal [64, 65] et les intermédiaires aldéhydes formés par métabolisme [66, 67] pourraient réagir avec les protéines nucléophiles pour former des adduits capables d'interférer spécifiquement avec les signaux de co-stimulation des cellules T et d'induire des effets immuno-toxiques.

Les résultats montrent que l'houttuynine est capable de se fixer, fortement et rapidement, par liaison covalente à des protéines cellulaires [58]. Il est par conséquent fortement distribué dans les tissus après administration d'houttuynfonate de sodium. Les organes cibles sont tout d'abord les poumons, puis les reins, le cœur, le sang, la rate, le plasma (et peut donc se conjuguer à l'hémoglobine des érythrocytes) et enfin le foie. Ceci explique les propriétés et les utilisations pulmonaires d'*Houttuynia cordata*, mais on peut aussi en déduire que l'élimination par voie hépatique n'est pas majoritaire.

La formation d'adduits avec les protéines peut expliquer les effets d'*Houttuynia cordata*, mais peut aussi provoquer des réactions néfastes et non prévisibles, de type idiosyncrasique (incluant les mécanismes allergiques d'hypersensibilité ou d'anaphylaxie ; ou des réactions perturbant le métabolisme).

b) Effet anti-inflammatoire de l'injection d'*Houttuynia cordata*

Dès 2006, Lu, Liang, Xi et Wu [56] étudient les propriétés anti-inflammatoires de l'injection d'*Houttuynia cordata*, grâce à deux modèles d'inflammation provoquée par l'injection de carraghénane et par l'application de xylène sur l'oreille des souris.

Les résultats ont tout d'abord permis d'identifier 22 composants dans l'huile essentielle d'*Houttuynia cordata* :

Table 1
Composition of essential oil from HCl

Component identified	Retention time (min)	Content (%)
β -Myrcene	13.769	3.47
α -Pinene	14.726	0.63
2-Methyl-6-methylene-oct-3,7-dien-2-ol	15.835	0.50
1-Nonanol	17.224	6.21
α -Terpineol	17.810	13.24
<i>cis</i> -2-Methylene-3-(1-methylethenyl)-Cyclohexanol, acetate	18.776	1.10
1-Decanol	18.981	2.90
Methyl nonyl ketone	19.353	35.20
Bornyl acetate	19.380	5.52
α -Terpineol acetate	20.286	1.02
<i>n</i> -Decanoic acid	20.574	10.58
Acetic acid, geraniol ester	20.591	2.15
1-Decen-3-one	20.658	1.54
2-Dodecanone	20.842	0.71
Lauraldehyde	21.065	0.29
Caryophyllene	21.765	3.41
4-Tridecanone	22.294	2.46
<i>n</i> -Dodecanoic acid	23.137	0.53
<i>trans</i> -Nerolidol	23.326	0.78
Docosanoic acid ethyl ester	23.641	5.34
Caryophyllene oxide	23.932	1.88
Heptanoic acid, 3-methylbutyl ester	25.652	0.54

Fig 56 : Composition de l'huile essentielle d'*Houttuynia cordata*
Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection [56]

Les principaux composants : β -myrcène, 1-nonanol, α -terpinéol, méthylnonylcétone, acétate de bornyle, acide *n*-décanoïque, caryophyllène et ester éthylique de l'acide docosanoïque représentent plus de 80% des composants. On remarque que le méthylnonylcétone, déjà cité par Hayashi et al [38], est le principal composé actif.

i. Modèle carraghénane

Il s'agit d'un modèle d'inflammation. On crée une poche d'air stérile dans le dos des souris où l'on va ensuite injecter du carraghénane et ainsi créer une réaction inflammatoire.

On observe une augmentation significative du volume d'exsudat et de la concentration en albumine.

Houttuynia cordata induit une diminution significative du volume de l'exsudat, même si cet effet est inférieur à celui de la dexaméthasone, l'anti-inflammatoire de référence.

La concentration en protéines de l'exsudat est elle aussi diminuée après injection d'*Houttuynia cordata*. On en déduit qu'*Houttuynia cordata* provoque une baisse de la perméabilité capillaire.

ii. Œdème de l'oreille induit par application de xylène :

Le xylène va provoquer une réaction cutanée locale, qu'on pourra mesurer en pesant des bouchons d'oreilles appliqués aux souris.

On remarque que l'application hypodermique d'*Houttuynia cordata* diminue la formation de l'œdème [68].

Ces résultats permettent déjà de deviner une activité anti-inflammatoire de la part d'*Houttuynia cordata*.

c) Effets anti-inflammatoires de l'extrait supercritique d'*Houttuynia cordata*

Cette étude publiée en 2009, par Sunhee Shin et al [68], revient sur l'activité anti-inflammatoire de la plante. Ici aussi, les chercheurs utilisent un modèle carraghénane.

Les résultats sont similaires à ceux de la publication précédente : l'administration orale d'extrait d'*Houttuynia cordata* supprime l'augmentation du volume d'exsudat induite par le carraghénane. Des résultats voisins sont obtenus en administrant de la dexaméthasone ou de l'indométacine, deux puissants anti-inflammatoires.

Les cellules inflammatoires infiltrantes sont diminuées de moitié par l'extrait.

Le carraghénane augmente fortement le taux des principales cytokines inflammatoires dans les exsudats : TNF_{α} et IL_6 . L'administration d'*Houttuynia cordata* diminue significativement le taux de TNF_{α} , mais pas celui d' IL_6 .

Lorsqu'on stimule ce modèle avec du LPS, on note une augmentation de sécrétion de monoxyde d'azote et de prostaglandine PGE_2 par les macrophages, qui ont été sensiblement supprimés par l'extrait d'*Houttuynia cordata*. Cette activité inhibitrice sur la libération de PGE_2 suggère que l'extrait inhibe directement la Cyclo Oxygénase 2 ou désactive les cellules inflammatoires qui expriment cette enzyme.

Treatment	NO		PGE ₂	
	Conc. (μM)	Inhibition (%)	Conc. (μg/mL)	Inhibition (%)
Vehicle	1.20 ± 0.13	-	0.16 ± 0.03	-
LPS alone (2.5 μg/mL)	42.10 ± 7.21*	-	3.98 ± 0.48*	-
+HSE (0.001%)	14.80 ± 2.13 [†]	66.7	3.74 ± 0.50	6.3
+HSE (0.01%)	14.5 ± 1.78 [†]	67.5	3.01 ± 0.42 [†]	25.4
+HSE (0.1%)	5.30 ± 0.90 [†]	90.0	2.42 ± 0.45 [†]	40.8
+HSE (1%)	2.00 ± 0.31 [†]	98.0	0.91 ± 0.14 [†]	80.4

*Significantly different from vehicle control ($p < 0.05$). [†]Significantly different from LPS alone ($p < 0.05$). Conc.: concentration.

Fig 57 : Effets de l'extrait supercritique d'*Houttuynia cordata* sur la production de NO et PGE₂ par les cellules RAW 264.7 stimulées par LPS

Anti-inflammatory effects of a *Houttuynia cordata* supercritical extract [68]

Houttuynia cordata diminue aussi le nombre de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes.

d) Activité anti-inflammatoire de certaines plantes médicinales traditionnelles chinoises

Min-Hsiung Pan et *al* [69] ont recensé, en 2011, les effets anti-inflammatoires de plusieurs plantes médicinales chinoises.

En résumant les recherches récentes sur le sujet, ils ont pu établir qu'*Houttuynia cordata* diminue la production et la sécrétion de prostaglandine E₂ (PGE₂), ainsi que l'expression du gène et de la protéine COX-2, résultant en une baisse d'activité COX-2 [68, 70] impliquée dans les processus inflammatoires.

e) *Houttuynia cordata*, un nouvel inhibiteur sélectif, de la COX-2 doté d'une activité anti-inflammatoire

Weifeng Li et *al* ont montré dans cette publication [70], comme dans celle de Sunhee Shin et *al* [68], qu'*Houttuynia cordata* inhibe le relargage de PGE₂ et peut donc être considéré comme un nouvel inhibiteur de la Cyclo Oxygénase 2.

En effet, lorsqu'on traite les macrophages péritonéaux, stimulés par du LPS, par l'huile essentielle d'*Houttuynia cordata*, on observe une diminution de la libération de PGE₂. Ceci indique que l'huile inhibe l'activité enzymatique de la COX-2, enzyme responsable de la synthèse de prostaglandines inflammatoires.

Par contre, *Houttuynia cordata* n'a pas affecté l'expression de la COX-1.

Il a été démontré que l'inhibition de la COX-2 génère des effets thérapeutiques bénéfiques dans la gestion de la douleur, l'inflammation, le cancer et les neuropathologies comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson par exemple (Loren et *al*, 2002 [71], Jachak et *al*, 2006 [72], Blobaum et Marnett, 2007 [73] Shan et *al*, 2004 [74]).

f) Effets anti-inflammatoires de l'extrait supercritique d'*Houttuynia cordata* dans le modèle d'inflammation de la poche d'air au carraghénane

Cette étude de Dajeon Kim et *al*, 2012 [75] reprend le même sujet que les travaux précédents [68, 70] et montre ici aussi que l'extrait supercritique d'*Houttuynia cordata* a des effets anti-inflammatoires en inhibant les voies COX₂-PGE₂ et TNF_α-NO.

g) Effets suppresseurs d'*Houttuynia cordata* sur la réponse immune Th2

Ji-Sook Li et *al* [76] ont ici étudié les effets d'*Houttuynia cordata* sur l'expression des cytokines inflammatoires de type Th2 et des chimiokines.

Pour cela, ils ont stimulé des cellules T Jurkat et des mastocytes humains HMC-1 afin d'augmenter le niveau d'ARNm des chimiokines.

Les cellules T et les mastocytes sont des cellules essentielles à la production d'interleukine 4 et 5. Lorsqu'elles sont stimulées, on observe une augmentation de la production de ces cytokines. Cette augmentation est supprimée lorsque les cellules sont préalablement traitées avec les extraits d'*Houttuynia cordata*.

Par contre, les cytokines de types Th1 (notamment l'interféron γ , IFN γ) n'ont pas été affectées.

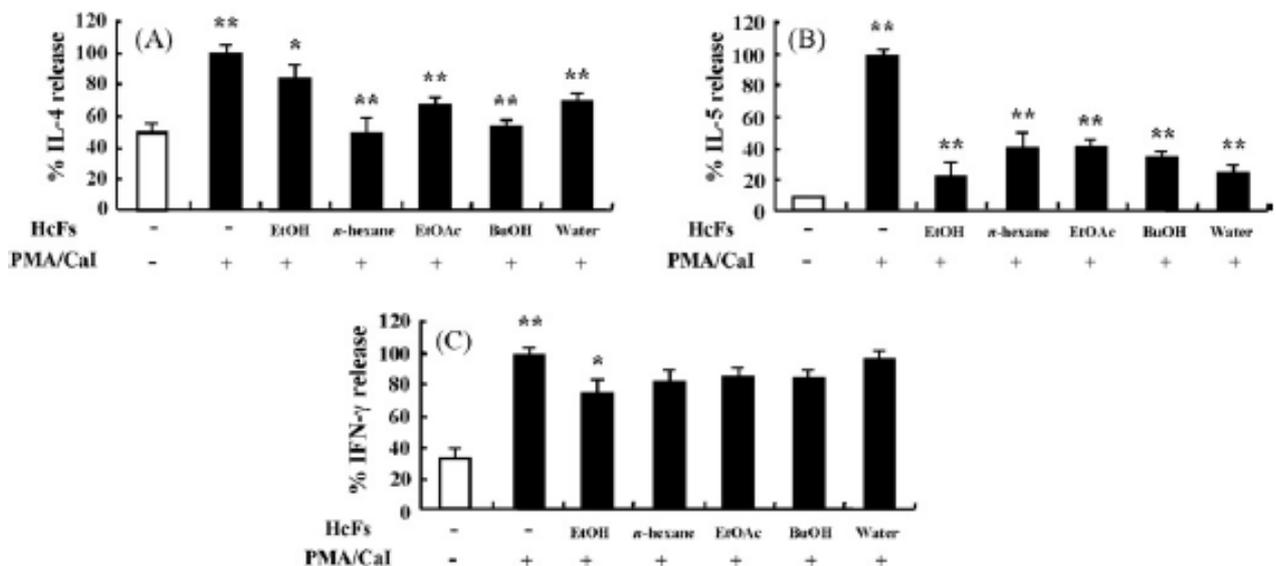


Fig 58 : Effets des fractions d'*Houttuynia cordata* sur le relargage de cytokines

Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response [76]

IL₄ favorise la production d'immunoglobulines de type E (IgE) et IL₅ accélère la production de polynucléaires éosinophiles. Il est aussi important de noter que les cellules Th2 ne produisent pas de cytokines de type Th1 et inversement.

