

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR
ISABELLE CÔTÉ
B. Sc.

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE CINQ ESPÈCES VÉGÉTALES DE
LA FORÊT BORÉALE CONTRE LES VIRUS INFLUENZA DE TYPE A ET L'HERPÈS
SIMPLEX DE TYPE I

AOÛT 2011

RÉSUMÉ

Les plantes de la forêt boréale ont été longtemps utilisées par les Amérindiens pour traiter diverses infections virales et bactériennes. Cependant, peu d'études ont été réalisées dans le but d'évaluer leur activité biologique, notamment l'activité infectieuse. Le principal objectif de ce projet de recherche était de confirmer l'activité antivirale de plusieurs plantes utilisées par les Amérindiens. Pour atteindre cet objectif, nous avons : (i) développé une méthode pour évaluer l'activité antivirale contre les virus de l'influenza de type A et l'herpès simplex de type 1, (ii) sélectionné des plantes utilisées en médecine traditionnelle amérindienne, (iii) évalué leur activité *in vitro* et (iv) déterminé l'effet des extraits à différents stades de l'infection.

Nous avons sélectionné cinq plantes utilisées pour traiter des infections potentiellement virales comme le rhume ou la grippe : *Achillea millefolium* L., *Cornus canadensis* L., *Trillium erectum* L., *Plantago major* L., et *Trifolium repens* L.. Ces plantes ont été récoltées et extraites selon des méthodes similaires à celles utilisées par les Amérindiens, comme la décoction et l'infusion. L'activité antivirale a été évaluée à différents stades de l'infection soient l'adsorption des virus par les cellules hôtes et la réplication des virus. L'action directe des extraits sur les virus a également été testée. Finalement, la cytotoxicité des extraits a été déterminée sur des fibroblastes de peau humaine en culture.

Les résultats ont montré que la plupart des extraits possédaient une activité modérée contre l'influenza. La plante ayant obtenue la meilleure activité est *Cornus canadensis* avec une inhibition de 16 à 96% (selon le moment de l'infection) à une concentration de 100µg/ml. D'autre part, cette plante a également été trouvée fortement active contre le virus de l'herpès simplex de type 1. Les extraits de feuilles ont non seulement une activité antivirale directe sur le virus ($IC_{50} = 11\mu\text{g/ml}$) mais inhibent aussi sa réplication ($IC_{50} = 44\mu\text{g/ml}$). L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* confirme l'activité antivirale contre le virus de l'influenza de plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle amérindienne et montre pour la première fois une activité contre le virus de l'herpès simplex type 1.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. D'abord, je remercie mon directeur de recherche Jean Legault, qui m'a permis de travailler sur ce sujet passionnant qu'est la virologie. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire d'analyse de l'activité biologique des produits d'origine naturelle qui m'ont permis de traverser cette période d'apprentissage en répondant à mes multiples questionnements et en étant toujours présent pour me supporter dans les étapes plus difficiles. Alors merci à Catherine Dussault, Karl Girard-Lalancette, Line Bouchard et Cindy Tremblay. Merci aussi à toute l'équipe du laboratoire LASEVE, dont fait partie mon codirecteur de recherche André Pichette, qui m'aura aidé dans la portion chimie de mon projet, en particulier Vakhtang Mshvildadze. Évidemment, merci au Fond québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) qui m'a soutenu financièrement en m'offrant une bourse pour réaliser ce projet de 2^e cycle.

Je voudrais remercier également Caroline Gilbert, professeur-chercheur au CHUL à Québec, pour m'avoir offert la possibilité de faire un stage dans son laboratoire. Cette expérience m'a permis d'acquérir des connaissances qu'il m'aurait été impossible d'acquérir sans son aide.

Merci...

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 MISE EN CONTEXTE.....	2
1.2 LE VIRUS DE L'INFLUENZA A	3
1.2.1 <i>Structure du virus et cycle de réplication</i>	3
1.2.2 <i>Traitements et résistances</i>	6
1.3 LE VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX TYPE 1.....	9
1.3.1 <i>Structure du virus et cycle de réplication</i>	9
1.3.2 <i>Traitements et résistances</i>	11
1.4 PROBLÉMATIQUE.....	15
1.5 DESCRIPTION DES PLANTES.....	18
1.6 REVUE DE LITTÉRATURE	20
1.7 OBJECTIFS	23
CHAPTER 2 LA PUBLICATION	24
CHAPTER 3 CONCLUSION.....	59
BIBLIOGRAPHIE	61

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DU VIRUS INFLUENZA DE TYPE A	5
FIGURE 2 : STRUCTURE DES 5 COMPOSÉS ACTIFS CONTRE L'INFLUENZA	7
FIGURE 3 : SCHÉMA DE LA STRUCURE DU VIRUS HSV-1	11
FIGURE 4 : STRUCTURE DES 9 COMPOSÉS ACTIFS CONTRE L'HSV-1	13
FIGURE 5 : PHOTOS DES CINQ PLANTES À L'ÉTUDE.....	19

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU 1 : DESCRIPTION DES 8 TYPES DE VIRUS DE LA FAMILLE HERPES	9
--	---

TABEAU 2 : DIVERSES UTILISATIONS DANS LA MÉDECINE TRADITIONNELLE AMÉRINDIENNE DES CINQ ESPÈCES VÉGÉTALES SÉLECTIONNÉES	18
---	----

Publication

TABEAU 1 : VARIOUS USES BY NATIVE AMERICAN OF THE FIVE SELECTED PLANT	51
---	----

TABEAU 2 : EXTRACTION YIELD (%) AND CYTOTOXICITY OF EXTRACTS FROM A. MILLEFOLIUM, C. CANADENSIS, T. ERECTUM, P. MAJOR AND T. REPENS ON MDCK AND VERO CELL LINES	52
---	----

TABEAU 3 : EXTRACTS ANTIVIRAL EFFECT FROM A. MILLEFOLIUM, C. CANADENSIS, T. ERECTUM, P. MAJOR AND T. REPENS AGAINST INFLUENZA A H1N1 VIRUS	54
---	----

TABEAU 4 : EXTRACTS ANTIVIRAL EFFECT FROM A. MILLEFOLIUM, C. CANADENSIS, T. ERECTUM, P. MAJOR AND T. REPENS AGAINST HSV-1	56
--	----

TABEAU 5 : DETERMINATION OF THE CONCENTRATION REDUCING HSV-1 LYSIS PLAQUES BY 50% OF MORE ACTIVE EXTRACTS.....	58
---	----

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

La forêt boréale constitue un vaste écosystème sur le plan géographique, avec ses quelques 560 000 km² de superficie, et riche sur le plan écologique, avec environ 850 espèces végétales vasculaires (MRNF, 2003). Par contre, cette ressource formidable que constitue la forêt boréale au Québec a été très peu étudiée en ce qui concerne les diverses propriétés curatives des plantes qu'on y retrouve et encore moins pour leurs propriétés antivirales. Pourtant, plusieurs espèces étaient utilisées par les Amérindiens pour traiter diverses infections bactériennes et virales (Moerman, 1998). Les maladies impliquant les virus peuvent avoir d'importants impacts sur la santé mais également sur l'économie. Il y a de plus en plus d'évidences quant à l'émergence de résistances face aux antiviraux actuellement utilisés en clinique. La découverte de nouveaux composés actifs est très importante afin de développer de nouveaux agents antiviraux et de lutter contre les phénomènes de résistance. La recherche de nouveaux antiviraux dans les plantes est avantageuse et prometteuse en raison de leur accessibilité et de leur diversité mais aussi en raison de leur utilisation dans la médecine traditionnelle amérindienne. Cette étude portera donc sur l'évaluation de l'activité antivirale de cinq espèces végétales (*Achillea millefolium* L., *Trillium erectum* L., *Trifolium repens* L., *Cornus canadensis* L. et *Plantago major* L.) contre l'influenza et l'herpès simplex type 1. Ces plantes ont été sélectionnées en raison de leur utilisation par les Amérindiens pour traiter la toux, le rhume, la grippe ou la fièvre ce qui suggère une activité antivirale.

1.2 Virus de l'influenza A et les traitements disponibles

1.2.1 Structure du virus et cycle de réplication

L'influenza est un virus enveloppé de la famille des Orthomyxoviridae. Il en existe 3 types :

- (i) le type A comprend 8 molécules d'ARN simple brin et peut infecter l'humain, le porc, le cheval, les oiseaux et les animaux marins, il est responsable des pandémies,
- (ii) le type B comprend également 8 segments d'ARN mais ne peut infecter que l'humain,
- (iii) le type C comprend seulement 7 segments d'ARN et peut infecter l'humain et le porc (Shors, 2009).

L'enveloppe de ce virus est recouverte de spicules constitués de l'association de deux protéines : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (Schaechter et al., 1999) (voir figure 1). Le virus influenza de type A peut être divisé en plusieurs sous-types selon les antigènes de surface qu'il porte, c'est-à-dire selon le type d'HA et de NA. À ce jour, il y a 15 sous-types d'HA (H1-H15) et 9 sous-types de NA (N1-N9) qui ont été découverts. Le génome du type A produit au moins 10 protéines et chaque segment d'ARN est entouré de nucléoprotéines, ce qui forme un complexe. Les huit complexes sont entourés d'une coquille composée de protéines de matrice M1 qui est elle-même enveloppée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte, c'est cette couche qu'on appelle l'enveloppe et qui contient l'HA et la NA. Une troisième protéine, appelée M2, fait partie de la membrane et forme les canaux ioniques (Cox et al., 2004).

L'infection des cellules hôtes commence par l'attachement de l'HA à l'acide sialique qui est couplé aux glycoprotéines ou aux glycolipides de la membrane cellulaire (Beigel and Bray, 2008). Les virus sont ensuite intégrés dans des endosomes qui, grâce à leur pH acide, permettent l'ouverture des canaux ioniques M2. Il y a donc une entrée d'ions hydrogène dans le virion, ce qui provoque la décapsidation, libérant la nucléocapside dans le cytoplasme (Stiver, 2003). Le génome viral est ensuite transporté dans le noyau de la cellule hôte où il y a réplication de son ARN. Une partie des nouveaux brins d'ARN produits se déplacent vers le cytoplasme où ils sont transcrits par les ribosomes de l'hôte en protéines alors qu'une autre partie s'associe avec les protéines de matrice M1 pour former les nouveaux virus (Beigel and Bray, 2008). Ce processus est toutefois inhabituel car le génome des virus à ARN est généralement répliqué dans le cytoplasme. Une fois synthétisées, les protéines HA, NA et M2 entrent dans le réticulum endoplasmique où elles sont pliées et glycosylées. Elles sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi puis vers la surface cellulaire où les virions sont assemblés et relâchés par bourgeonnement (Shors, 2009). À cette étape, la NA est nécessaire car elle clive l'acide sialique du galactose de la glycoprotéine ou du glycolipide, permettant ainsi le relâchement des nouveaux virions. Si cette protéine est inhibée (la NA), les virions s'agglutinent et ont un pouvoir infectieux diminué (Beigel and Bray, 2008).

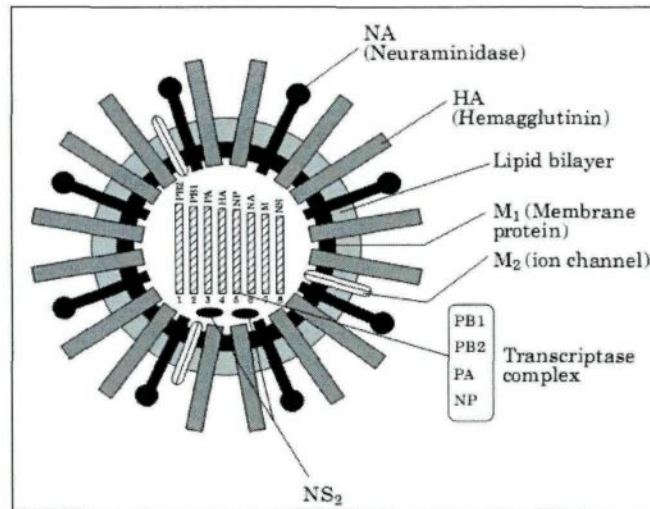


Figure 1: Schéma de la structure du virus influenza de type A (de Jong et al., 2000)

Le virus de l'influenza subit sans cesse des changements antigéniques et ce, de deux façons : la dérive antigénique (« antigenic drift ») et la substitution antigénique (« antigenic shift »). La dérive est le phénomène par lequel des mutations s'accumulent dans le génome. Les mutations sont causées par des erreurs de la polymérase ARN-dépendante, qui ne possède pas la capacité de corriger les erreurs (« proofreading ability »). Ce phénomène est responsable de l'arrivée de nouvelles souches à chaque année. La substitution est un phénomène moins fréquent qui survient lorsque le virus présentement en circulation disparaît pour laisser sa place à un nouveau sous-type portant à sa surface de nouvelles glycoprotéines. Il est intéressant de mentionner qu'il y a toujours une nouvelle HA alors que la NA n'est pas toujours modifiée. Les personnes infectées ne possèdent habituellement aucune immunité contre ce nouveau virus (Cox et al., 2004).

1.2.2 Traitements et résistances

Actuellement, le meilleur traitement contre l'influenza est un moyen préventif : les vaccins. Ils permettent de réduire le nombre de cas d'infections à l'influenza mais aussi de diminuer les complications qui peuvent nuire grandement à la santé des personnes à risques. Cependant, ils ne peuvent contrer 100% des infections. Lorsque l'infection survient, un traitement antiviral peut parfois être nécessaire si les symptômes sont trop importants.

Quatre agents antiviraux ont été approuvés par la FDA pour lutter contre l'influenza : l'amantadine, la rimantadine, l'oseltamivir et le zanamivir (Sugrue et al., 2008) (voir figure 2). L'amantadine a été approuvée en 1976 et est active contre le type A. Cet antiviral se lie à la protéine M2, ce qui bloque l'ouverture du canal ionique et empêche ainsi la décapsidation des virus. Il entraîne par contre plusieurs effets secondaires comme des étourdissements, de l'insomnie et des nausées. Des études démontrent aussi que le virus développe rapidement une résistance à cette drogue. Pour cette raison, il est suggéré de faire usage de celle-ci en cas de pandémie seulement. La rimantadine agit de la même façon sauf qu'elle engendre moins d'effets secondaires. L'oseltamivir et le zanamivir sont deux inhibiteurs de la NA. En ciblant le site actif de cette protéine, ils empêchent celle-ci de cliver l'acide sialique et interfèrent donc dans le relâchement des virus (lors du bourgeonnement). Ils sont tous deux actifs contre les types A et B. Le zanamivir peut être administré uniquement par inhalation en raison de sa faible biodisponibilité, ce qui peut

causer des complications respiratoires, alors que l'oseltamivir est administré oralement. L'apparition d'une résistance au zanamivir n'a jamais été observée. Cependant, il est très peu utilisé. Une résistance à l'oseltamivir commence par contre à apparaître. Une cinquième drogue est également capable d'inhiber la réplication du virus de l'influenza, la ribavirine. Cet antiviral est un analogue nucléosidique qui interfère avec la duplication de l'ADN ou de l'ARN. *In vitro*, une activité contre les types A et B a été observée mais les études cliniques n'ont donné aucun résultats notoire. Cette drogue n'a pas été approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) des États-Unis.

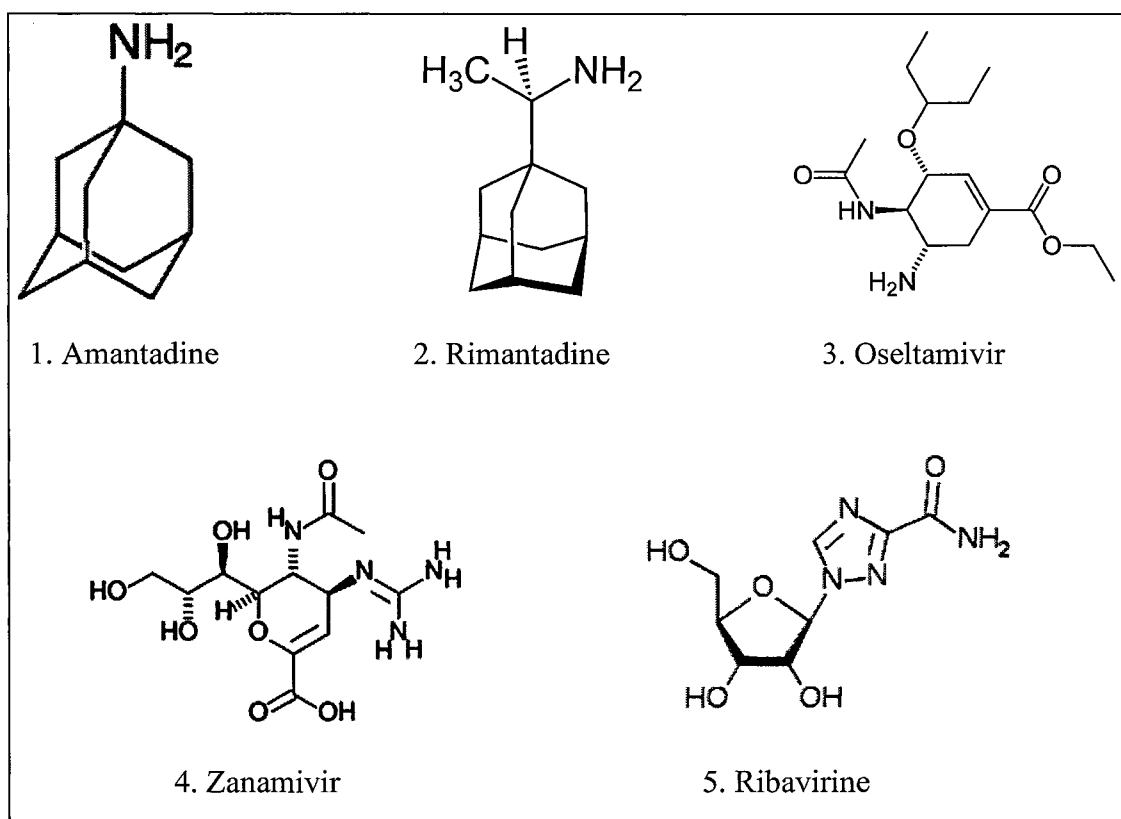


Figure 2 : Structure des 5 composés actifs contre l'influenza

L'oseltamivir, commercialisé sous le nom de Tamiflu par Roche, est l'antiviral le plus utilisé présentement. Il est synthétisé à partir de l'acide shikimique, un composé ne présentant aucune activité antivirale. L'acide shikimique est présent, entre autres, dans les aiguilles de *Pinus banksiana* (pin gris) (Sarkar and Malhotra, 1979) et de *Abies balsamea* (Sapin baumier) (Li et al., 2007). On retrouve aussi ce composé dans la pelure, la pulpe et les feuilles de *Ficus carica* (Figuier commun) (Oliveira et al., 2009). Initialement, l'acide shikimique a été isolé des fruits de *Illicium verum*, une plante chinoise, mais ce composé se retrouve dans toutes les plantes du genre *Illicium* (qui comprend 42 espèces). Ces plantes proviennent de l'Asie, de l'Amérique du Nord et des Antilles. Il est aussi le précurseur des polyphénols. L'acide shikimique peut également être produite par biofermentation d'une souche d'*Escherichia coli* dont le gène de la shikimate kinase est déficient. La voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques est donc bloquée après la production d'acide shikimique (Krämer et al., 2003).

1.3 Le virus herpès simplex type I (feux sauvages)

1.3.1 Structure du virus et cycle de réplication

Pour ce qui est de l'herpès simplex, il fait parti de la famille des Herpesviridae qui comprend 8 types différents (Sacks, 2010) :

Tableau 1 : Description des 8 types de virus de la famille Herpes

Type	Description
1	connu sous le nom de virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), il est responsable des boutons de fièvre autour de la bouche (feux sauvages)
2	connu sous le nom de virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2), il cause l'herpès génital
3	aussi appelé virus de la varicelle et du zona, il est responsable de la varicelle
4	aussi connu sous le nom de <i>virus d'Epstein-Barr</i> , il est la principale cause de mononucléose infectieuse
5	il est le nom homologué du <i>cytomegalovirus</i> , il provoque aussi la mononucléose
6	il provoque la roséole
7	étroitement lié au type 6, il provoque lui aussi la roséole
8	Retrouvé dans les tumeurs appelées sarcome de Kaposi, ces tumeurs se trouvent chez les personnes atteintes du SIDA, il peut aussi provoquer d'autres cancers

Le génome du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) est de l'ADN bicaténaire linéaire constitué de 152 000 paires de bases qui codent pour 84 protéines. La capside entourant le génome est icosaédrique et possède 162 capsomères (voir figure 2). Le tout est enveloppé d'une bicouche lipidique, ce qui donne à la particule virale une taille de 120 à 200 nm (Hureaux, 2003). La

réplication de ce virus se fait par un cycle lytique qui débute avec l'attachement des particules virales aux cellules sensibles. Les virions se fixent aux récepteurs cellulaires par l'intermédiaire des glycoprotéines de l'enveloppe, soient gC et gD, qui forment des projections hors de l'enveloppe virale. Par la suite, les glycoprotéines gB, gH et gL permettent la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire et ainsi le relâchement dans le cytoplasme de la nucléocapside et des protéines tégmentaires. Ces dernières entraînent l'interruption de la synthèse protéique de la cellule. La nucléocapside virale est ensuite transportée jusqu'au noyau par le cytosquelette où les processus viraux de synthèse sont orchestrés pour aboutir à la production de nouveaux virions (Hureaux, 2003; Schaechter et al., 1999). L'enveloppe est acquise par bourgeonnement à l'intérieur d'une vésicule contenant des glycoprotéines avant l'exocytose (Shors, 2009). Les cellules épithéliales dans lesquelles les virus se multiplient finissent par être lysées, libérant de nouveaux virus qui peuvent infecter les cellules saines à proximité. Après la première infection, le HSV reste latent dans des ganglions sensitifs (dans le cas de HSV-1, dans les ganglions de Gasser, qui sont les ganglions du nerf trijumeau). Le virus peut se manifester de nouveau dans la même région par une réactivation virale induite ou favorisée par des facteurs psychologiques comme le stress, des facteurs physiques comme les UV ou des facteurs immunitaires comme dans le cas d'une immunodéficience (Fleury, 2002).