On déduit donc des résultats de cette expérience qu'*Houttuynia cordata* présente un potentiel thérapeutique dans le traitement de l'allergie inflammatoire.

h) L'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* supprime la réaction anaphylactique et la réponse allergique médiée par les IgE en inhibant plusieurs étapes de la voie de signalisation FcεRI chez les mastocytes

Han et *al* ont investigué dans ce travail les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de la réaction anaphylactique par *Houttuynia cordata* [77].

i. Allergie de type 1

Il s'agit d'un désordre immunitaire qui met en jeu la production d'IgE en réponse à des allergènes et antigènes.

La stimulation par l'antigène induit la libération de médiateurs inflammatoires par les mastocytes. Il en découle des symptômes immédiats dans les maladies médiées par les IgE (asthme, dermatite atopique, eczéma atopique...).

L'anaphylaxie cutanée passive est un modèle animal de réaction allergique immédiate [77, 78] médiée par les immunoglobulines E. Elle est aussi induite par des médiateurs tels que l'histamine sécrétée par les mastocytes. Les mastocytes ont donc un rôle très important dans l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire lors des réactions allergiques, notamment par la sécrétion abondante de cytokines (IL₄, IL₅, IL₆ et TNFα) :

- ✓ L'interleukine 4 est essentielle pour la production d'IgE et favorise le passage des cellules T naïves vers des cellules allergiques de type Th₂. L'IL₄ est aussi un facteur de croissance *in vitro* des mastocytes et elle régule négativement la forte affinité des récepteurs à l'IgE (FcεRI) dans les cellules de la moelle osseuse des souris.
- ✓ NF-κB a un rôle important dans la régulation des molécules pro-inflammatoires (TNFα, IL₆, IL₈). Il joue un rôle de facteur de transcription, qui régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire et qui nécessitent la production de cytokines inflammatoires.
- ✓ Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) sont elles aussi impliquées dans le processus inflammatoire [70, 71, 72, 75].

ii. Résultats

Comme dans l'étude de Guang Zhao Li et *al* [78], ce travail montre que l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* supprime l'anaphylaxie cutanée passive (suppression du gonflement de l'oreille provoquée par un antigène).

De la même façon, il inhibe la dégranulation induite par un antigène et le relargage d'histamine par les mastocytes sensibilisés par IgE. On observe moins de β -hexaminidase, marqueur de dégranulation, dans le milieu, ainsi que d'histamine.

La production et l'expression d'IL₄ et de TNF α induite par antigène ont elles aussi été diminuées. L'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* a aussi inhibé l'activation de NF- κ B et la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Enfin, l'extrait a inhibé les événements de signalisation médiés par Fc ϵ RI induits par l'antigène chez les mastocytes sensibilisés.

L'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* agit donc à différents niveaux sur les mastocytes : la dégranulation, la sécrétion de cytokines et l'activation de la signalisation médiée par Fc ϵ RI [77, 78].

i) Effets inhibiteurs de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* sur la réaction anaphylactique et l'activation des mastocytes

En 2005, Guang Zhao Li et *al* [78] ont étudié les effets de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* Thunb. sur les réactions anaphylactiques médiées par les mastocytes. Les résultats sont similaires à ceux de l'étude précédente.

i. Réactions anaphylactiques médiées par les mastocytes

Ces réactions sont impliquées dans de nombreuses pathologies allergiques : asthme et rhinite allergique par exemple.

Les mastocytes sont des cellules importantes retrouvées dans le tissu conjonctif, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate, qui participent dans divers processus biologiques : allergie, réaction inflammatoire, cytotoxicité, angiogénèse, immunorégulation... Ce sont donc des cellules effectrices primaires impliquées dans le processus d'hypersensibilité [75]. Ce sont aussi des cellules sécrétrices, qui stockent dans leurs nombreux granules cytoplasmiques des médiateurs biologiquement puissants, comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine par exemple et des marqueurs de dégranulation des mastocytes (β -hexaminidase).

Les mastocytes expriment à leur surface des récepteurs membranaires à haute affinité et spécificité pour les immunoglobulines E (IgE). On sait que l'interaction d'antigènes multivalents avec les IgE liés à la surface des mastocytes initie toute une série d'événements biochimiques qui aboutissent à la libération d'histamine et à la production de cytokines [68].

Le but de cette étude a donc été d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* sur l'anaphylaxie systémique induite par le composé 48/80 (polymère mixte de phénéthylamine réticulé par le formaldéhyde possédant un effet hypotenseur résultant de la libération d'histamine) [78].

ii. Résultats

Le modèle *in vivo* d'anaphylaxie systémique (par injection du composé 48/80) induit un choc fatal pour 80 à 100% des souris de l'expérience. L'administration préalable d'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* par voie orale diminue la mortalité de façon dose-dépendante [78].

On a aussi testé l'anaphylaxie cutanée passive en injectant localement une IgE anti-DNP, suivi d'une stimulation antigénique par voie intraveineuse. Ici aussi, l'administration orale d'*Houttuynia cordata* a inhibé l'anaphylaxie cutanée passive médiée par l'IgE anti-DNP.

L'injection du composé 48/80 ou de l'IgE anti-DNP induit l'activation des mastocytes (dégranulation, gonflement cellulaire, vacuoles cytoplasmiques et granules extrudés près de la surface cellulaire et dans le milieu environnant). L'incubation des cellules avec l'extrait d'*Houttuynia cordata* mène au gonflement des mastocytes mais sans dégranulation.

On a aussi étudié la libération d'histamine par les mastocytes stimulés par le composé 48/80 ou l'IgE anti-DNP. Les résultats montrent qu'*Houttuynia cordata* pourrait inhiber de façon dose-dépendante la réaction anaphylactique en bloquant la libération d'histamine par les mastocytes. Ceci pourrait être dû au blocage de l'absorption du calcium dans les mastocytes et/ou à la hausse du taux d'AMP cyclique dans les mastocytes.

j) Effet protecteur de l'extrait d'*Houttuynia cordata* sur la fibrose pulmonaire induite par bléomycine chez les rats

Les chercheurs Lean-Teik Ng et *al* ont ici étudié les propriétés anti-oxydantes et l'effet protecteur d'*Houttuynia cordata* sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez les rats [79].

i. Fibrose pulmonaire

Elle est caractérisée par l'accumulation de collagène de la matrice extracellulaire, la prolifération des fibroblastes et la migration et la perte des unités alvéolaires d'échange de gaz.

C'est une maladie dévastatrice car elle peut conduire à une destruction pulmonaire progressive voire la mort.

ii. Bléomycine

Il s'agit d'un antibiotique de la famille des glycopeptides, issu de *Streptomyces verticillus*, puissant agent antinéoplasique et aussi connu pour provoquer une fibrose pulmonaire chez l'Homme comme chez les modèles expérimentaux animaux.

La fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est un modèle connu pour étudier la fibrose humaine bien que les mécanismes exacts restent flous. Il est néanmoins généralement admis que ce sont les espèces réactives de l'oxygène produites par la bléomycine qui portent directement atteinte aux cellules épithéliales pulmonaires [80, 81, 82].

C'est donc dans un contexte de recherche d'un traitement potentiel pour les patients atteints de SRAS et pour la prévention de la fibrose pulmonaire que cette étude a été menée.

iii. Résultats

Le poids corporel des rats traités par bléomycine est significativement inférieur.

On a remarqué qu'un traitement par *Houttuynia cordata* ou par vitamine E (un puissant antioxydant) fournit un effet protecteur significatif contre les changements induits par la bléomycine sur le poids corporel, les poumons et les lésions tissulaires causées par les espèces réactives de l'oxygène.

Les résultats suggèrent qu'*Houttuynia cordata* et la vitamine E peuvent inhiber la peroxydation lipidique et les modifications histopathologiques pulmonaires et diminuer le dépôt de collagène dans les poumons.

On remarque par ailleurs que les taux d'interféron γ et de TNF α libérés par les macrophages activés, qui sont augmentés chez les modèles de fibrose pulmonaire, ont été supprimés après traitement par *Houttuynia cordata*.

De même, les radicaux libres générés par la bléomycine ne sont plus présents après traitement antioxydant par la vitamine E mais aussi après traitement par *Houttuynia cordata*.

k) Effets de l'houttuyfonate de sodium sur l'expression de NF-kappaB et MCP-1 dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse

Pei Pan et *al* [83] ont étudié l'effet que peut avoir l'houttuyfonate de sodium sur une maladie inflammatoire du glomérule et de la membrane basale rénale : la glomérulonéphrite extra-membranaire.

La glomérulonéphrite entraîne une perméabilité capillaire, qui à son tour entraîne une protéinurie. Les chercheurs ont donc quantifié les protéines urinaires afin de déterminer l'action anti-inflammatoire de l'houttuyfonate de sodium (SH).

Ainsi les résultats montrent que SH a inversé les augmentations de concentration en protéines urinaires et les changements morphologiques (élargissement des glomérules, sténose capillaire, épaississement des parois des capillaires sous-épithéliaux et projections de membrane basale).

On remarque aussi que l'inflammation est accompagnée d'une hausse du facteur de transcription nucléaire NF- κ B et de la chimiokine MCP-1. L'expression des gènes MCP-1 est principalement régulée par des protéines qui se fixent à la région κ B. Or, ces deux paramètres sont eux aussi inhibés lors de l'administration d'houttuyfonate de sodium.

l) Effet inhibiteur de l'extrait d'*Houttuynia cordata* sur la migration des cellules HMC-1 induite par le facteur de cellules souches

Dans cette étude [84], In Sik Kim et *al* ont aussi montré que l'extrait d'*Houttuynia cordata* inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B, ce qui provoque au final une diminution de la capacité chimiotactique des cellules étudiées en réponse au facteur de croissance CSF.

Cette propriété est intéressante pour le traitement des maladies inflammatoires puisqu'elle pourrait prévenir l'afflux de cellules inflammatoires.

m) Effets de l'houttuyfonate de sodium sur la phosphorylation de CaMK II, CREB et ERK ½ et sur l'expression de c-Fos chez les macrophages

Dayong Wang et *al* [85] ont étudié l'effet de l'houttuyfonate de sodium sur la phosphorylation de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation de l'activation des macrophages.

SH peut modifier différentes fonctions des macrophages, dont la sécrétion de lysozyme, de phosphatase alcaline et d'IL_{1β}, promouvoir la phagocytose et le métabolisme oxydatif, ce qui reflète un métabolisme augmenté chez les macrophages.

Or, de nombreuses protéines interviennent dans ces chaînes d'activation, notamment : CaMK II (complexe Calcium/Calmoduline dépendant de la protéine kinase II), CREB (Cyclic AMP responsive element-binding protein) qui est un facteur de transcription pouvant induire l'expression de gènes, ERK ½ (Extracellular signal Related Kinase) qui est impliqué dans la prolifération des macrophages et la sécrétion de certaines cytokines.

On remarque que les macrophages traités par SH ont un taux de phosphorylation de CaMK II et CREB augmenté, mais celui de ERK ½ n'est pas affecté. L'expression de c-Fos, un facteur de transcription nucléaire est aussi augmentée par SH.