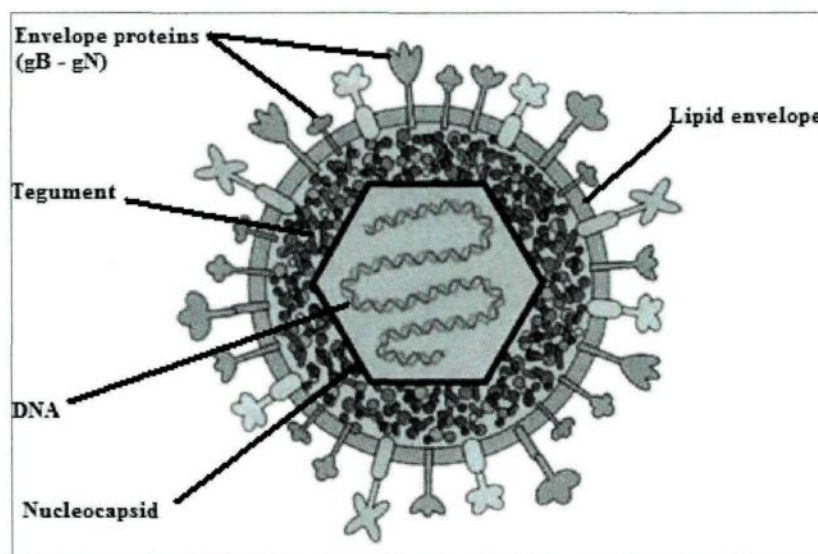


Figure 3 : Schéma de la structure du virus HSV-1
(<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/hsv1struc.jpg>)

1.3.2 Traitements et résistances

Il existe plusieurs antiviraux ayant une action contre les virus de l'herpès (voir figure 4). Au cours des années 1950, l'idoxuridine et le trifluridine sont les premiers agents antiviraux qui ont été développés topiquement. Par contre, en raison de leur faible sélectivité pour les cellules infectées, ils sont utilisés uniquement comme traitements topiques pour éviter une toxicité pour le reste de l'organisme (Superti et al., 2008). Les deux composés sont des analogues d'un nucléoside, soit l'uridine. L'idoxuridine est incorporé dans la chaîne d'ADN lors de la réplication et l'atome d'iode empêche l'appariement des paires de base alors que le trifluridine inhibe la conversion des

désoxyuridines monophosphates (dUMP) en désoxythymidines monophosphates (dTMP) par la thymidylate synthase, ce qui entraîne l'inhibition de l'élongation de la chaîne d'ADN (De Clercq, 2004; Superti et al., 2008). Dans les années 1980, un premier traitement systémique pour traiter les encéphalites herpétiques a été développé, soit la vidarabine. Ce composé est un analogue de l'adénosine (Greco et al., 2007).

Actuellement, il existe trois classes d'antiviraux qui sont couramment utilisés pour traiter des infections à différents types d'herpès et qui ciblent toutes la réplication de l'ADN virale :

- (i) les analogues de la guanosine acycliques : comprend l'acyclovir (ACV) et le penciclovir ainsi que leur prodrogue respective, soit le valacyclovir et le famciclovir (utilisés contre HSV-1, HSV-2 et virus de la varicelle et du zona)
- (ii) les analogues de nucléoside acycliques, qui est représentée, entre autres, par le cidofovir (utilisé contre le cytomégalovirus)
- (iii) l'analogue du pyrophosphate, qui est représentée par le foscarnet (utilisé contre HSV-1, HSV-2 et cytomégalovirus) (Greco et al., 2007).

Cependant, le seul traitement topique contre l'herpès labial approuvé actuellement par la FDA et disponible sans prescription est le docosanol (commercialisé sous le nom de *Abreva*) (Treister and Woo, 2010). Cet antiviral possède un mécanisme d'action unique si

on le compare aux autres antiviraux puisqu'il empêche le virus de l'herpès de fusionner avec la membrane plasmique des cellules hôtes, empêchant ainsi la propagation du virus d'une cellule à l'autre (Pope et al., 1998).

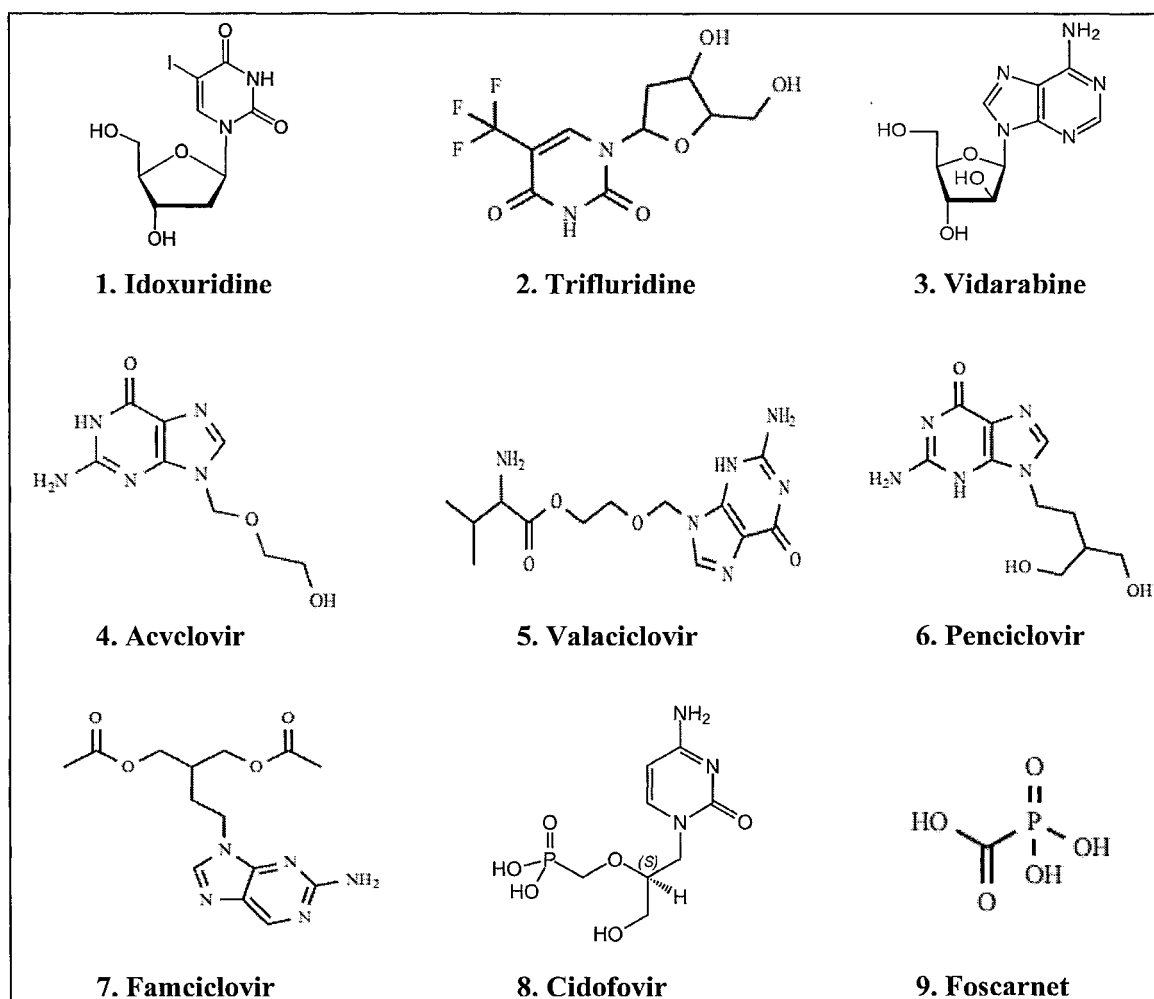


Figure 4 : Structure des 9 composés actifs contre l'HSV-1

L'antiviral le plus fréquemment utilisé est l'ACV (voir figure 5). À l'intérieur d'une cellule infectée, cette drogue est phosphorylée par la thymidine kinase (TK) virale. Par des

phosphorylations successives orchestrées par les enzymes cellulaires, l'ACV monophosphate est transformée en ACV triphosphate, un compétiteur du dGTP, un nucléotide naturel. L'incorporation de l'ACV triphosphate dans la chaîne d'ADN virale entraîne l'inhibition de l'ADN polymérase virale, et donc de l'élongation de cette chaîne d'ADN (Bacon et al., 2003). Le valaciclovir, le penciclovir et le famciclovir agissent de la même façon mais possèdent une sélectivité plus ou moins grande pour chacune des enzymes et une biodisponibilité variable. Les prodrogues ont été développées pour augmenter la disponibilité de ces drogues administrées oralement. Il existe cependant des résistances à l'ACV. Chez les personnes immunocompétentes, 0,4% des souches isolées sont résistantes à l'ACV alors que chez les personnes immunosupprimées, qui peuvent utiliser le traitement sur une longue période, ce pourcentage grimpe à 5% (Field, 2001). Le foscarnet, quant à lui, est un inhibiteur de l'ADN polymérase. Celui-ci inhibe la liaison entre l'enzyme et le pyrophosphate lors du processus de polymérisation de l'ADN. Comme il n'a pas besoin d'être activé par la TK, il conserve son effet antiviral contre les souches résistantes à l'ACV qui ont perdu leur activité TK. Il est donc une alternative intéressante pour traiter des cas de résistances (Superti et al., 2008).

1.4 Problématique

Les infections virales causées par l'influenza et l'herpès sont très fréquentes. Pour la saison grippale de 2008-2009, il y a eu au Québec 3898 cas d'influenza de type A confirmés et 1415 cas d'influenza de type B (MSSS, 2009). La plupart des personnes atteintes vont retrouver la santé sans l'aide de médication. Cependant, pour les personnes âgées, les enfants et les malades chroniques, cette infection peut mener à des complications telles la pneumonie ou même la mort (WHO, 2010). Les antiviraux sont donc essentiels dans certains cas. Par contre, leur utilisation augmente le risque de voir apparaître des résistances. Par exemple, 100% des souches d'influenza de sous-type A/H1N1 et A/H3N2 étaient résistantes à l'amantadine au Canada en 2008-2009. Pour ce qui est des résistances à l'oseltamivir, elles touchent seulement les sous-types A/H1N1 (MSSS, 2009). Il y a donc une proportion importante de souches résistantes qui sont présentement en circulation.

Pour ce qui est du virus HSV-1, il est également très présent dans la population. Par exemple, en Ontario, 55% des adolescents âgés entre 15 et 16 ans sont porteurs d'anticorps anti-HSV-1, ce qui veut dire qu'ils ont déjà été en contact avec ce virus au cours de leur vie. Chez les adultes dans le début de la quarantaine, le pourcentage de porteurs d'anticorps grimpe à 89% (Howard et al., 2003). Ces pourcentages de séroprévalence sont représentatifs des taux retrouvés ailleurs dans le monde (Smith and Robinson, 2002). Les antiviraux actifs contre HSV-1 ne permettent pas, jusqu'à ce jour, d'éliminer complètement le virus de l'organisme en raison de la phase de latence. Des résistances à ces antiviraux

font aussi leur apparition, en particulier face à l'ACV, qui est l'un des plus utilisés. De toutes les souches isolées chez des personnes immunocompétentes, 0,4% étaient résistantes à l'ACV alors que chez les personnes immunosupprimées, c'est environ 5% des souches. La TK virale ainsi que l'ADN polymérase sont les deux enzymes qui peuvent être responsables de la résistance. Actuellement, 95-96% des cas de résistances à l'ACV sont dus à une activité TK réduite ou complètement absente (Bacon et al., 2003). Il est donc important de développer des antiviraux ayant de nouveaux mécanismes d'action afin de vaincre les résistances.

Les composés d'origine naturelle sont une source importante de médicaments. Effectivement, selon l'étude de Newman et Cragg (2007), près de 50% des nouveaux médicaments lancés entre 1981 et 2006 tirent leur origine de produits naturels. Il est donc judicieux de poursuivre les recherches de nouveaux composés actifs dans la forêt boréale québécoise puisque celle-ci représente une ressource importante et surtout quasi inexplorée pour son potentielle médicinale. De plus, les Amérindiens ont utilisé fort longtemps les plantes de cette forêt pour soigner la grippe, le rhume, la fièvre et bien d'autres infections (Moerman, 1998). Leur expérience et leurs connaissances des plantes constituent un point de départ intéressant pour orienter judicieusement le choix des végétaux. D'ailleurs, les cinq végétaux sélectionnés pour cette étude étaient utilisées pour traiter des symptômes de rhume ou de grippe tels que la toux et la fièvre qui pourraient être causés par une infection virale. Le tableau 2 présente l'utilisation en médecine traditionnelle des cinq plantes que nous avons sélectionnées ainsi que leur méthode de préparation.

Tableau 2 : Utilisations en médecine traditionnelle amérindienne des cinq espèces végétales sélectionnées

Espèce (Nom commun)	Partie de la plante	Tribu	Utilisation
<i>Achillea millefolium</i> L. (Achillée millefeuille)	Feuille, fleur, racine et plante entière	Abnaki, Carrier, Cheyenne, Klallam, Miwok, Okanagan, Paiute, Thompson, Hesquiat, Cherokee, Cree, Woodlands, Flathead, Iroquois, Menominee, Montagnais, Ojibwa et Quileute	Infusion, décoction et cataplasme des parties de plante : toux, rhume, grippe et fièvre (Barrett and Gifford, 1933; Gunther and Janish, 1973; Hart, 1992; Hart, 1981; Park and Fowler, 1989; Rousseau, 1947; Smith, 1929; Turner, 1990; Turner et al., 1980; Turner and Efrat, 1982)
<i>Cornus canadensis</i> L. (Cornouiller du Canada)	Tige et plante entière	Algonquin, Tete-de-Boule, Iroquois et Costanoan	Décoction : toux, rhume et fièvre (Herrick, 1977; Raymond, 1945)
<i>Trillium erectum</i> L. (Trille rouge)	Sans indication	Cherokee	Toux (Hamel and Chiltoskey, 1975)
<i>Plantago major</i> L. (Plantain majeur)	Racine et plante entière	Carrier, Costanoan et Rappahannock	Décoction et cataplasme : toux et fièvre (Carrier Linguistic Committee, 1973)
<i>Trifolium repens</i> L. (Trèfle blanc)	Feuille séchée et plante entière	Mohegan et Cherokee	Infusion : rhume et toux (Tantaquidgeon, 1928; 1972)

1.5 Description des plantes

Les cinq plantes sélectionnées pour ce projet sont présentes dans la forêt boréale québécoise. Une description sommaire des plantes est présentée ici suivi d'une photo de chacune de ces plantes (voir figure 5) (Marie-Victorin, 1995). L'*Achillea millefolium*, ou Achillée millefeuille, est une plante vivace de la famille des Composées. D'une hauteur de 30 à 60cm, elle possède des fleurs généralement blanches, mais des colonies à fleurs roses ou violettes ne sont pas rares. Elle pousse dans les champs et dans les lieux secs et on la retrouve partout dans le Québec. Le *Cornus canadensis*, ou Cornouiller du Canada, est une plante herbacée de la famille des Cornacées. Sa tige, haut de 7 à 20cm, porte au sommet un verticille de six feuilles et une fleur verdâtre. Son fruit rouge vif et globuleux est comestible. Les rameaux stériles ne portent généralement pas plus de quatre feuilles. Le *Plantago major*, ou Plantain majeur, est une plante acaule de la famille des Plantaginacées. Les épis peuvent atteindre 50cm de haut. Cette espèce est très variable dans sa taille, la forme de ses feuilles et la forme de l'épi. Le plantain fleuri au moins deux saisons (plante pérenne). Il est naturalisé de l'Eurasie sur tout le globe et on le retrouve dans tout le Québec. Le *Trifolium repens*, ou Trèfle blanc, est une plante vivace de la famille des Légumineuses. D'une hauteur de 10 à 40cm, ses fleurs sont blanches ou lavées de rose. Il est cultivé partout et naturalisé dans tous les lieux habités. Il est originaire de l'Eurasie. Finalement, le *Trillium erectum*, ou Trille dressé, est une plante de la famille des Liliacées. Sa tige peut atteindre de 20 à 40cm et porte au sommet trois feuilles ainsi qu'une fleur

rouge foncé. Ses fruits sont des baies ovoïdes d'un pourpre plus ou moins noirâtre. Elle se retrouve au Québec en général, sauf dans les parties froides du nord-est.

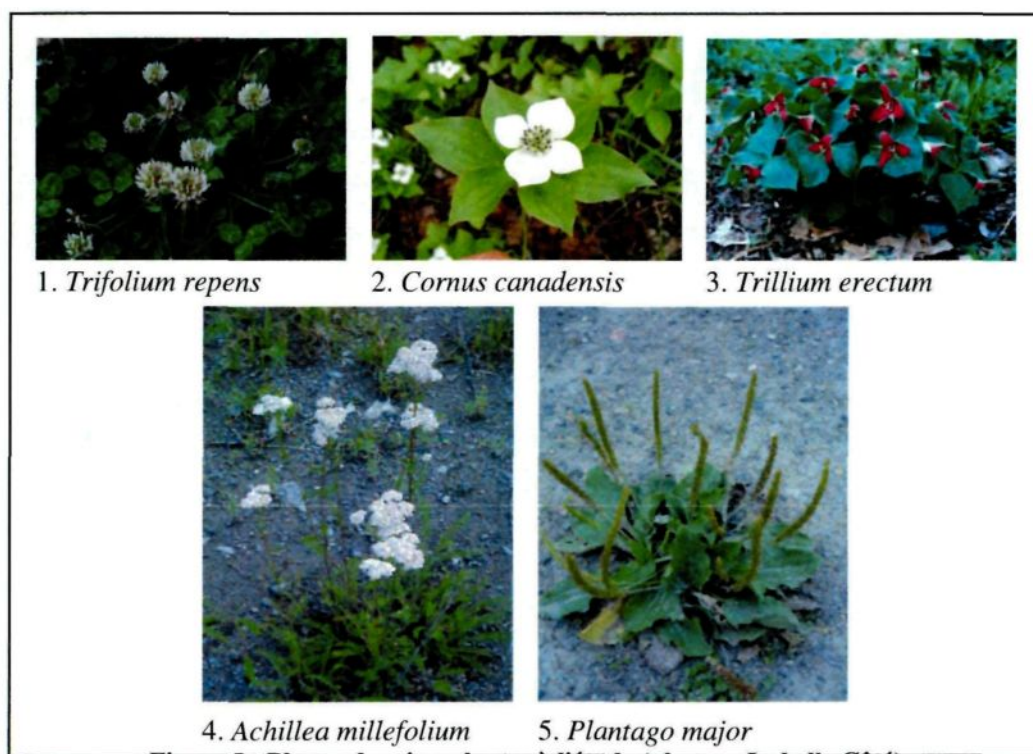


Figure 5 : Photos des cinq plantes à l'étude (photos : Isabelle Côté)

1.6 Revue de littérature

Dans cette étude, une revue de littérature a été effectuée sur les cinq plantes sélectionnées. Parmi celles-ci, plusieurs ont été évaluées pour leur activité biologique. Premièrement, il a été observé que des extraits aqueux de *Trifolium repens* possèdent une activité antioxydante (« superoxide anion radical scavenging activity ») (Al-Mamun et al., 2007). À notre connaissance, aucune autre activité n'a été rapportée pour cette plante. Pour ce qui est de *Trillium erectum*, Yokosuka and Mimaki (2008) ont isolés 7 glycosides stéroïdiens provenant d'un extrait au méthanol qui possèdent une activité cytotoxique contre des cellules leucémiques humaines HL-60 (IC₅₀ entre 1,68 et 8,85µg/ml). À notre connaissance, c'est cependant la seule activité biologique rapportée à ce jour.