SH agit donc sur les protéines des voies de signalisation des macrophages (CaMK II, CREB) et sur le facteur de transcription nucléaire c-Fos, ce qui explique l'induction du métabolisme oxydatif par SH chez les macrophages.

n) Etudes sur la capacité en tant qu'adjuvant de l'houttuyfonate de sodium et ses mécanismes

Dans ce travail, Dayong Wang et *al* [86] ont étudié la capacité en tant qu'adjuvant de l'houttuyfonate de sodium, qui est communément utilisé comme médicament antimicrobien.

i. Les adjuvants

Les adjuvants servent à augmenter la production d'anticorps en renforçant la réactivité immunologique du corps. Ils sont utilisés en adjonction à certains antigènes solubles (ou des protéines solubles purifiées de petite taille) qui présentent seuls une activité immunostimulatrice trop faible.

L'ajout d'adjuvant permet donc d'activer les macrophages, qui vont produire des signaux de co-stimulation afin d'activer les cellules effectrices Th et aussi inhiber l'apparition d'immunotolérance.

ii. Résultats

Les taux sériques d'IgG et IgM sont augmentés par le traitement par SH [85]. On remarque aussi que SH améliore la phagocytose par les macrophages ; il augmente la capacité de production de lysozyme, de phosphatase acide et d'IL_{1β} par les macrophages.

Il apparaît donc que SH active les macrophages : étape nécessaire pour la présentation de l'antigène et l'inhibition de l'immunotolérance.

En effet, l'IL₁ qui est produit par les macrophages joue un rôle important de co-stimulateur de l'activation des cellules Th qui vont par la suite sécréter l'IL₂ qui joue lui-même un rôle important dans l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules T.

Il faut noter que seules les cellules T activées peuvent sécréter de l'IL₂ ; et ce sont principalement les cellules Th. De plus, l'absence de co-stimulation par IL₁ amène à une immunotolérance ou une anergie immunologique.

Par ailleurs, il faut des signaux de co-stimulation entre la cellule présentatrice de l'antigène (CPA, de type macrophage) et les cellules Th via LFA₁, ICAM₁ et ICAM₂.

SH aide donc, en activant les macrophages, à activer toute une série de cellules effectrices, qui vont ainsi reconnaître l'antigène et réagir. SH présente donc une capacité adjuvante notable. Cependant, il faut en étudier les effets indésirables.

Ce chapitre concernant les propriétés anti-inflammatoires et immunologiques d'*Houttuynia cordata* Thunberg nous indique que la plante présente une certaine activité anti-inflammatoire, à travers différents mécanismes : inhibition de la cyclo-oxygénase 2, inhibition des cytokines pro-inflammatoires de type Th2, inhibition de la peroxydation lipidique, inhibition de facteurs de transcription nucléaires et de protéines des voies de signalisation des cellules immunitaires...

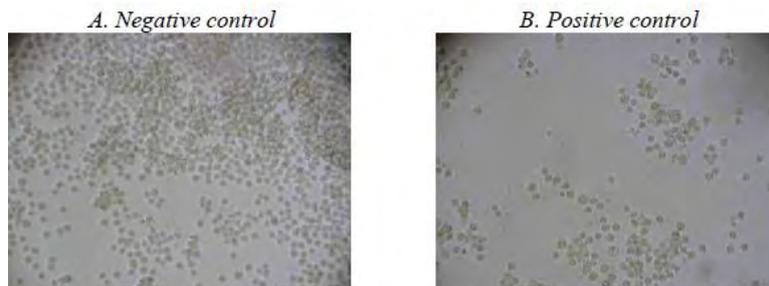
3) **Activité anticancéreuse**

Les études les plus récentes se sont plus particulièrement penchées sur les propriétés anticancéreuses de la plante.

a) Activité antileucémique de l'extrait d'*Houttuynia cordata* Thunb. sur les cellules leucémiques humaines U937 et Jurkat

Ici, les chercheurs Jaturawat Pawinwomngchai et Supantitra Chanprasert ont étudié l'effet de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique d'*Houttuynia cordata* sur deux lignées cellulaires : les cellules Jurkat et les cellules humaines U937 [87]. Ces-dernières sont caractéristiques d'un cancer hématopoïétique : la leucémie.

Les chercheurs ont étudié l'effet cytotoxique des extraits d'*Houttuynia cordata* sur la viabilité cellulaire des deux lignées. Les résultats obtenus pour les deux lignées cellulaires montrent la même tendance.



Contrôle négatif : milieu de culture seul (RPMI 1640)

Contrôle positif : vincristine

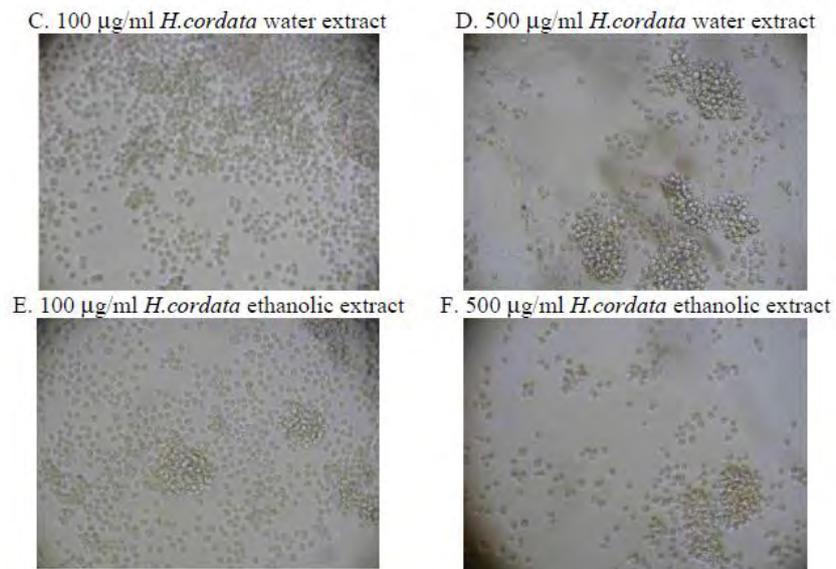


Fig 59 : Effet cytotoxique d'*Houttuynia cordata* à 100 et 500 µg/ml sur les cellules Jurkat
 Antileukemic activity of *Houttuynia cordata* Thunb extracts in Jurkat and U937 human leukemic cells
 [87]

Ces premiers résultats montrent qu'*Houttuynia cordata* est capable d'induire l'apoptose chez les deux types de lignées cellulaires étudiées.

On a aussi pu montrer que l'extrait éthanolique induit une baisse significative du taux de TNF α (Tumor Necrosis Factor) [87].

b) La fraction d'*Houttuynia cordata* Thunb induit l'apoptose des cellules leucémiques humaines Molt-4 via la voie du stress du reticulum endoplasmique

Prommaban et al [88] ont voulu déterminer l'activité anticancéreuse de plusieurs fractions d'*Houttuynia cordata* sur la lignée cellulaire Molt-4.

i. L'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique, normal, de mort cellulaire programmée, décrit pour la première fois en 1972 par Kerr, Willie et Currie. Elle permet le développement normal d'un organisme, l'homéostasie cellulaire, la défense contre des agents pathogènes...

Son dérèglement peut devenir pathologique : cancers (prolifération cellulaire, système immunitaire inefficace...), maladies auto-immunes (défaillance du système immunitaire), infections virales (persistance des cellules infectées, exemple : virus de l'Herpès, adénovirus)...

Elle est caractérisée par une atrophie du corps cellulaire, la condensation de la chromatine et du cytoplasme, le bourgeonnement des membranes, puis la fragmentation en corps apoptotiques avec dégradation de l'ADN aboutissant à une phagocytose du corps apoptotique [89, 90].

Il existe deux voies apoptotiques chez les mammifères :

- ✓ **Voie extrinsèque** (ou des récepteurs de mort) : la liaison d'un ligand au récepteur de mort correspond à un signal de mort, qui va activer une cascade. Exemples : Fas et son ligand Fas-L, TNF et son récepteur TNF-R.
- ✓ **Voie intrinsèque** (ou mitochondrie-dépendante) : elle met en jeu la libération de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie. De nombreuses protéines de la famille de Bcl-2 sont mises en jeu (Bcl-2-like, Bax-like, BH3), des caspases...

ii. Résultats

Les différentes fractions d'*Houttuynia cordata* testées se sont montrées cytotoxiques. On a pu établir que l'expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-xl) était diminuée alors que les protéines Bax étaient plus exprimées. Ceci indique que c'est la voie mitochondriale (ou intrinsèque) qui est impliquée dans l'apoptose des cellules Molt-4.

c) L'extrait d'*Houttuynia cordata* Thunb. induit l'apoptose via la voie mitochondrie-dépendante chez les cellules humaines d'adénocarcinome du colon HT29

Tang et *al* [91] ont aussi démontré qu'*Houttuynia cordata* inhibe la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses en causant des dommages sur l'ADN et en induisant l'apoptose des cellules traitées.

Ils ont aussi pu montrer que la plante induit la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (EROs), ce qui provoque le dysfonctionnement de la mitochondrie en modifiant son potentiel membranaire et pourrait finalement provoquer l'apoptose.

Parallèlement, les chercheurs ont montré qu'*Houttuynia cordata* active les caspases 3 et 9, impliquées dans la cascade menant à l'apoptose [91].

Des résultats complémentaires permettent de déduire que l'apoptose induite par *Houttuynia cordata* est médiée par la voie mitochondriale. En effet, l'extrait provoque l'augmentation de relargage des protéines : cytochrome c, Apaf₁, AIF et procaspase 1 de la mitochondrie vers le cytosol, pour former l'apoptosome. Parallèlement, on observe une diminution des protéines Bcl₂, xAIP et une hausse de Ban.

Parallèlement, *Houttuynia cordata* n'a pas affecté le taux des protéines Fas, FasL caractéristiques de la voie extrinsèque.

d) L'extrait éthanolique fermenté d'*Houttuynia cordata* induit l'apoptose des cellules leucémiques humaines HL60 et Molt-4 via la voie du stress oxydatif et la voie mitochondriale

Dans cette publication, Banjerdpongchai et Kongtwalert [92] ont étudié l'effet de l'extrait d'*Houttuynia cordata* sur trois lignées cellulaires humaines leucémiques : HL60, Molt4 et PBMC.

Les résultats sont en accord avec les travaux précédents. Tout d'abord, l'extrait a bien été toxique pour les trois lignées de cellules cancéreuses.

On a aussi constaté une production d'EROs augmentée par *Houttuynia cordata* et une diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie. On observe aussi une caspase 9 activée alors que la caspase 8 n'est pas altérée. Ceci indique que la signalisation apoptotique se fait par stress oxydatif, via la voie mitochondriale.

On peut aussi dire d'après les résultats obtenus que l'extrait d'*Houttuynia cordata* fermenté est plus actif que l'extrait non fermenté. Le processus de fermentation pourrait augmenter l'induction de la cytotoxicité et l'apoptose, comparé à l'extrait non fermenté.

e) L'extrait d'*Houttuynia cordata* module l'arrêt en phase G₀/G₁ et la mort médiée par le récepteur de mort apoptotique Fas/CD95 chez les cellules humaines de cancer du poumon A549

Chen et *al* [93] ont ici aussi démontré la cytotoxicité de l'extrait d'*Houttuynia cordata*, sur les cellules A 549 de cancer pulmonaire.