Dans le cas d'*Achillea millefolium*, la plusieurs activités biologiques ont été observés. Elle possède une activité antibactérienne contre *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* et *Streptococcus pneumoniae* (Candan et al., 2003; Mahady et al., 2005; Stojanovic et al., 2005; Frey and Meyers, 2010). Stojanovic et al. (2005) ont aussi montré l'activité antifongique de l'achillée contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Elle possède également une activité antioxydante (Candan et al., 2003; Kintzios et al.), anti-inflammatoire (Benedek and Kopp, 2007; Goldberg et al., 1969), antinociceptive (Pires et al., 2009) et antifertilité (Takzare et al., 2010). De plus, plusieurs groupes de recherche ont rapporté qu'*Achillea millefolium*

possède des propriétés : protectrice contre les lésions gastriques chroniques (Cavalcanti et al., 2006), antiulcérogène (Potrich et al., 2010), hépatoprotectrice (Yaeesh et al., 2006), cholérétique (Benedek et al., 2006) et antidiarrhéique (Babaei et al., 2007). Finalement, *Achillea millefolium* a aussi montré une activité cytotoxique *in vitro* contre les cellules cancéreuses humaines du foie HA22T/VGH (Lin et al., 2002), les cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa et les cellules cancéreuses du sein MCF-7 (Csupor-Loffler et al., 2009) ainsi qu'une activité antitumorale *in vivo* sur un modèle de souris porteuses de leucémie P-388 (Tozyo et al., 1994).

Pour ce qui est de *Plantago major*, plusieurs études ont déjà montré les effets de cette plante. Elle posséderait en effet une activité anti-inflammatoire (Beara et al., 2010; Shipochliev et al., 1981; Turel et al., 2009), une activité antioxydante (Beara et al., 2009; Bolshakova et al., 1998) et une activité antigiardiasique (Ponce et al., 1994). Des extraits au méthanol du plantain majeur auraient également une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses MCF-7 (adénocarcinome du sein humain) et UACC-62 (mélanome humain) (Galvez et al., 2003). L'étude de Velasco-Lezama et al. (2006) a aussi permis d'observer que des extraits aqueux et au méthanol de *Plantago major* avaient une activité hématopoïétique autant dans une culture de moelle osseuse que dans une culture de rate. Ils ont aussi montré que ces mêmes extraits inhibaient la croissance de *Bacillus subtilis* et que des extraits au chloroforme et à l'hexane inhibaient une partie de la croissance d'*Escherichia coli*. Une dernière étude menée à Taiwan, soit celle de Chiang et al. (2002), a évalué l'activité antivirale d'extrait aqueux de plantain contre le virus de l'HSV-1. L'extrait

n'a pas montré d'activité antivirale significative. Cependant, trois composés purs (baicaléine, acide caféique et acide chlorogénique) isolés à partir de cet extrait ont induit une diminution de 50% des effets cytopathiques causés par le virus. L'activité antivirale de cette plante contre le HSV-1 a donc déjà été partiellement étudiée. Cependant, le plantain majeur issu du Québec n'a jamais été étudié.

Finalement, pour ce qui est de *Cornus canadensis*, aucune activité biologique n'a été rapportée. De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'activité antivirale d'extraits aqueux ou éthanolique de ces plantes, à l'exception de *Plantago major*.

1.7 Objectifs

Le principal objectif de ce projet de recherche visait à confirmer *in vitro* l'activité antivirale de plusieurs plantes utilisées par les Amérindiens. Pour atteindre cet objectif, nous avons : (1) développé une méthode pour évaluer l'activité antivirale contre les virus de l'influenza de type A et l'HSV-1, (2) sélectionné des plantes utilisées en médecine traditionnelle amérindienne et évalué leur activité et (3) déterminé l'effet des extraits à différents stades de l'infection.

CHAPITRE 2
PUBLICATION

Résumé

Plusieurs plantes de la forêt boréale ont été utilisées par les Amérindiens pour traiter une grande variété d'infections virales et microbiennes. Cependant, l'activité antivirale de ces plantes n'a jamais été étudiée *in vitro* sur des modèles cellulaires afin de valider leur efficacité. Dans cette étude, cinq plantes ont été sélectionnées en raison de leur utilisation dans la médecine traditionnelle amérindienne pour traiter des symptômes de l'influenza tels que le rhume, la toux et la fièvre : *Achillea millefolium* L., *Cornus canadensis* L., *Trillium erectum* L., *Plantago major* L. et *Trifolium repens* L.. Ces plantes ont été extraites par décoction et par infusion en utilisant de l'eau, un mélange éthanol/eau et de l'éthanol pour obtenir un produit similaire à celui utilisé par les Amérindiens. L'effet des extraits contre le virus influenza A (H1N1) a été testé à différentes étapes de l'infection afin de voir l'effet direct sur le virus, au moment de l'adsorption et de la réplication du virus sur les cellules MDCK. Les résultats montrent que toutes les plantes possèdent une activité antivirale faible à modérée contre l'influenza. Le *C. canadensis* présente la plus grande activité avec une inhibition de l'infection de 77% à une concentration de 100 µg/ml. De plus, l'activité antivirale des extraits a aussi été testée contre le virus de l'herpès simplex type 1 (HSV-1). La plupart des extraits de *T. erectum*, *P. major* et *T. repens* n'ont pu protéger les cellules VERO contre l'infection. Par contre, les fleurs et les feuilles de *C. canadensis* en décoction dans l'eau ainsi que l'infusion des feuilles dans le mélange éthanol/eau sont les extraits les plus actifs pour inhiber l'adsorption du virus avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre 9 et 10 µg/ml. Pour ce qui est de l'inhibition de la réplication du virus HSV-1, les extraits de *C.*

canadensis montrent aussi une forte activité avec des valeurs d'IC₅₀ variant de 44 à 69 µg/ml. Finalement, la décoction des feuilles d'*A. millefolium* dans le mélange éthanol/eau a été l'extrait le plus actif pour inhiber directement le virus HSV-1 avec une valeur d'IC₅₀ de $4,8 \pm 0,6$ µg/ml. Tous ces résultats supportent donc l'activité antivirale de ces plantes utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne.

Antiviral Activities of Five Boreal Forest Plants against Influenza A H1N1 and Herpes Simplex Virus Type-1

Isabelle Côté, André Pichette and Jean Legault

Affiliation

Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi (Québec),

Correspondence

Dr. Jean Legault, Université du Québec à Chicoutimi, 555 Boulevard de l'Université,
Chicoutimi (Québec) G7H 2B1 Canada

Phone : +1-418-545-5011, Fax : +1-418-545-5012, E-mail : Jean.Legault@uqac.ca

ABSTRACT

Many plants of Quebec's boreal forest are used by Native American to treat a variety of microbial and viral infections. However, plants antiviral activity has been seldom evaluated on cellular models to validate their *in vitro* efficiency. In this study, five plants used in American Native traditional medicine to treat influenza symptoms such as cold, cough and fever have been selected: *Achillea millefolium* L., *Cornus canadensis* L., *Trillium erectum* L., *Plantago major* L. and *Trifolium repens* L. The plants were extracted by decoction and infusion with water, water/ethanol and ethanol to obtain similar extracts used by Native American. The effects of extracts were tested on influenza A (H1N1) at different course of the infection including direct effect on the virus, adsorption and virus replication on MCDK cells. Results showed that all plants tested possess a weak to moderate antiviral activity against influenza. *C. canadensis* exhibited the highest antiviral activity, with an inhibition of infection about 77% at a concentration of 100 µg/ml. Additionally, extracts antiviral activity on herpes simplex type-1 (HSV-1) were also tested. Most of extracts of *T. erectum*, *P. major* and *T. repens* were inactive to protect VERO cells against infection. Water decoction of *C. canadensis* flower and leaf thus water/ethanol infusion of leaf were the most active extracts to inhibit virus adsorption with IC₅₀ values ranging from 9 to 10 µg/ml. For inhibition of HSV-1 replication, *C. canadensis* extracts exhibited also the higher activity with IC₅₀ values ranging from 44 to 69 µg/ml. Finally, water/ethanol decoction of *A. millefolium* leaf was found the most active extract to inhibit directly HSV-1 with an IC₅₀

value of $4.8 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$. Altogether, the results presented in this work support antiviral activity of some plants used in Native American traditional medicine.

1. Introduction

Flu is an acute respiratory infectious disease induced by influenza viruses and influenza itself is a worldwide major cause of morbidity and mortality. It is estimated that infection with seasonal strains of influenza virus results in the death of over 50 000 people per year (Thompson *et al.*, 2003). Influenza viruses have eight negative-sense RNA segments encoding for eleven different proteins and are classified into three subtypes: A, B and C (Palese and Shaw, 2007; Kilbourne, 1987). Influenza A viruses are divided into subtypes based on differences in two viral surface proteins named hemagglutinin or H protein (16 different subtypes) and neuraminidase or N protein (9 different subtypes) (Han and Marasco, 2011). Influenza A H1N1 subtypes caused two pandemics in 1918 (50-100 million death worldwide) and 2009 (Johnson and Mueller, 2002; Han and Marasco, 2011). Some synthetic drugs are active against influenza viruses such as zanamivir, oseltamivir and rimantadine. However, these drugs possess some side-effects and can also induce resistance (Moscona, 2005) and new antiviral agents must be found.

Plants are an important source of biologically active compounds. About 27% of all new active substances discovered between 1981 and 2006 are natural products or are derived from natural products (Newman and Cragg, 2007). Herbal remedies are often the therapeutic choices to cure influenza in China, Korea, Japan and India (Gao *et al.*, 2002). Some plant extracts used in traditional Chinese medicine possess anti-influenza activity (Wang *et al.*, 2006). The Native Americans have also used plants to treat a variety of

infections (Moerman, 1998). Unlike the Chinese plant extracts, very few studies have been conducted on the boreal forest plants with a potential antiviral activity. Indeed, the Quebec boreal forest (Canada) contains about 850 vascular plants species and some were used to treat various infections (Moerman, 1998). Five small plants used by Native Americans to treat influenza symptoms as cold, cough and fever have been selected: *Achillea millefolium* (yarrow) (Barrett and Gifford, 1933; Gunther and Janish, 1973; Hart, 1992; Hart, 1981; Rousseau, 1947; Smith, 1929; Turner, 1990; Turner *et al.*, 1980), *Cornus canadensis* (bunchberry) (Herrick, 1977; Raymond, 1945), *Trillium erectum* (red trillium) (Hamel and Chiltoskey, 1975), *Plantago major* (common plantain) (Carrier Linguistic Committee, 1973) and *Trifolium repens* (white clover) (Tantaquidgeon, 1928; 1972). All these plants are taken in water, alcohol decoction and infusion. In spite of the use of these five plants in Native Americans traditional medicine, no study was carried out to support their use. In the present work, antiviral activities of some plant extracts were investigated against influenza A H1N1 and herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infections.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture and viruses

Mardin-Darby canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL-34) and African green monkey kidney cells (Vero, ATCC CCL-81) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). The two cell lines were grown in *Eagle's minimal essential medium* (MEM) (Mediatech Cellgro, VA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, USA), penicillin (100 IU) and streptomycin (100 µg/ml) (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂. The maintenance medium for MDCK was MEM supplemented with TPCK trypsin (2 µg/ml), glucose (2 mg/ml), bovine serum albumin (1 mg/ml), penicillin (100 IU) and streptomycin (100 µg/ml). The maintenance medium components for VERO are similar to growth medium excepted that they contain only 2% of FBS. Influenza (ATCC VR-1469) stocks were propagated in MDCK cells and HSV-1 (ATCC VR-733) stocks were propagated in Vero cells. Viruses were stored at -80°C before further analysis. The virus titer was determined by plaque assay (Russell, 1962).

2.2 Plants collection and extraction

All plants specimens were harvested between May and July 2008 in the Simoncouche forest of the *Réserve faunique des Laurentides*, Quebec (48° 13' 59" N - 71° 14' 59" W),

Canada. Leaves, flowers and stems were separated, dried at room temperature before been powdered. To imitate the classical uses of the Native Americans, two types of extraction were performed. Firstly, plant powder (10 g) was boiled in 100 ml of solvent for one hour and the obtained decoction was filtered. The same procedure was repeated three times and the result of the three successive extractions was collected and combined. Secondly, boiling solvent was added to 10 g of powdered plant and mixed for one hour at room temperature, the resulting infusion was filtered and the procedure was repeated three times as described above. Distilled and demineralised water, 50% ethanol and 100% ethanol were the solvents. Crude ethanol extracts were concentrated under vacuum and subsequently lyophilised while crude water extracts were only lyophilized.

2.3 Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated at a density of 15×10^3 cells per well in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) in 100 μ l of culture medium and were allowed to adhere for 4 h for MDCK cells and 16 h for Vero cells before treatment. Then, 100 μ l of increasing concentrations of extract dissolved in DMSO (Sigma–Aldrich) were added. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.25% (v/v) to avoid solvent toxicity. The cells were incubated for 96 h for MDCK cells and 72 h for Vero cells with or without the extract. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test (O'Brien *et al.*, 2000). Fluorescence was measured using an automated 96-well Fluoroskan Ascent FI TM plate reader (Labsystems) at excitation and emission wavelengths of 530 and

590 nm respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. After reading the resazurin test, cells were prepared for cellular DNA assay with Hoechst dye 33342. After a rinse with PBS solution, cells were dried and kept at -80°C until the Hoechst assay was carried out (Rago *et al.*, 1990). Cytotoxicity was measured as the concentration of extract or compound inhibiting cell growth by 50% (IC₅₀).

2.4 Antiviral activity of extracts against influenza virus

Antiviral assays were performed with monolayer cultures of MDCK cells in 96-well culture plates. For the resazurin reduction assay, cell monolayer was infected with virus (1000 TCID₅₀/well) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for one hour. The infected cell monolayer was then washed with HBSS and overlaid with overlapping solution (maintenance medium containing various concentrations of indicated compounds). After 96 h of incubation at 37°C, the resazurin reduction test was performed and the inhibition percentage of was calculated as $[(F_T - F_E)/(F_C - F_E)] \times 100$, where F_E and F_T refer to the fluorescence in the absence and presence of the compound respectively and F_C refer to the fluorescence of control cells (not infected). The minimal concentration of compounds required to reduce 50% of fluorescence (IC₅₀) was also calculated.

2.5 Antiviral activity of extracts against herpes simplex type-1 virus

Plaque assays were performed with monolayer cultures of Vero cells in 24-well culture plates. For plaque reduction assay, cell monolayer was infected with virus (30 pfu/well) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for one hour. The infected cell monolayer was then washed with PBS and overlaid with overlapping solution (maintenance medium containing 1% methylcellulose and various concentrations of indicated compounds). After 72 h of incubation at 37°C, cell monolayer was fixed with 5% paraformaldehyde and stained with 0.8% crystal violet. Plaques were counted and the percentage of inhibition was calculated as $[(P_c - P_e) / P_c] \times 100$, where P_c and P_e refer to the plaque number in the absence and presence of the compound, respectively. The minimal concentration of compounds required to reduce 50% of plaque numbers (IC₅₀) was also calculated.

2.6 Mode of antiviral activity

Cells and viruses were incubated with oseltamivir (influenza), acyclovir (HSV-1) and various extracts at different stages during the viral infection cycle in order to determine the antiviral mode of action (Koch *et al.*, 2008). (A) For virus pretreatment assay, the virus suspension was incubated in a medium containing different concentrations of the extracts for one hour at 37°C prior to infection of MDCK and Vero cells. (B) The cell pretreatment assay was performed with cell monolayers that were pre-treated with the extracts or positive control acyclovir for one hour at 37°C prior to virus inoculation. (C) For analysing

the antiviral inhibition during the adsorption period, HSV-1 was mixed with the drug and immediately added to the cells, incubated for one hour at 37°C and then treated as described for resazurin reduction and lysis plaques assay. (D) The effect of extracts during the replication period was tested by adding the compounds to the overlay medium after the infection.

2.6 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate for HSV-1 and in six replicates for influenza. A one-way ANOVA with a Tukey's multiple comparison test was performed to compare extracts with negative control for the antiviral assay. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

The objectives of this study were to evaluate the antiviral activity of five plants from boreal forest against influenza A (H1N1) virus and herpes simplex type-1 (HSV-1) to support their use in traditional medicine by Native Americans. Table 1 briefly describes the traditional use of the five plants.

3.1 Extraction yield

Plants flower, leaf and stem were extracted using decoction and infusion to obtain similar extracts used by Native Americans. Flower, leaf and stem of *Achillea millefolium*, *Cornus canadensis*, *Trillium erectum*, *Plantago major* and *Trifolium repens* were extracted with water, ethanol and equal volume of water/ethanol. Table 2 presents the extraction yield of each of the 74 extracts. The extraction yield varies from 6.4 to 56.1 %. Regardless of plants, the highest yields were obtained with water and the lowest with ethanol. Overall, no significant difference was observed between decoction and infusion methods except for water extract of flower of *C. canadensis*. Indeed, water decoction (mean yield of 56%) was more efficient compare to infusion (mean yield of 25%). To determine extracts safety, their *in vitro* cytotoxicity on culture cells was evaluated.

3.2 Extracts cytotoxicity on MDCK and VERO cells

Extracts cytotoxicity was assessed on two cell lines used to evaluate the antiviral activity: MDCK and VERO cells. Indeed, it was important to ensure that the extracts were not toxic to cells before any antiviral activity test. Both cell lines were incubated in the presence or in the absence of a growing concentration of extract over four days for MDCK cells and three days for VERO cells. The results (see Table 2) are expressed as concentration inhibiting fifty percent of cell growth. The results show that all extracts of *P. major* and *T. repens* were not cytotoxic ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) against both cell lines. For *T. erectum*, flower extract with water/ethanol were found weakly cytotoxic against MDCK and VERO cells with IC_{50} of 74 and 62 $\mu\text{g/ml}$, respectively. All extracts of *C. canadensis* were not cytotoxic against VERO cells. In contrast, some *C. canadensis* leaf extracts inhibited moderately to weakly the growth of MDCK cells with IC_{50} ranging from 43 to 96 $\mu\text{g/ml}$. All stem extracts, leaf and flower water extracts of *A. millefolium* were not cytotoxic against both cell lines. However, ethanolic extracts of flower and leaf of *A. millefolium* inhibited cell growth of MDCK and VERO cells with IC_{50} ranging from 14 to 80 $\mu\text{g/ml}$. Plant extracts antiviral activity against influenza virus and HSV-1 infections were evaluated.

3.3 Extracts antiviral activity against influenza virus

The antiviral activity of non-cytotoxic extracts was determined against influenza A (H1N1) *in vitro*. To determine the mechanism of action of the extracts, the virus was added at different stages of the infection. In order to evaluate direct extract effect, the virus (method A) was pre-treated with extracts (100 µg/ml) for one hour before the MDCK cells infection. To evaluate the effect of extract on virus adsorption, cells were pre-treated for one hour without virus (method B) and with virus (method C) before washing. Finally, to assess the virus replication effect, the extracts were added after MDCK infection and the cells were incubated in the presence of extract over a period of four days (method D). Then, the cells were washed and quantified using resazurin. The results (see Table 3) were expressed as the percentage of inhibition of infection by influenza in comparison with untreated infected cells. Oseltamivir (200 µM), used as positive control, inhibited cell infection at about 80%. Oseltamivir, a neuraminidase inhibitor, prevented virus release. Firstly, the pre-treatment of cells with extracts before infection did not protect MDCK cells. The water/ethanol and ethanol extracts of *A. millefolium* leaf inhibited the adsorption of virus reducing influenza infection about, respectively, 41 and 22% for decoction. For infusion, the ethanol extract of leaf inhibited infection about 23%. Any other extract inhibited influenza adsorption. Extracts effect was also evaluated on virus replication. However, some extracts were not tested due to their cytotoxicity. Water decoction of *A. millefolium* flower infusion, leaf and stem were found weakly active with an inhibition ranging from 23 to 37%. Water infusion of *C. canadensis* flower and stem was also active with an inhibition of 29 and 33%,

respectively. The inhibition of infection induced by *T. erectum* and *P. major* was lower to 25%. Finally, decoction of flower and stem of *T. repens* inhibited the infection about 28 to 41%. Some extracts interacted directly with the influenza virus inhibiting infection. The higher inhibition protection was achieved with decoction and infusion ethanol extracts of *A. millefolium* leaf with a protection ranging from 22 to 78%. Leaf decoction with water/ethanol of *C. canadensis* leaf reacts also directly with influenza virus, protecting MDCK cells with 96% of inhibition of infection. Altogether, the results suggest that all plants tested possess antiviral activity against influenza virus. However, the activity was found to be weak to moderate at a concentration of 100 µg/ml. To the best of our knowledge, it is the first time that the antiviral activity against influenza of these plants is reported. It will be interesting to isolate and characterize the compounds responsible of this activity.