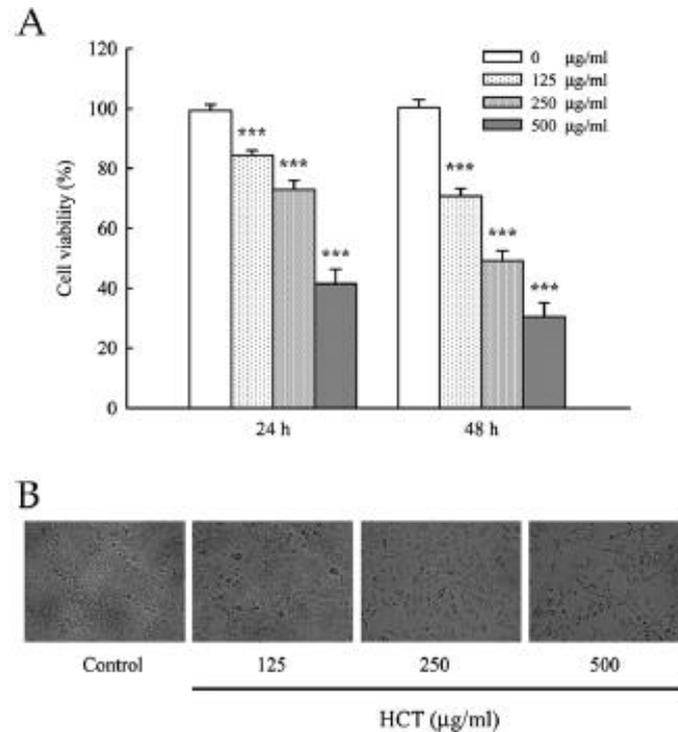


Fig 60 : Effets d'*Houttuynia cordata* sur la viabilité cellulaire et changements morphologiques chez les cellules A549

Houttuynia cordata extract modulates G₀/G₁ arrest and Fas/CD95-mediated death receptor apoptotic cell death in human lung cancer A549 cells [93]

Le marquage DAPI et l'essai des comètes ont permis d'analyser le cycle cellulaire des cellules exposées à l'extrait d'*Houttuynia cordata*. Et enfin, un Western Blot a permis d'étudier les taux des protéines apoptotiques.

Les résultats ont montré qu'*Houttuynia cordata* induit des changements morphologiques chez les cellules (perte de contenu, arrondissement), une hausse de la fragmentation de l'ADN ainsi que sa condensation, ce qui signifie qu'*Houttuynia cordata* induit des dommages de l'ADN. De plus, on observe une augmentation des populations cellulaires en phase G₀/G₁ et sub-G₁, ce qui montre que la plante inhibe la croissance cellulaire. Ceci est confirmé par la diminution des protéines apoptotiques liées à G₀/G₁ (cycline D1, cycline A, CDK₄ et CDK₂)

On note l'activation des caspases 8 et 3, alors que la caspase 9 n'est pas affectée, une hausse du taux des protéines Fas/CD95. Ceci permet de dire qu'*Houttuynia cordata* induit l'apoptose via l'activation des caspases 8 et 3 et les récepteurs de mort Fas-CD95.

f) L'houttuyninum, un constituant actif de la plante médicinale chinoise, inhibe la phosphorylation du récepteur tyrosine kinase HER2/neu et la croissance tumorale des cellules cancéreuses surexprimant HER2/neu

Zhou et *al* [94] ont démontré que l'houttuyninum (une forme stabilisée de l'houttuynine) inhibe de façon dose-dépendante la phosphorylation de la tyrosine kinase de HER2 chez les cellules MDA-MB-453. De la même façon, il inhibe l'activation d'ERK $\frac{1}{2}$ et AKT (des molécules situées en aval de la voie de transduction de signal médiée par HER2/neu).

Les chercheurs ont pu établir que l'houttuyninum inhibe préférentiellement la croissance des cellules tumorales qui surexpriment HER2/neu.

La surexpression du récepteur HER2/neu a un rôle clé dans différents processus pathologiques tels que : tumorigénèse et progression de cancers (sein, ovaire, carcinome gastro-intestinal [95, 96]. Il existe d'ailleurs déjà des thérapies ciblées anti-HER2/neu : Trastuzumab, Lapatinib, qui améliorent les résultats cliniques et le pronostic.

Les résultats de ces études sur les propriétés anticancéreuses d'*Houttuynia cordata* permettent de dire que la plante présente un certain potentiel et que le mécanisme d'action semble être l'induction de l'apoptose, via la voie des mitochondries notamment.

4) Propriétés diverses

a) Propriétés antioxydantes et antimutagènes

Dans la publication « A study of the antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata* Thunb. using an oxidized frying oil-fed model », Chen YY et al [97] ont étudié l'effet antioxydant de la plante en soumettant des rongeurs au stress oxydatif induit par une alimentation à base d'huile de friture et l'effet antimutagène en utilisant le test d'Ames.

i. Effet antioxydant

Les rongeurs soumis à une alimentation à base d'huile de friture présentent un contenu en polyphénols plasmatiques inférieur aux rongeurs du groupe témoin (rongeurs nourris avec de l'huile fraîche) alors que le contenu dans les fécès est augmenté. L'absorption apparente semble donc diminuée alors que l'excrétion fécale est augmentée.

Les rongeurs ayant reçu *Houttuynia cordata* en plus de l'huile oxydée, présentent quant à eux un taux de polyphénols plasmatiques supérieur au groupe témoin. Il faut noter que la teneur en polyphénols au niveau du foie reste inchangée quelle que soit la teneur en polyphénols alimentaires.

Ces données [97] laissent penser que la supplémentation de l'alimentation avec *Houttuynia cordata* réduit significativement le stress oxydatif dans le plasma et les tissus, prolonge le temps de latence des LDL-cholestérol et améliore le statut antioxydant total. Les chercheurs pensent que cet effet serait dû à la richesse en polyphénols, de type flavonoïdes, d'*Houttuynia cordata* [16]. En effet, le groupement hydroxyle de la structure des flavonoïdes peut attirer les radicaux libres, ce qui pourrait protéger les cellules contre la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres [97].

ii. Effet antimutagène

Les résultats ont montré que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique d'*Houttuynia cordata* présentaient tous les deux un effet inhibiteur sur la mutagénicité de l'aflatoxine B1, le benzo-a-pyrène et l'huile de friture oxydée (utilisés comme mutagènes chez *S. typhimurium* TA 98 et TA 100 dans le test d'Ames).

Il faut tout de même noter que l'extrait aqueux semble être plus puissant que l'extrait alcoolique. Ceci pourrait être dû au fait que l'extrait aqueux contient davantage de polyphénols que l'extrait méthanolique [97] et au fait que la structure polyphénol comporte un ou plusieurs groupements hydroxyles, ce qui rend les polyphénols assez hydrophiles (plusieurs polyphénols existent sous la forme de glucosides, ce groupement sucre augmente encore leur hydrophilie).

Ces résultats permettent de démontrer un effet antioxydant de la plante ainsi qu'un effet antimutagène. On peut penser que ces effets sont liés, mais la capacité antimutagène de la plante pourrait aussi refléter l'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité du cytochrome p450.

En effet, l'huile de friture oxydée provoque l'induction enzymatique du métabolisme xénobiotique, dont le CYP 450 [98, 99] et les polyphénols présentent une activité inhibitrice du CYP 450 (données non montrées dans la publication).

b) Effet "anti-obésité"

Miyata, Koyama et Yazawa se sont intéressés à l'effet anti-obésité de la plante dans l'étude « Water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves exerts anti-obesity effects by inhibiting fatty acid and glycerol absorption » [100].

En effet, dans cette étude, les chercheurs ont démontré que l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* inhibe l'augmentation des triglycérides plasmatiques, chez les souris nourries avec de l'huile de maïs. De la même façon, on a obtenu une inhibition de l'augmentation des taux plasmatiques d'acides gras non estérifiés ainsi que le glycérol qui avait été induite par l'administration d'acide oléique et de glycérol respectivement.

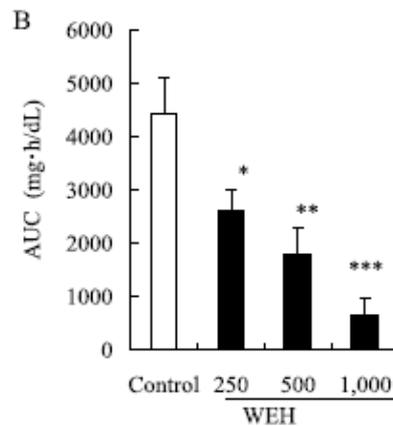


Fig 61 : AUC des TG absorbés selon la concentration en extrait d'*Houttuynia cordata*
Water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves exerts anti-obesity effects by inhibiting fatty acid and glycerol absorption [100]

Enfin, on a observé chez les souris ayant reçu un régime riche en matières grasses et des feuilles d'*Houttuynia cordata*, un effet anti-obésité (diminution de la masse corporelle et de la prise alimentaire [100]).

Les chercheurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'extrait aqueux d'*Houttuynia cordata* a supprimé l'absorption de graisses dans l'intestin grêle via deux mécanismes [100] :

- ✓ Inhibition de l'activité des lipases digestives qui hydrolysent les triglycérides en acides gras non estérifiés (ou monoglycérides) et en glycérol
- ✓ Diminution de l'absorption de ces hydrolysats par les cellules épithéliales de la bordure en brosse intestinale

Des études complémentaires ont permis de déterminer que l'activité de la lipase pancréatique n'était pas modifiée par *Houttuynia cordata*, ce qui permet de conclure que l'effet anti-obésité observé est dû à l'inhibition de l'absorption des acides gras non estérifiés et du glycérol.

c) Potentiel de régénération

Dans la publication “Combined effect of dark and wounding on regeneration potential of *Houttuynia cordata* Thunb. Leaves”, les chercheurs Y Wen Xu et *al* [101] ont établi le fait qu’*Houttuynia cordata* présente un potentiel de régénération lorsqu’on la soumet à l’obscurité ou à une blessure.

Les résultats ont en effet montré que le taux de jaunissement des feuilles soumises à une période de culture de 4 semaines dans l’obscurité ou à une blessure était significativement diminué par rapport aux feuilles témoins et résultait d’une régénération efficace.

Cette nouvelle propriété devrait aider les conditions de culture et de conservation de la plante.

d) Capacité adjuvante

Comme on a déjà pu le voir dans une publication précédente [86], *Houttuynia cordata* présente un potentiel pouvoir adjuvant [102] : « Adjuvanticity of sodium houttuuyfonate *in vivo* », Wang, Yu, Feng et Chen.

Les résultats de ce travail montrent que l’houttuuyfonate de sodium augmente le taux d’anticorps anti-antigène sérique [102], ce qui démontre son pouvoir adjuvant.

e) Chimioluminescence

Cette publication de XF. Yang et *al* [103] a permis d’observer une forte chimioluminescence lorsque le « sodium new houttuuyfonate » (ou lauroyl- α -hydroxyéthyl sulfonate de sodium), un analogue de l’houttuynine, est mélangé avec du Tween 80 en milieu acide et en présence de rhodamine B.

Cette découverte leur a permis de mettre au point une méthode de détection sensible de chimioluminescence du « sodium new houttuuyfonate » basée sur l’auto-oxydation du composé en milieu acide et dans des micelles de rhodamine B et Tween 80. On pourra par exemple appliquer cette méthode à la détection du « sodium new houttuuyfonate » dans les préparations pharmaceutiques et les fluides biologiques [103].

f) Propriété inhibitrice de la rénine

L. Yuan et *al* [104] ont étudié une série d'analogues de l'houttuyfonate de sodium afin de déterminer leur activité inhibitrice *in vitro* sur la rénine.

Les résultats montrent que chaque analogue de l'houttuyfonate de sodium a inhibé l'activité de la rénine [104]:

- ✓ sulfite de sodium acétalhéxanoyle (SHA-C6) : -34,37%
- ✓ sulfite de sodium acétaloctanoyle (SHA-C8) : -44,03%
- ✓ sulfite de sodium acétaldécanoyle (SHA-C10) : -79,33%
- ✓ sulfite de sodium acétaldodécanoyle (SHA-C12) : -83,04%
- ✓ sulfite de sodium acétaltétradécanoyle (SHA-C14) : -93,19%

On observe donc que plus la chaîne aliphatique de l'analogue est longue, plus l'inhibition de la rénine est importante. Ceci pourrait être dû aux interactions hydrophobes plus nombreuses entre l'enzyme et son inhibiteur.

De plus, des études cinétiques avec SHA-C14 ont montré qu'il s'agit d'une inhibition de type mixte, linéaire et dont la constante $K_i = 45,35\mu\text{M}$.