3.4 Extracts antiviral activity against herpes virus type-1

In this study, extracts antiviral activity against herpes virus type-1 (HSV-1) was evaluated. Apart for *P. Major*, ethnopharmacologic information was not found about these plants to treat herpes simplex. In contrast to influenza which is a RNA virus, it was interesting to test the activity against a DNA virus as HSV-1. Moreover, HSV-1 is very common infection in the population. HSV-1 prevalence varies from ~40% before 15 years old and increase to 60-90% in older adults (Smith and Robinson, 2002). Actually, it exist some treatment as acyclovir (Greco *et al.*, 2007) and docosanol (Treister and Woo, 2010). Acyclovir was used

as positive control. This antiviral agent inhibits the replication of HSV-1. At dose of 0.75 µg/ml, acyclovir protects VERO cells against infection about 100%. As for influenza, Extracts effect at different stage of viral infection was evaluated. Firstly, the result in Table 4 showed that the VERO cells pre-treatment with extracts followed by washing did not protect against infection. However, all the tested plants exhibited an antiviral activity by blocking the adsorption of the virus and its replication as well as acting directly. For *A. millefolium*, all the plants parts were found active against HSV-1. Decoction of leaf with water, water/ethanol and ethanol strongly inhibited infection via an adsorption inhibition of virus with 80, 100 and 85% protection. The effect of some *A. millefolium* leaf extract was found moderately active against the replication of virus with a protection of about 50%. The higher direct effect of extracts on HSV-1 was found with decoction water/ethanol of flower, leaf and stem of *A. millefolium* with a protection of 95, 100 and 92%, respectively. For *C. canadensis*, the results showed that the extracts of flower did not inhibit virus replication but strongly protected against virus adsorption with inhibition ranging from 93 to 100%. Moreover, flower extracts interacted directly with HSV-1 to inhibit 100% of virus infection. The extracts of *C. canadensis* leaf strongly protected VERO cells against virus adsorption and replication with an inhibition ranging from 69 to 100 %. Like flower case, direct interaction of leaf extracts with HSV-1 protects the cells against infection (100% at 100 µg/ml). Some extracts of stem were also found active by acting either directly on the virus and on its adsorption. Most of extracts of *T. erectum*, *P. major* and *T. repens* were inactive to protect VERO cells against infection. For *T. erectum*, flower infusion extracts with water and water/ethanol inhibits, respectively, the virus replication (46% of inhibition)

or virus adsorption (79% of inhibition). Moreover, the extracts of leaf infusion with water/ethanol protected the cells against infection by a direct effect on HSV-1 (73% of inhibition). Antiviral activity against HSV-1 was less interesting for the extracts of *P. major* and *T. repens*. However, the best antiviral activity of *P. major* was observed with ethanol leaf and stem extracts. For *T. repens*, the flower extracts protected the VERO cells infection by acting directly on HSV-1. Altogether, these results showed that all plants tested possess antiviral activity against HSV-1 with the *A. millefolium* and *C. canadensis* being the most active plants. Therefore, the concentration that inhibits fifty percent of the infection was evaluated to identify the best extracts for each different stage of the infection. The results (see Table 5) showed that water decoction of *C. canadensis* flower and leaf thus water/ethanol infusion of leaf were the most active extracts to inhibit virus adsorption with IC_{50} values ranging from 9 to 10 $\mu\text{g/ml}$. For HSV-1 replication inhibition, *C. canadensis* extracts exhibited also the higher activity with IC_{50} values ranging from 44 to 69 $\mu\text{g/ml}$. Finally, water/ethanol decoction of *A. Millefolium* leaf was found the most active extract to inhibit directly HSV-1 with an IC_{50} of $4.8 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$.

4. Discussion

All the plants selected in this study were used in Native Americans traditional medicine to treat infection symptoms such as cold, cough and fever. The results show that all the tested plants protected MDCK cells against influenza virus by various mechanisms of actions such as adsorption inhibition, virus replication and by acting directly on the influenza virus. Overall, these results support the use of these plants against influenza infection. To the best of our knowledge, it is the first time that *in vitro* anti-influenza activity studies are reported for these plants. However, some isolated and identified compounds of these plants could be responsible, in part, of the anti-influenza activity. Several polyphenols, flavonoids, saponins, glucosides and alkaloids isolated from medicinal plants exhibit anti-influenza activities (Wang *et al.*, 2006; Naithani *et al.*, 2008). Flavanoids, flavone glycoside (apigenin, luteolin) and terpenoids were isolated and identified in *A. millefolium* (Chandler *et al.*, 1982; Guédon *et al.*, 1993; Anon., 2001). Flavanoids, terpenoids and phenolic compounds were found in *P. major* (Chiang *et al.*, 2003). Carlsen *et al.* (2008) reported the presence of flavonoids in *T. repens* and Yokosuka and Mimaki (2008) identified saponins in *T. erectum*. In this study, higher inhibition of influenza was obtained with a decoction of *C. canadensis* leaf with water/ethanol (96% of inhibition). Chemical composition of *C. canadensis* was seldom studied. Some iridoid glycosides such as scandoside, scandoside methyl ester, monotropein and galioside were reported in the literature (Stermitz and Krull, 1998) but no antiviral activity has been reported for these compounds.

In this study, antiviral activity of some extracts against HSV-1 was also reported. To the best of our knowledge, only *P. major* was studied for its antiviral activity against HSV-1. In fact, Chiang *et al.* (2002) observed that a crude aqueous extract was weakly active. Three pure compounds isolated from this extract including baicalein, caffeic acid and chlorogenic acid showed an antiviral activity against HSV-1 (Chiang *et al.*, 2002). In the present work, crude water extract of *P. major* was not found active but the water-ethanol and ethanol extracts were significantly active against HSV-1. On the other hand, some compounds previously isolated from these plants could explain the antiviral activity. Flavonoids and terpenes are the major groups of compounds isolated from *A. millefolium* (Csupor-Löffler *et al.*, 2009; Glasl *et al.*, 2002; Tozyo *et al.*, 1994). Some flavonoids are known for their antiviral activity against HSV-1 (Khan *et al.*, 2005). Specifically, quercetin is a flavonoid present in this plant (Aljancic *et al.*, 2010; Lemmens-Gruber *et al.*, 2006) and is known for its virucidal action and its direct inactivation of HSV-1 (Mucsi *et al.*, 1977; Kaul *et al.*, 1985). Additionally, two caffeic acid derivatives (chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acid) were isolated from *A. millefolium*. As described above, these two compounds were also isolated from *P. major* and their antiviral activity against HSV-1 is known (Chiang *et al.*, 2002). The presence of these compounds can explain the direct effect of *A. millefolium* extracts on HSV-1.

Higher antiviral activity of *T. repens* against HSV-1 was found with flower extracts. Antiviral activity can be explained partially by the presence of proanthocyanidins (also named condensed tannins) in the flowers of *T. repens* (Jones *et al.*, 1976). Some

proanthocyanidins isolated from an acetone/water extract of *Myrothamnus flabellifolia* and *Rumex acetosa* showed an effect on the *in vitro* adsorption and penetration of HSV-1 but direct action was not tested (Gescher *et al.*, 2010 and 2011). Additional investigations will be needed to determine if the direct action of the current extracts on virus is caused by proanthocyanidins since no study reported this mode of action of that particular compound. Some *T. erectum* extracts exhibited a moderate activity against HSV-1 and steroidal saponins and glycosides were isolated from this plant and could explain activity (Hayes *et al.*, 2009; Yokosuka and Mimaki, 2008). Khan *et al.* (2005) reported that these compounds showed anti-HSV activity. Finally, the more interesting plant studied for its antiherpes activity was *C. canadensis*. Most of the extracts inhibited HSV-1 by 100% with a direct action on the virus. As mentioned above, some iridoids were isolated from *C. canadensis* (Stermitz and Krull, 1998). No antiviral activity of these compounds was reported in the literature. However, seven other iridoids were tested by Bermejo *et al.* (2002) against HSV-1 and none of these compounds were active against this virus. Therefore additional researches have to be performed to identify the plant active compounds since several of its extracts have a strong activity against herpes.

5. Conclusion

Five plants used by Native Americans to treat flu symptoms such as cold, cough and fever were investigated for their antiviral activities against influenza A H1N1 and HSV-1. The results showed that all plants tested were active against influenza supporting their use by Native Americans in traditional medicine. All plants were also found active against HSV-1. *C. canadensis* extracts demonstrated higher antiviral activity against both viruses. Further research will be needed to identify compounds responsible of the activity.

Acknowledgments

The authors would like to thank Patrick Nadeau for identification of plants. This work was supported by the Fonds de la recherche forestière du Saguenay-Lac-St-Jean and the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

References

- Aljancic, I., Stankovic, M., Tesevic, V., Vujisic, L., Vajs, V. and Milosavljevic, S., 2010. Protective Effect on Human Lymphocytes of Some Flavonoids Isolated from Two *Achillea* Species. *Natural Product Communications* 5: 729-732.
- Barrett, S.A. and Gifford, E.W., 1933. Miwok material culture. *Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee, Milwaukee, Wis.*, 376p.
- Beigel, J. and Bray, M., 2008. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Research* 78(1): 91-102.
- Bermejo, P., Abad, M.J., Diaz, A.M., Fernandez, L., De Santos, J., Sanchez, S., Villaescusa, L., Carrasco, L. and Irurzun, A., 2002. Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. *Planta Medica* 68: 106-110.
- Carlsen, S.C.K., Mortensen, A.G., Oleszek, W., Piacent, e S., Stochmal, A. and Fomsgaard, I.S., 2008. Variation in flavanoids in leaves, stems and flowers of white clover cultivars. *Natural Product Communications* 3: 1299-1306.
- Carrier Linguistic Committee, 1973. *Plants of Carrier Country*. Carrier Linguistic Committee, B.C., 86p.
- Chandler, R.F., Hooper, S.N., Hooper, D.L., Jamieson, W.D., Flinn, C.G. and Safe, L.M., 1982. Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Achillea millefolium* L. (Yarrow). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71:690-693.
- Chiang, L.C., Chiang, W., Chang, M.Y., Ng, L.T. and Lin, C.C., 2002. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research* 55: 53-62.
- Chiang, L.C., Ng L.T., Chiang W., Chang M.Y. and Lin C.C., 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Medica* 69: 600-604.
- Csupor-Löffler, B., Hajdu, Z., Zupko, I., Rethy, B., Falkay, G., Forgo, P. and Hohmann, J., 2009. Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on Cultured Human Tumour Cell Lines. *Phytotherapy Research* 23: 672-676.

Final report on the safety assessment of Yarrow (*Achillea millefolium*) Extract. International journal of toxicology 2:79-84. Review.

Gao, W.Y., Jia, W. and Li, H.B., 2002. Antiviral agents from plants and traditional Chinese medicine. Journal of Chemical Industry and Engineering 19S: 10.

Gescher, K., Kühn, J., Lorentzen, E., Hafezi, W., Derksen, A., Deters, A. and Hensel, A., 2010. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. Journal of Ethnopharmacology 134: 468-474.