Cette étude montre donc que les analogues de l'houttuyfonate de sodium sont des composés potentiellement intéressants en tant que drogues anti-hypertensives, en agissant sur la première étape du système rénine-angiotensine. De plus, on peut espérer moins d'effets indésirables que pour les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (enzyme non sélective impliquée dans le clivage de l'angiotensine I en angiotensine II, mais aussi dans le clivage de la bradykinine responsable d'effets indésirables de type respiratoires comme la toux ou un œdème de Quincke).

g) Importance de la taille de la chaîne aliphatique dans l'affinité pour la rénine et l'enzyme de conversion

Dans « Size of aliphatic chain of houttuyfonate analogs determines their affinity for renin and angiotensin I converting enzyme » [105], L. Yuan et *al* ont déterminé l'affinité des analogues de l'houttuyfonate de sodium pour la rénine et l'enzyme de conversion, en fonction de la taille de la chaîne aliphatique et de la présence ou non d'un substrat.

Les résultats leur ont permis d'établir que :

- ✓ L'inhibition de l'activité de l'enzyme de conversion n'est pas proportionnelle à la longueur de la chaîne aliphatique des analogues, contrairement à la rénine
- ✓ Les analogues de l'houttuyfonate de sodium inhibent plus fortement l'activité enzymatique de la rénine que celle de l'enzyme de conversion
- ✓ La présence de substrat sur l'enzyme de conversion (l'angiotensine I) n'a pas atteint la capacité d'inhibition des analogues, ce qui suggère que les interactions enzyme-inhibiteur n'impliquent pas le site actif de l'enzyme. Les analogues pourraient modifier la structure de l'enzyme et ainsi empêcher les substrats de s'emboîter parfaitement au site actif pour la catalyse.

h) Effet protecteur sur l'hypertrophie du myocarde

Dans « Kinetics of renin inhibition by sodium houttuyfonate analogs » [52], JP. Gao et *al* ont démontré qu'un traitement à base d'houttuyfonate de sodium diminue le poids du ventricule gauche et la masse cardiaque chez des souris et des rats présentant une hypertrophie du myocarde. On observe aussi une baisse de la taille des cardiomyocytes chez les rats, une baisse du contenu en AMPc (provenant de l'activation des récepteurs β adrénergiques du système nerveux sympathique) et en angiotensine II chez les souris et enfin une diminution des concentrations en endothéline 1 (puissante hormone vasoconstrictrice impliquée dans la pathogénèse de l'hypertrophie) et en hydroxyproline dans le tissu ventriculaire.

Ces résultats montrent que l'houttuyfonate de sodium permet d'inhiber l'hypertrophie du myocarde dans les modèles animaux, en limitant l'activité du système nerveux sympathique et en diminuant les niveaux d'angiotensine II et d'endothéline 1 dans le tissu ventriculaire.

i) Inhibition du remodelage ventriculaire

“Effect of sodium houttuyfonate on inhibiting ventricular remodeling induced by abdominal aortic banding in rats” [106] : JP. Gao et *al* ont ici comparé l'houttuyfonate de sodium à un médicament de référence : le captopril (un inhibiteur de l'enzyme de conversion).

Comme dans la publication précédente [52], les résultats montrent que l'houttuyfonate de sodium diminue significativement l'indice de masse cardiaque, la taille des cardiomyocytes, le volume du collagène et les taux d'angiotensine II, d'aldostérone et de TNF α . Pour une dose élevée, on observe même une diminution de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.

L'houttuyfonate inhibe la fibrose et l'hypertrophie du myocarde, notamment dans les phases précoces du remodelage. On observe aussi des effets bénéfiques dus en partie au moins à l'atténuation de l'activation excessive du système rénine-angiotensine et l'excrétion du TNF α , deux facteurs qui sont impliqués lorsqu'ils sont surexprimés dans le processus de remodelage.

On a donc pu observer des propriétés diverses et variées, notamment une activité inhibitrice sur le système rénine-angiotensine, impliqué dans les pathologies cardiovasculaires ; et une activité anti-oxydante et antimutagène.

6. Effets indésirables d'*Houttuynia cordata* Thunb.

On a beaucoup étudié les propriétés et l'efficacité d'*Houttuynia cordata* dans différents domaines. Mais il faut aussi s'intéresser à sa sécurité et son innocuité en vue d'une utilisation chez l'Homme. Deux études se sont plus précisément penchées sur les effets indésirables d'*Houttuynia cordata*.

1) Choc anaphylactique et anaphylaxie létale causés par l'injection d'*Houttuynia cordata*, un traitement traditionnel chinois

Comme on a pu le voir précédemment, *Houttuynia cordata* est abondamment utilisée. La voie parentérale est utilisée, notamment en Chine, pour traiter diverses maladies en raison de ses effets antibactériens, antiviraux, anti-inflammatoires et potentialisateurs de l'immunité. Ce traitement lourd, qui consiste en l'administration d'un extrait végétal de l'huile volatile stérile provenant de la distillation d'*Houttuynia cordata* fraîche, a une incidence importante sur la mise en danger de la vie par anaphylaxie.

Dans ce travail, K.M. Ji et al [107] ont analysé 30 articles décrivant des cas de chocs anaphylactiques et de mort par choc anaphylactique causés par l'injection d'*Houttuynia cordata*.

Les articles ont été collectés à partir de revues médicales publiées en Chine entre 1980 et 2007. Ils rapportent en tout 39 épisodes de chocs anaphylactiques et 5 décès [107] :

- quatre des cinq décès sont survenus après une injection intraveineuse et un après injection intramusculaire
- ces patients étaient hospitalisés pour des infections des voies respiratoires (n = 3), une bronchite (n = 1) et un eczéma chronique (n = 1)
- quand la réaction allergique est survenue, de l'adrénaline a immédiatement été administrée, mais cela n'a pas pu sauver les patients
- le temps entre l'injection d'*Houttuynia cordata* et le décès est compris entre 15 minutes et 72 heures.

Parmi les 39 cas de chocs anaphylactiques :

- 8 ont reçu une injection intramusculaire et 31 une injection intraveineuse
- L'âge des patients était compris entre 2 ans et demi et 75 ans
- Ils étaient traités pour des infections des voies respiratoires (n = 19), une bronchite aiguë (n = 7), une amygdalite (n = 7), une gastroentérite aiguë (n = 1), une otite moyenne (n = 1) et la varicelle (n = 1)
- Les anomalies ont été constatées entre quelques secondes et 20 minutes après l'injection.
- Les 39 patients ont été sauvés sans aucune séquelle

Parmi les patients ayant présenté un choc anaphylactique, une jeune fille de 12 ans traitée pour une infection des voies respiratoires n'a eu aucune réaction après une injection intramusculaire, mais a subi un choc anaphylactique 15 minutes après avoir reçu une seconde injection.

Dans un autre cas, un garçon de 12 ans atteint lui aussi d'infection des voies respiratoires, n'a pas présenté de réaction allergique à la suite de 2 injections intramusculaires, mais 5 minutes après une troisième injection.

Une femme de 22 ans, sans antécédent d'allergie médicamenteuse, soignée pour une infection des voies respiratoires, a subi un choc anaphylactique grave seulement 2 minutes après avoir reçu une injection intraveineuse d'*Houttuynia cordata*. Elle a été sauvée par l'administration rapide d'adrénaline.

Les chercheurs ont émis l'hypothèse que l'hypersensibilité à l'injection d'*Houttuynia cordata* pourrait être due à l'instabilité du principe actif principal, l'houttuynfonate. De plus, les interactions avec d'autres médicaments administrés ou encore les impuretés contenues dans l'extrait peuvent jouer un rôle dans ces réactions allergiques.

Le Chinese National Adverse Reaction Monitoring Center a rapporté plus de 5000 cas de réactions indésirables à l'injection d'*Houttuynia cordata* entre janvier 1988 et avril 2006, dont 222 cas graves.

En conséquence, la State Food and Drug Administration de Chine a décidé d'arrêter l'utilisation de ces injections dans les hôpitaux à partir de juin 2006. Après un nouvel examen des conditions de fabrication et de contrôle de la qualité, la SFDA a donné l'autorisation à un petit nombre de fabricants de reprendre la production des injections. A noter qu'une étiquette informant sur le caractère allergène a été ajoutée au produit.

Ces résultats ont permis d'établir certains profils de personnes plus à risques. Ainsi, les injections d'*Houttuynia cordata* ne devraient pas concerner les enfants et les femmes enceintes ainsi que les patients atteints de pathologies légères ou ayant déjà présenté une allergie médicamenteuse. On pourrait aussi envisager un test cutané afin d'aider à identifier les patients à risque ou allergiques.

2) Effets indésirables à l'injection d'*Houttuynia* : une revue systématique

Ici aussi, les chercheurs Wang et al [108] ont extrait et analysé les données d'articles publiés dans de nombreuses revues médicales, jusqu'en juin 2010.

Ainsi, 645 articles ont été inclus dans l'analyse, correspondant à un total de 1232 effets indésirables rapportés :

- Les maladies respiratoires correspondent à 52,44% des cas, suivies par les maladies du système reproducteur (4,30%) et celles du système digestif (3,73%)
- De nombreux systèmes ou organes sont impliqués dans les effets indésirables : système respiratoire (37,42%), peau (34,66%), système digestif (25,49%), système circulatoire (25,41%) et système nerveux (23,96%)
- Parmi les 1232 cas signalés, 286 avaient déjà présenté des épisodes d'allergies antérieures (allergie à la pénicilline pour 15,03% des cas, allergie à des drogues inconnues dans 8,05% et sulfonamides pour 3,15%). Il faut noter que parmi les cas d'effets indésirables, l'injection d'*Houttuynia cordata* a fréquemment été utilisée en association avec des antibiotiques (céphalosporines, pénicillines, macrolides notamment)
- L'association à des macrolides représente un risque majoré par rapport à l'injection d'*Houttuynia cordata* seul
- Le risque d'effet indésirable est supérieur pour l'injection intraveineuse par rapport à l'injection intramusculaire
- Les chocs anaphylactiques (grade 1 selon l'OMS) ont représenté 58,99% des effets indésirables les plus graves. Tous les cas de décès (11 au total) sont dus à un choc anaphylactique, sauf 1 qui est dû à une défaillance multiviscérale causée par un purpura anaphylactique

On peut conclure que les effets indésirables à l'injection d'*Houttuynia cordata* sont graves, potentiellement mortels. Ils touchent principalement le système respiratoire (qui est aussi le principal système traité par ces injections).

On voit aussi dans ce travail qu'il faut prendre des précautions quant aux personnes à traiter : antécédents médicaux, choix de la voie intramusculaire ou intraveineuse et association à d'autres médicaments, notamment certains antibiotiques.

Conclusion

Houttuynia cordata est une plante médicinale chinoise, bien connue en Asie. L'utilisation de cette plante depuis de nombreuses années permet d'avoir un certain recul sur la pratique clinique.

L'étude d'*Houttuynia cordata* à travers les nombreuses publications parues ces dernières années met en lumière de nombreuses propriétés intéressantes de la plante en tant qu'antibactérien, antiviral, anti-inflammatoire, anticancéreux, immunostimulant... C'est pour cela que de nombreux scientifiques l'étudient encore et qu'elle est en passe d'avoir sa monographie à la Pharmacopée européenne.

Cependant, on a aussi pu constater des effets indésirables, potentiellement graves et mortels. Ceci incite à une grande vigilance, notamment chez les populations à risque (enfants, femmes enceintes, patients ayant des antécédents d'allergies).

Glossaire

Dicotylédones (Magnolopsida) : groupe d'espèces végétales, faisant partie des Angiospermes. Les Dicotylédones présentent une plantule à deux cotylédons. Les feuilles présentent des nervures réticulées et les fleurs sont caractérisées par 4 ou 5 pétales (par opposition aux Monocotylédones : herbes et graminées, dont les feuilles ont les nervures parallèles et des fleurs à 3 pétales).

Angiosperme : division qui regroupe les plantes à fleurs. Angiosperme signifie en grec « graine dans un récipient », par opposition aux Gymnospermes (graine nue). La graine est protégée par la membrane ovarienne.

Racines adventives : racines qui apparaissent directement sur la tige

Hermaphrodite : qui porte les organes reproducteurs des deux sexes

Epi : inflorescence simple de fleurs sessiles, portées par un axe unique

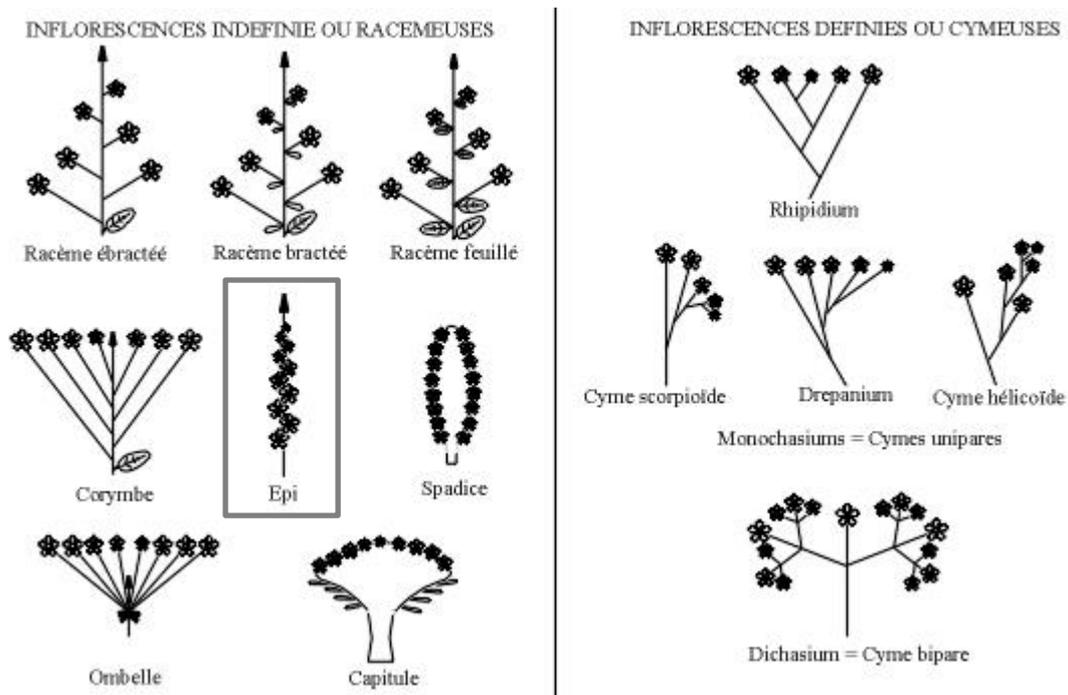


Fig 62 : Les différentes inflorescences simples

<http://sajf.ujf-grenoble.fr/spip.php?article31>

Bractée : pièce florale en forme de feuille, faisant partie de l'inflorescence

Involucre : ensemble des bractées

Dysenterie : maladie infectieuse du côlon chez l'Homme, pouvant être grave, aiguë ou chronique. Elle est caractérisée par des selles fréquentes et aqueuses, souvent mêlées de sang, de mucus ou de glaires et accompagnées de fortes crampes abdominales.

Entérite : inflammation de la muqueuse intestinale

Nomenclature IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) : c'est la nomenclature reconnue et qui fait autorité pour nommer les composés chimiques, inorganiques ou organiques. Cette nomenclature est basée sur la dénomination de la chaîne la plus longue contenant la fonction principale et à partir de laquelle on va numéroter les carbones en commençant par l'extrémité la plus proche de la fonction principale. Les substituants sont indiqués par préfixe et classés en indiquant le numéro du carbone impliqué et par ordre alphabétique.

HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) : méthode de séparation des constituants d'un mélange, même complexe. Dans cette technique, la phase mobile (un solvant ou un mélange de solvants) est injectée dans une colonne (ou phase stationnaire). On va alors injecter le mélange à identifier, dont les constituants vont être retenus de façon différente dans la colonne, selon leur taille, leur polarité, leur conformation, leur charge... C'est le phénomène de rétention. Un détecteur placé en bout de colonne et couplé à un enregistreur va permettre de détecter chaque constituant selon son temps de rétention et de tracer ensuite le chromatogramme.

CI₅₀ : concentration inhibitrice 50, soit la concentration minimale d'un composé capable d'inhiber 50% d'une activité donnée.

Milieu RPMI complet : ou Roswell Park Memorial Institute Medium est un milieu de culture cellulaire contenant une grande quantité de phosphates et utilisé sous une atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone. Il contient en plus du milieu minimum les métabolites finaux nécessaires à la croissance cellulaire (acides aminés, vitamines, bases...)

Ci : Curie, unité de mesure d'activité d'une source radioactive. 1 Ci correspond à l'activité de 1g de ²²⁶Ra, ou encore $3,7 \cdot 10^{10}$ Becquerel

Cpm : unité de mesure de comptage de radioactivité, coup par minute. 1 cpm correspond à 1 détection par minute.

Cytométrie de flux : technique qui permet de compter et caractériser des particules (molécules, cellules...), en les faisant défiler à grande vitesse devant un faisceau laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) va permettre de classer les particules selon différents critères (taille, morphologie, réfringence du cytoplasme, rapport nucléocytoplasmique...)

Test d'ELISA (Enzyme Like ImmunoSorbent Assay) [109] : technique de détection immunoenzymatique qui permet d'étudier une réaction antigène-anticorps, grâce à une réaction colorée qui résulte de l'action d'une enzyme préalablement fixée à un anticorps sur un substrat (antigène).

Bactéries à Gram négatif [110] : type de bactéries identifiées par la coloration de Gram (rose pour les Gram – et mauve pour les Gram +), qui repose sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie. Ainsi les bactéries à Gram négatif possèdent 2 membranes (la membrane externe, l'espace périplasmique constitué de peptidoglycane et la membrane cytoplasmique). La membrane externe est phospholipidique et organisée en bicouche ; elle peut contenir un composé pathogène : le lipopolysaccharide (ou LPS). L'espace périplasmique est un lieu de stockage d'enzymes et de nutriments ; et il intervient dans des étapes de synthèse protéique ou de métabolisme. Il contient aussi une fine couche de peptidoglycane. Enfin, la membrane plasmique, semblable à la membrane externe excepté le LPS.

Les bactéries à Gram – comptent notamment les bactéries du genre *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, ...

Marquage DAPI (4'-6'-diamidino-2-phénylindole) [111] : marquage par fluorescence. Le DAPI, un fluorochrome, va fortement se lier aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. Il va émettre une fluorescence bleue lorsqu'on le soumet à un rayonnement UV, ce qui va permettre de détecter et quantifier l'ADN.

Essai des comètes [112] : technique d'électrophorèse sur gel d'agarose qui permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique et indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN, tel que l'apoptose.

Western Blot [113]: méthode de détection et d'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Il utilise une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse.

Test d'Ames [114]: test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique. Le test repose sur différentes souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* portant des mutations dans les gènes nécessaires à la synthèse d'histidine. Le test va donc permettre d'identifier les composés chimiques qui vont rendre les souches prototrophes par rapport à l'histidine.

Table des figures

Fig 1 : Photographie de *Houttuynia cordata*

Fig 2 : Herbes médicinales chinoises

Fig 3 : Asie du Sud Est

Fig 4 : Pièces foliaires

Fig 5: *Houttuynia cordata*

Fig 6 : Photographie de l'appareil reproductif

Fig 7 : Drogue sèche

Fig 8 : Plat à base d'*Houttuynia cordata*

Fig 9 : Méthylnonylcétone

Fig 10 : Isomères de l'acétate de bornyle

Fig 11 : β -myrcène

Fig 12 : Tableau des différents phytoconstituants des huiles essentielles d'*Houttuynia cordata*

Fig 13 : Spectre électromagnétique

Fig 14 : Levée de dégénérescence du niveau d'énergie

Fig 15 : D-glucopyranose

Fig 16 : β -D-glucose

Fig 17 : Houttuynoside A

Fig 18 : Houttuynamide A

Fig 19 : Aristolactame All

Fig 20 : Aristolactame Bll

Fig 21 : Pipérolactame A

Fig 22 : Splendidine

Fig 23 : Lysicamine

Fig 24 : Cépharadione B

Fig 25 : Noraritolodione

Fig 26 : Benzamide

Fig 27 : Acide indole-3-carboxylique

Fig 28 : Vomifoliol

Fig 29 : Quercitrine

Fig 30 : Quercétine-3-O- β -D-galactopyranoside (Hypérine)

Fig 31 : Afzéline

Fig 32 : Acide vanillique

Fig 33 : Méthyl vanillate

Fig 34 : Vanilline

Fig 35 : Acide protocatéchique

Fig 36 : Acide 4-hydroxybenzoïque

Fig 37 : Méthylparaben

Fig 38 : p-hydroxybenzaldéhyde

Fig 39 : Méthylférulate

Fig 40 : β -sitostérol

Fig 41 : Structure de base des flavonoïdes

Fig 42 : Quercétine

Fig 43 : Rutine

Fig 44 : Spectre HPLC des flavonoïdes

Fig 45 : Caractéristiques biologiques des plantes de 22 provenances

Fig 46 : Comparaison des flavonoïdes dans les 2 types de plante

Fig 47 : Effet lymphoprolifératif de *Houttuynia cordata* sur les lymphocytes spléniques de souris

Fig 48 : Effet d'*Houttuynia cordata* sur la sécrétion de cytokines par les lymphocytes spléniques murins

Fig 49 : Effet de PFH sur la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique

Fig 50 : Effet antiviral d'*Houttuynia cordata* contre le virus de la Dengue, chez les cellules HepG2

Fig 51 : Effet de *Houttuynia cordata* sur l'expression de la protéine E des cellules HepG2

Fig 52 : Analyse HPLC des composés flavonoïdes d'*Houttuynia cordata*

Fig 53 : Houttuynofonate de sodium et Houttuynine

Fig 54 : Observation au microscope à fluorescence des colonies de *Pseudomonas aeruginosa*

Fig 55 : Observation de la morphologie du biofilm de *P. aeruginosa*

Fig 56 : Composition de l'huile essentielle d'*Houttuynia cordata*

Fig 57 : Effets de l'extrait supercritique d'*Houttuynia cordata* sur la production de NO et PGE₂ par les cellules RAW 264.7 simulées par du LPS

Fig 58 : Effets des fractions d'*Houttuynia cordata* sur le relargage de cytokines

Fig 59 : Effet cytotoxique d'*Houttuynia cordata* à 100 et 500 µg/ml sur les cellules Jurkat

Fig 60 : Effets d'*Houttuynia cordata* sur la viabilité cellulaire et changements morphologiques chez les cellules A549

Fig 61 : AUC des TG absorbés selon la concentration en extrait d'*Houttuynia cordata*

Fig 62 : Les différentes inflorescences simples

Références

[1] : **Pharmacopoeia of the people's republic of China**

English edition (2010), China Medical Science Press

[2] : **Médecine traditionnelle chinoise**

<http://www.medecinechinoise.org/>

[3] : **Médecine traditionnelle chinoise**

http://www.passeportsante.net/fr/Therapies/Guide/Fiche.aspx?doc=medecine_traditionnelle_chinoise_th

[4] : **La Pharmacopée Chinoise, qu'est-ce que c'est ?**

http://www.passeportsante.net/fr/Therapies/Guide/Fiche.aspx?doc=pharmacopee_chinoise_th

[5] : **Pharmacopoeia of the People's Republic of China**

en.wikipedia.org

[6] : ***Houttuynia cordata* (heart-leaved houttuynia)**

<http://www.kew.org/plants-fungi/Houttuynia-cordata.htm>

[7] : **A coloured atlas of the chinese materia medica specified in Pharmacopoeia of the people's republic of China (1995)** - Guangdong Science and Technology press

[8] : **Global invasive species database – *Houttuynia cordata* (shrub)**

<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=854&fr=1&sts=&lang=FR>

[9] : **Variation in Chemical Composition and Antibacterial Activities of Essential Oils from Two Species of *Houttuynia* THUNB**

Hongmei LU, Xianjin WU, Yizeng LIANG, et Jian ZHANG

Chem. Pharm. Bull. 54(7) 936—940 (2006)

[10] : **The Constituents and their Bioactivities of *Houttuynia cordata***

Shu-Chen CHOU, Chung-Ren SU, Yuh-Chi KU et Tian-Shung WU

Chem. Pharm. Bull. 57(11) 1227—1230 (2009)

[11] : **La spectrométrie de masse**

<http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/spectrom.htm#Principe>

[12] : **Spectrométrie infrarouge**

<http://www.chimie.umontreal.ca/cours/giassonr/partie2.pdf>

[13] : **Résonnance magnétique nucléaire**

<http://eduscol.education.fr/rnchimie/phys/magnet/rmn/rmn.pdf>

[14] : **HMBC**

<http://www.columbia.edu/cu/chemistry/groups/nmr/HMBC.html>

[15] : **Analyse structurale d'oligosaccharides par RMN 1D et 2D**

Jean Marc Nuzillard

<http://eos.univ-reims.fr/LSD//JmnSoft/Teaching/sucrose.pdf>

[16] : **Quantative Variation of Flavonoids in *Houttuynia cordata* from Different Geographic Origins in China**

WU Ling-Shang, SI Jin-Ping, YUAN Xiao-Qing, SHI Xue-Rong

Chinese Journal of Natural Medicines 7 (2009) 0040–0046

doi: 10.3724/SP.J.1009.2009.00040

[17] : **What are flavonoids ?**

<http://www.news-medical.net/health/What-are-Flavonoids.aspx>

[18] : **Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata***

Kit-Man Laua, Kin-Ming Leea, Chi-Man Koon, Crystal Sao-Fong Cheung

Journal of Ethnopharmacology 118 (2008) 79–85

[19] : **Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen *Salmonella* within the RAW 264.7 macrophage**

Gon Sup KIM, Dong Hyeok KIM, Jeong Ju LIM

Pharmaceutical Society of Japan, 31(11) 2012–2017 (2008)

[20] : **Les salmonelloses**

www.pasteur.fr

[21] : **Dietary supplementation with a probiotic fermented four-herb combination enhances immune activity in broiler chicks and increases survivability against *Salmonella gallinarum* in experimentally infected broiler chicks**

Bock-Gie JUNG, Jae-Huyng KO et Bong-Joo LEE

J. Vet. Med. Sci. 72(12): 1565–1573, 2010

[22] : **Curcuma**, Pharmacopée française,

Monographie issue de la Pharmacopée chinoise

[23] : **Universités de Médecine Traditionnelle Chinoise de Nanjing et Shanghai, La Pharmacopée chinoise**

Les herbes médicinales usuelles

Editions You Feng 2008

[24] : **Traité des plantes médicinales chinoises**

Jacques Roi

Lechevalier, 1955

[25] : **Immunomodulatory activity of curcumin**

Antony S., Kuttan R. and Kuttan G.

Immunology Investigations 28 : 291-303, 1999

[26] : ***Paeonia japonica*, *Houttuynia cordata* and *Aster scaber* water extracts induce nitric oxide and cytokine production by lipopolysaccharide-activated macrophages**

Kim J., Park C., Lim Y., and Kim H.

J. Med. Food 12 : 365-373, 2009

[27] : **Effect of the folk remedy, Bainiku-ekisu, a concentrate of *Prunus mume* juice, on *Helicobacter pylori* infection in humans**

Nakajima S., Fujita K., Inoue Y., Nishio M., and Seto Y.

Helicobacter 11 : 589-591, 2006

[28] : ***In vitro* inhibition of human influenza A virus infection by fruit-juice concentrate of japanese plum (*Prunus mume* Sieb et Zucc)**

Yingsakmongkon S., *et al.*

Biol. Pharm. Bull 31 : 511-515, 2008

[29] : **Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz, *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. And *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus**

Kim T G., Kang S Y., Jung K K. *et al.*

Phytother. Res. 15 : 718-720, 2001

[30] : **Organisation mondiale de Gastroentérologie : Probiotiques et Prébiotiques**

Recommandation pratique, 2008

[31] : ***Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells**

Christensen H R., Frokiar H. et Pestka J J.

J. Immunology 168 : 171-178, 2002

[32] : ***Lactobacilli* and *Streptococci* induce interleukin-12 (IL-12), IL-18 and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells**

Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J *et al.*

Infect. Immun. 66 : 6058-6062, 1998

[33] : **Probiotics such as *Lactobacillus* and *Streptococci* activate NFκB and STAT signaling pathways in human macrophages**

Miettenen M., Lehtonen A., Julkunen L. and Matikainen S
J. Immun. 164 : 3733-3740, 2000

[34] : **Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by *Lactobacillus casei***

Nomoto K., Miake S., Hashimoto S. *et al.*
J. Clin. Lab. Immunol. 17 : 91-97, 1985

[35] : **Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* infection by a diet supplemented by yogurt**

De Simone C., Tzantzoglou S., Baldinelli L. *et al.*
Immunopharmacology Immunotoxicology 10 : 399-415, 1988

[36] : **Probiotics inhibits enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression**

Mack D R., Michail S., Wei S. *et al.*
American Journal of Physiology 276 : G941-950, 1999

[37] : **The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on Dengue virus and Dengue-infected cells**

Vuittra Leardkamolkarn, Wipawan Sirigulpanit, Chayakom Phurimsak *et al.*
Journal of Food Biochemistry 36 : 86-92, 2010

[38] : **Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV**

Hayashi K., Kamiya M., Hayashi T.
Planta Med. 61 : 237-241, 1995

[39] : **A phytoanticipin derivative, sodium houttuynfonate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa***

Jing Shao, Huijuan Cheng, Changzhong Wang et Yan Wang
Molecules 17 : 11242-11254, 2012

[40] : **Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga**

Hidari K.I., Takahashi N., Arihara M *et al.*
Biochem. Biophys. Res. Commun. 376 : 91-95, 2008

[41] : **Two classes of plant antibiotics : Phytalexins versus « phytoanticipins »**

VanEtten H.D. ; Manfield J.W., Bailey J.A. ; Farmer E.E.
Plant Cell 6 : 1191-1192, 1994

[42] : **Natural products and plant disease resistance**

Dixon R.A.
Nature 411 : 843-847, 2001

[43] : **Synergistic effect of 14- α -lipoyl andrographolide and various antibiotics on the formation of biofilms and production of exopolysaccharide and pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa***

Zeng X. *et al*

Antimicrob. Agents Chemother 55 : 3015-3017, 2011

[44] : **Introduction to biofilm**

Costerton JW

Int. Journal Antimicrob. Agents 11 : 217-221, 1999

[45] : **Les biofilms chez les bactéries**

www.ujf-grenoble.fr

[46] : **The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment**

Sutherland IW

Trends in Microbiology 9 : 222-227, 2001

[47] : **Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases**

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P

Nat. Rev. Microbiology 2 : 95-108, 2004

[48] : **Structure of an antimicrobial substance isolated from *Houttuynia cordata* Thunb.**

Kosuge T

J. Pharm. Sac. Jpn. 72 : 12271-12275, 1952

[49] : **Transcriptional and functional analysis shows sodium houttuynfonate-mediated inhibition of autolysis in *Staphylococcus aureus***

Liu G, Xiang H, Tang X *et al.*

Molecules 16 : 8848-8865, 2011

[50] : **Immune response of AA broilers to ibv hl120 vaccine and sodium houttuynfonate**

Zhou Y, Zhou M, Zhang D, Zhang H, Zhang L

Res. Vet Sci. 89 : 373-377, 2010

[51] : **Effects of sodium houttuynfonate on expression of nf-kappaB and MCP-1 in membranous glomerulonephritis**

Pan P, Wang YJ, Han L *et al.*

Journal of Ethnopharmacology 131 : 203-209, 2010

[52] : **Effect of sodium houttuynfonate on myocardial hypertrophy in mice and rats**

Gao JP, Chen CX, Wang Y *et al.*

J. Pharm. Pharmacol. 61 : 677-683, 2009

[53] : **Studies on the anti-inflammatory effect and mechanism of houttuyninum**

Li S, Yu QH, Chu ZY

Chinese Pharmacological Bulletin 14 : 442-444, 1998

[54] : **Interaction of houttuifonate homologues with cell membrane of gram-positive and gram-negative bacteria**

Ye X, Li X, Yuan L, Ge L, Zhang B, Zhou S

Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects 301 : 412-418, 2007

[55]: **Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams**

Paulsen, Firth, Skurray

The Staphylococci in human disease

Crossley KB, Archer GL

Eds Churchill Livingstone ; New York, NY, USA, 1997 ; pp 175-212

[56] : **Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection**

Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, Wu XJ

J. Ethnopharmacology 104 : 245-249, 2006

[57] : **Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response**

Lee JS, Kim IS, Kim JH, Kim JS, Kim DH, Yun CY

J. Ethnopharmacology 117 : 34-40, 2008

[58] : **Covalent protein binding and tissue distribution of houttuynin in rats after intravenous administration of sodium houttuifonate**

DENG Zhi-Peng, ZHONG Da-Fang, MENG Jian, CHEN Xiao-yan

Acta Pharmacologica Sinica (2012) 33 : 568-576

[59] : **Potential of allergic bronchoconstriction by repeated exposure to formaldehyde in guinea-pigs *in vivo***

Kita T, Fujimura M, Myou S, Ishiura Y, Abo M, Katayama N et al.

Clin Exp Allergy (2003) 33 : 1747-53

[60] : **Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats**

Arican RY, Sahin Z, Ustunel I, Sarikcioglu L, Ozdem S, Oguz N

Exp Toxicol Pathol (2009) 61 : 297-305

[61] : **Hypersensitivity to acetaldehyde-protein adducts**

Isreal Y, MacDonald A, Niemela O, Zamel D, Shami E, Zywlko M et al.

Mol Pharmacol 42 : 711-7, 1992

[62] : **N-(3-methylpyridinium) lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein**

Furuhata A, Ishii T, Kumazawa S, Yamada T, Nakayama T, Uchida K

J Biol Chem 278 : 48658-65, 2003

[63] : **Protein-bound acrolein : potential markers for oxidative stress**

Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y

Proc Nat Acad Sci USA 95 : 4882-7, 1998

- [64] : **Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation**
Lee SH, Blair IA
Chem Res Toxicol 13 : 698-702, 2000
- [65] : **Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal**
Aldini G, Gamberoni L, Orioli M, Beretta G, Regazzoni L, Facino RM
J Mass Spectrom 41 : 1149-61, 2006
- [66] : **Interaction between human serum albumin and the felbamame metabolites 4-hydroxy-5-phenyl-[1,3]oxazinan-2-one and 2-phenylpropenal**
Roller G, Dieckhaus CM, Santos WL, Sofia RD, Macdonald TL
Chem Res Toxicol 15 : 815-824, 2002
- [67] : **Structure-activity relationships for degradation reaction of 1- β -O-acyl glucuronides : kinetic description and prediction of intrinsic electrophilic reactivity under physiological conditions**
Baba A, Yoshioka T,
Chem Res Toxicol 22 : 158-172, 2009
- [68] : **Anti-inflammatory effects of a *Houttuynia cordata* supercritical extract**
Sunhee Shin, Seong Soo Jo, Jeong Hee Jeon et al.
Journal of Veterinary Science 11 (3) : 273-275, 2009
- [69] : **Anti-inflammatory activity of traditional Chinese medicinal herbs**
Min-Hsiung Pan, Yi-Shiou Chiou, Mei-Ling Tsai et Chi-Tang Ho
Journal of Traditional and Complementary Medicine 1 : 8-24, 2011
- [70] : ***Houttuynia cordata*, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity**
Weifeng Li, Ping Zhou, Yanmin Zhang, Langchong He
Journal of Ethnopharmacology 133 : 922-927, 2011
- [71] : **The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2-selective inhibitors**
Loren M.D.
Semin. Arthritis Rheum 32 : 25-32, 2002
- [72] : **Cyclooxygenase inhibitory natural products : current status**
Jachak S.M.
Current Medicinal Chemistry 13 : 659-678, 2006
- [73] : **Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition**
Blobaum A.L., Marnett L.J.
Journal of Medicinal Chemistry 50 : 1425-1441, 2007

[74] : **Cyclooxygenases in cancer progress and perspective**

Shan Z, Vasan Y, William G.N., William B.J., Angelo M.D.M.

Cancer letters 215 : 1-20, 2004

[75] : **Anti-inflammatory effects of *Houttuynia cordata* supercritical extract in carrageenan-air pouch inflammation model**

Dajeon Kim, Dongsun Park, Jangbeen Kyung et al.

Laboratory Animal Research 28(2) : 137-140, 2012

[76] : **Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response**

Ji-Sook Li, In Sik Kim, Joo-Hwan Kim, Jin Sook Kim

Journal of Ethnopharmacology 117 : 34-40, 2008

[77] : ***Houttuynia cordata* water extract suppresses anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response by inhibiting multiple steps of FcεRI signaling in mast cells**

Eun Hee Han, Jin Hee Park, Ji Young Kim, Hye Gwang Jeong

Food and Chemical Toxicology 47 : 1659-1666, 2009

[78] : **Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation**

Guang Zhao Li, Ok Hee Chai, Moo Sam Le, Eui-Hyeog Han, Hyoung Tae Kim et Chang Ho Song

Biol. Pharm. Bull. 28 (10) : 1864-1868, 2005

[79] : **Protective effect of *Houttuynia cordata* extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats**

Lean-Teik Ng, Feng-Lin Yen, Chia-Wen Liao et Chun-Ching Lin

The American journal of Chinese medicine, vol 35, No 3 : 465-475, 2007

[80] : **Mechanisms of bleomycin-induced lung damage**

Hay J, S Shahzeidi et G Laurent

Arch. Toxicol. 65 : 81-94, 1991

[81] : **Effects of taurine on bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters**

Wang HD, M Yamaha, S Okinaga et al.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165 : 406-411, 2002

[82] : **The effect of melatonin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats**

Arslan S.O., M. Zerín, H. Vural, A. Coskun

J. Pineal Res. 32 : 21-25, 2002

[83] : **Effects of sodium houttuynifonate on expression of NF-kappa B and MCP-1 in membranous glomerulonephritis**

Pei Pan, Yu-Jie Wang, Lu Han, Xiang Liu, Meng Zhao, Yong-Fang Yuan

Journal of Ethnopharmacology 131 : 203-209, 2010

[84] : **The inhibitory effect of *Houttuynia cordata* extract on stem cell factor-induced HMC-1 cell migration**

In Sik Kim, Joo-Hwan Kim, Jin Sook Kim, Chi-Young Yun, Dong-Hee Kim, Ji-Sook Lee
Journal of Ethnopharmacology 112 : 90-95, 2007

[85] : **Effects of sodium houttuynfonate on phosphorylation of CaMK II, CREB and ERK ½ and expression of c-Fos in macrophages**

Dayong Wang, Yukihiko Noda, Yuan Zhou, Atsumi Nitta, Toshitaka Nabeshima, Qinghai Yu
International Immunopharmacology 4 : 1083-1088, 2004

[86] : **Studies on adjuvant activity of sodium houttuynfonate and its mechanism**

Dayong Wang, Qinghai Yu, Peggy Eikstadt, Darcy Hammond, Yun Feng, Na Chen
International Immunopharmacology 2 : 1411-1418, 2002

[87] : **Antileukemic activity of *Houttuynia cordata* Thunb. extracts in Jurkat and U937 human leukemic cells**

Jaturawat Pawinwongchai and Supantitra Chanprasert
Journal of Chinese and Pharmaceutical Research 3(4) : 204-212, 2011

[88] : ***Houttuynia cordata* Thunb fraction induces human leukemic Molt-4 cell apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway**

Adchara Prommaban, Kanchanok Kodchakorn, Pradchya Kongtawelert, Ratana Banjerdpongchai
Asian Pacific J Cancer Prev 13 : 1977-1981, 2012

[89] : **Mort cellulaire programmée (Apoptose)**

http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p100/ppt_H._Steller.pdf

[90] : **La mort cellulaire par apoptose**

http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Master/biocel/garcia/apopBMC402.pdf

[91] : ***Houttuynia cordata* Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells**

Yih-Jing Tang, Jai-Sing Yang, Chin-Fen Lin, Woei-Cherng Shyu, Minoru Tsuzuki, Chi-Cheng Lu, Yuh-Fung Chen et Kuang-Chi Lai
Oncology Reports 22 : 1051-1056, 2009

[92] : **Ethanol extract of fermented Thunb induces human leukemic HL-60 and Molt-4 cell apoptosis via oxidative stress and a mitochondrial pathway**

Ratana Banjerdpongchai, Prachya Kongtawelert
Asian Pacific J Cancer Prev 12 : 2871-2874, 2011

[93] : **Houttuynia cordata** Thunb extract modulates G0/G1 arrest and Fas/CD95-mediated death receptor apoptotic cell death in human lung cancer A549 cells

Yuh-Fung Chen, Jai-Sing Yang, Shih-Chang Tsai, Shu-Fen Peng et Yuan-Ro Zhou

Journal of Biomedical Science 20 : 18, 2013

[94] : **Houttuyninum, an active constituent of Chinese herbal medicine, inhibits phosphorylation of HER2/neu receptor tyrosine kinase and the tumor growth of HER2/neu-overexpressing cancer cells**

Ning-Ning Zhou, Jun Tang, Wen-Dan Chen, Gong-Kan Feng, Bin-Fen Xie, Zong-Chao Liu, Dajun Yang, Xiao-Feng Zhu

Life Sciences 90 : 770-775, 2012

[95] : **Basic science of HER-2/neu : a review**

Hung MC, Lau YK

Semin Oncol 26 (4 Suppl. 12) : 51-9, 1999

[96] : **Role of HER2/neu in tumor progression and therapy**

Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E

Cell Mol Life Sci 61 (23) : 2965-78, 2004

[97] : **A study of the antioxidative and antimutagenic effects of Houttuynia cordata Thunb. using an oxidized frying oil-fed model**

Ya-Yen Chen, Jen-Fang Liu, Chiao-Ming Chen, Pi-Yu Chao et Tsan-Ju Chang

J Nutr Sci Vitaminol. 49 : 327-333, 2003

[98] : **Effect of oxidized oil and vitamin C levels on the hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes system of guinea pigs**

Liu JF, Lee YW, Chang FC

J Nutr Sci Vitaminol 46 : 137-140, 2000

[99] : **Forms of cytochrome P450 in the liver microsome of oxidized frying oil-fed guinea pigs**

Liu JF, Chang FC

J Nutr Sci Vitaminol 46 : 240-245, 2000

[100] : **Water extract of Houttuynia cordata Thunb. leaves exerts anti-obesity effects by inhibiting fatty acid and glycerol absorption**

Mitsuyoshi Miyata, Tomoyuki Koyama et Kazunaga Yazawa

J Nutr Sci Vitaminol. 56 : 150-156, 2010

[101] : **Combined effect of dark and wounding on regeneration potential of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves**

Y Wen Xu, Jian Wei Zeng, Yu Ting Zou, Amjad M Husaini, Ru Yu Yao, De Gang WU et Wei Wu
Indian Journal of Experimental Biology 49 : 540-546, 2011

[102] : **Adjuvanticity of sodium houttuynonate *in vivo***

Dayong Wang, Qinghai Yu, Yun Feng, Na Chen
Indian Journal of Pharmacology 34 : 363-364, 2002

[103] : **Chemiluminescence determination of sodium new houttuynonate in pharmaceutical preparations based on Tween80-Rhodamine B system**

Xiao-Feng Yang, Hanchun Yao, Ji-Bao Zhai, Hua Li
J Fluoresc 17 : 15-21, 2007

[104] : **Kinetics of renin inhibition by sodium houttuynonate analogs**

Luijiang Yuan, Jianping Wu, Rotimi E Aluko et Xiaoli Ye
Biosci. Biotechnol. Biochem. 70 : 2275-2280, 2006

[105] : **Size of aliphatic chain of houttuynonate analogs determines their affinity for renin and angiotensin I converting enzyme**

Luijiang Yuan, Jianping Wu, Rotimi E Aluko
International Journal of Biological Macromolecules 41 : 274-280, 2007

[106] : **Effect of sodium houttuynonate on inhibiting ventricular remodeling induced by abdominal aortic banding in rats**

Jian Ping Gao, Chang Xun Chen, Qi Wu, Wei Liang Gu et Xiang Li
Can J Physiol. Pharmacol. 88 : 693-701, 2010

[107] : **Anaphylactic shock and lethal anaphylaxis caused by *Houttuynia cordata* injection, a herbal treatment in China**

K-M Ji, M Li, J-J Chen, Z-K Zhan, Z-G Liu
Allergy 64 : 815-821, 2009

[108] : **Adverse events to *Houttuynia* injection : a systematic review**

Li Wang, Xiaohua Cui, Lan Chen, Qiang Yuan, Tingqian Li, Youping Li, Shaoling Deng, Hongcai Shang et Zhaoxiang Bian
Journal of Evidence-Based Medicine 3 : 168-176, 2010

[109] : **La technique ELISA**

<http://www.technobio.fr/article-18589062.html>

[110] : **Bactériologie médicale**

Charles Nauciel, Jean-Louis Vildé
Edition Elsevier-Masson, 2005

[111] : **DAPI-fluorescence**

[www.snv.jussieu .fr](http://www.snv.jussieu.fr)

[112] : **Le test des comètes**

www.technobio.fr

[113] : **Principe de l'électrophorèse des protéines dans le Western Blot**

www.cours-de-biochimie.fr

[114] : **Le test d'Ames pour évaluer le pouvoir cancérogène d'une substance**

www.technobio.fr

[115] : ***Houttuynia cordata* Thunb. : a review of phytochemistry and pharmacology and quality control**

Jiangang Fu, Ling Dai, Zhang Lin, Hongmei Lu

Chinese Medicine vol. 4 No. 3 (2013), article ID : 37184

Abstract

Houttuynia cordata Thunberg is a Chinese medicinal plant, which belongs to the family of Saururaceae. Originally from South-East of Asia, it is used for many years as a condiment in local cooking, as ornamental, but it is also used to cure many diseases (respiratory, gastrointestinal, allergic, inflammatory or infectious).

Thanks to all the datas collected, it has been established more precisely the various properties of the plant and some of its mechanisms. However, despite many interesting properties, side effects potentially serious or even fatal were reported. Further investigations, including the extract purification and the active components seem necessary

NOM : CABANEL

PRENOM : Sandrine

TITRE : *Houttuynia cordata* Thunberg, Saururaceae

RESUME en français

Houttuynia cordata Thunberg est une plante médicinale chinoise, appartenant à la famille des Saururacées. Originaires d'Asie du Sud Est, elles sont utilisées depuis de nombreuses années en tant que condiment dans la cuisine locale, en tant que plante ornementale mais aussi pour soigner de nombreuses pathologies (respiratoires, gastro-intestinales, allergiques, inflammatoires ou encore infectieuses).

Grâce à toutes les données qu'on a collectées, on a pu établir plus précisément les différentes propriétés de la plante et certains mécanismes d'action. Néanmoins, malgré des propriétés nombreuses et intéressantes, on a pu constater des effets indésirables, potentiellement graves voire mortels. Des investigations plus poussées, notamment sur la purification de l'extrait et les composés actifs, semblent donc nécessaires.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : *Houttuynia cordata* Thunberg, Saururacées, plante médicinale chinoise, flavonoïdes, houttuynate de sodium, houttuynine, anti-inflammatoire, anti-cancéreux, anti-infectieux

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III
35 chemin des Maraîchers
31 062 Toulouse Cédex 4

Directrice de thèse : Mme HA DANG Thi Bang Tam