Gescher, K., Hensel, A., Hafezi, W., Derksen, A. and Kühn, J., 2011. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. Antiviral Research 89: 9-18.

Glasl, S., Mucaji, P., Werner, I., Presser, A. and Jurenitsch, J., 2002. Sesquiterpenes and flavonoid aglycones from a Hungarian taxon of the *Achillea millefolium* group. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 57: 976-982.

Greco, A., Diaz, J.J., Thouvenot, D. and Morfin, F., 2007. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. Infectious Disorders Drug Targets 7: 11-18.

Guédon, D., Abbe, P., Lamason, J.-L., 1993. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies. Biochemical Systematics and Ecology 21: 607-611.

Gunther, E. and Janish, J.R., 1973. Ethnobotany of western Washington : the knowledge and use of indigenous plants by Native Americans. University of Washington Press, Seattle, 71p.

Hamel, P.B. and Chiltoskey, M.U., 1975. Cherokee plants and their uses a 400 years history. Herald Pub Co., Sylva, 65p.

Han, T., Marasco, W.A., 2011. Structural basis of influenza virus neutralization. Annals of the New York Academy of Sciences 1217: 178-190.

Hart, J.A., 1981. The Ethnobotany of the Northern Ceyenne Indians of Montana. Journal of Ethnopharmacology 4: 1-55.

Hart, J., 1992. Montana native plants and early peoples. Montana Historical Society Press, Helena, 75p.

Hayes, P.Y., Lehmann, R., Penman, K., Kitching, W. and De Voss, J.J., 2009. Steroidal saponins from the roots of *Trillium erectum* (Beth root). Phytochemistry 70: 105-113.

- Herrick, J.W., 1977. *Iroquois Medical Botany*. State University of New York, Albany, 563p.
- Johnson, N.P. and Mueller, J., 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine* 76: 105–115.
- Jones, W.T., Broadhurst, R.B. and Lyttleton, J.W., 1976. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry* 15: 1407-1409.
- Kaul, T.N., Middleton, E. and Ogra, P.L., 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology* 15: 71-79.
- Khan, M.T.H., Ather, A., Thompson, K.D. and Gambari, R., 2005. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 67: 107-119.
- Kilbourne, E.D., 1987. *Influenza*. Plenum Publishing, NewYork, 359p.
- Koch, C., Reichling, J., Schneele, J. and Schnitzler, P., 2008. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine* 15: 71-78.
- Lemmens-Gruber, R., Marchart, E., Rawnduzi, P., Engel, N., Benedekl, B. and Kopp, B., 2006. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea-pig ilea. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* 56: 582-588.
- Moerman, D.E., 1998. *Native American ethnobotany*. Timber Press, Portland, 927p.
- Moscona, A., 2005. Oseltamivir Resistance—disabling our influenza defenses. *The New England Journal of Medicine* 353: 2633-2636.
- Mucsi, I., Beladi, I., Pusztai, R., Bakay, M. and Gabor, M., 1977. Proceedings of the 5th Hungarian Bioflavonoid Symposium. In: Farkas, L., Gibor, M., Kallay, F. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 401-409.
- Naithani, R., Huma, L.C., Holland, L.E., Shukla, D., McCormick, D.L.; Mehta, R.G. and Moriarty, R.M., 2008. Antiviral activity of phytochemical: A comprehensive review. *Mini reviewa in Medicinal Chemistry*. 8: 1106-1133.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70: 461-477.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267: 5421-5426.

Palese, P., Shaw, M.L., 2007. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1647–1689.

Rago, R., Mitchen, J. and Wilding, G., 1990. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoescht 33 258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Analytical Biochemistry* 19: 131-34.

Raymond, M., 1945. Notes ethnobotaniques sur les Tete-de-Boule de Manouan. *Contributions botaniques de l'Université de Montréal*. 55: 113-134.

Rousseau, J., 1947. Ethnobotanique Abenakise. *Archives de Folklore*. 11: 145-182.

Russell, W.C., 1962. A sensitive and precise plaque assay for herpes virus. *Nature* 195: 1028-1029.

Smith, H., 1929. *Materia Medica of the Bella Coola and Neighboring Tribes of British Columbia*. National Museum of Canada Bulletin 56: 47-68.

Smith, J.S. and Robinson, N.J., 2002. Age-specific Prevalence of Infection with Herpes Simplex Virus Types 2 and 1: A Global Review. *The Journal of Infectious Diseases* 186: S3-S28.

Stermitz F.R. and Krull R.E., 1998. Iridoid glycosides of *Cornus canadensis*: a comparison with some other *Cornus* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 845-849.

Tantaquidgeon, G., 1928. Mohegan medicinal practices, weather-lore and superstitions. SI-BAE Annual report, pp. 264-270.

Tantaquidgeon, G., 1972. Folk medicine of the Delaware and related Algonkian Indians. *Pennsylvania Historical and Museum Commission, Harrisburg*, 145p.

Thompson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J., Fukuda, K., 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Journal of the American Medical Association* 289: 179–186.

Tozyo, T., Yoshimura, Y., Sakurai, K., Uchida, N., Takeda, Y., Nakai, H. and Ishii, H., 1994. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42: 1096 - 1100.

Treister, N.S. and Woo, S.B., 2010. Topical n-docosanol for management of recurrent herpes labialis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11: 853-860.

Turner, N.J., Bouchard, R. and Kennedy, D.I.D., 1980. Ethnobotany of the Okanagan-Colville Indians of British Columbia and Washington. British Columbia Provincial Museum, Victoria, 179p.

Turner, N.J., 1990. Thompson ethnobotany: knowledge and usage of plants by the Thompson Indians of British Columbia. Royal British Columbia Museum, Victoria, 335p.

Wang, X., Jia, W., Zhao, A., Wang, X., 2006. Anti-influenza Agents from Plants and Traditional Chinese Medicine. *Phytotherapy Research* 20: 335-341.

Yokosuka, A. and Mimaki, Y., 2008. Steroidal glycosides from the underground parts of *Trillium erectum* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 69: 2724-2730.

Table 1 : Various uses by Native American of the five selected plant

Species (Common name)	Plant part	Tribe	Use
<i>Achillea millefolium</i> L. (yarrow)	Leaves, flowers, roots and entire plant	Abnaki, Carrier, Cheyenne, Klallam, Miwok, Okanagan, Paiute, Thompson, Hesquiat, Cherokee, Cree, Woodlands, Flathead, Iroquois, Menominee, Montagnais, Ojibwa and Quileute	Infusion, decoction and poultice of plant part: coughs, colds, influenza and fever
<i>Cornus canadensis</i> L. (bunchberry)	Stem and entire plant	Algonquin, Tete-de-Boule, Iroquois and Costanoan	Decoction : colds, coughs and fever
<i>Trillium erectum</i> L. (red trillium)	No indication	Cherokee	coughs
<i>Plantago major</i> L. (common plantain)	Roots and entire plant	Carrier, Costanoan and Rappahannock	Decoction and poultice: coughs and fever
<i>Trifolium repens</i> L. (white clover)	Dried leaves and entire plant	Mohegan and Cherokee	Infusion of plant part: colds and coughs

Table 2: Extraction yield (%) and cytotoxicity of extracts from *A. millefolium*, *C. canadensis*, *T. erectum*, *P. major* and *T. repens* on MDCK and Vero cell lines

Plant	Extraction	Solvent	Extraction yield (%)	IC ₅₀ (µg/ml) ¹	
				MDCK	Vero
<i>Achillea millefolium</i>					
flower	decoction	Water	26	>100	>100
		EtOH 50%	23	65 ± 3	>100
		EtOH 100%	16	27 ± 1	54 ± 2
	infusion	Water	21	86 ± 15	>100
		EtOH 50%	20	33 ± 3	76 ± 13
		EtOH 100%	13	14 ± 1	25 ± 2
leaf	decoction	Water	33	>100	>100
		EtOH 50%	29	>100	>100
		EtOH 100%	11	78 ± 9	67 ± 7
	infusion	Water	24	>100	>100
		EtOH 50%	22	>100	>100
		EtOH 100%	8	70 ± 8	80 ± 7
stem	decoction	Water	22	>100	>100
		EtOH 50%	20	>100	>100
		EtOH 100%	9	>100	>100
	infusion	Water	21	>100	>100
		EtOH 100%	6	>100	>100
		EtOH 50%	17	>100	>100
<i>Cornus canadensis</i>					
flower	decoction	Water	56	63 ± 2	>100
		EtOH 50%	40	>100	>100
		EtOH 100%	nd	nd	nd
	infusion	Water	25	>100	>100
		EtOH 50%	39	>100	>100
		EtOH 100%	nd	nd	nd
leaf	decoction	Water	37	43 ± 2	>100
		EtOH 50%	34	70 ± 5	>100
		EtOH 100%	18	93 ± 7	>100
	infusion	Water	30	62 ± 10	>100
		EtOH 50%	34	62 ± 3	>100
		EtOH 100%	12	96 ± 10	88 ± 18
stem	decoction	Water	28	80 ± 7	>100
		EtOH 50%	22	>100	>100
		EtOH 100%	12	>100	>100
	infusion	Water	34	>100	>100
		EtOH 50%	23	>100	>100
		EtOH 100%	8	77 ± 4	>100

Plant	Extraction	Solvent	Extraction yield (%)	IC ₅₀ (µg/ml) ¹	
				MDCK	Vero
<i>Trillium erectum</i>					
flower	decoction	Water	47	>100	>100
		EtOH 50%	47	>100	82 ± 12
		EtOH 100%	nd	nd	nd
	infusion	Water	44	>100	>100
		EtOH 50%	40	74 ± 6	62 ± 9
		EtOH 100%	nd	nd	nd
leaf	decoction	Water	48	>100	>100
		EtOH 50%	38	>100	>100
		EtOH 100%	27	>100	>100
	infusion	Water	42	>100	>100
		EtOH 50%	42	>100	>100
		EtOH 100%	18	83 ± 4	>100
stem	decoction	Water	47	>100	73 ± 20
		EtOH 50%	44	>100	>100
		EtOH 100%	24	>100	>100
	infusion	Water	N/A	>100	>100
		EtOH 50%	nd	nd	nd
		EtOH 100%	15	>100	>100
<i>Plantago major</i>					
leaf	decoction	Water	43	>100	>100
		EtOH 50%	31	>100	>100
		EtOH 100%	19	98 ± 16	>100
	infusion	Water	38	>100	>100
		EtOH 50%	29	>100	>100
		EtOH 100%	10	>100	>100
stem	decoction	Water	28	>100	>100
		EtOH 50%	17	>100	>100
		EtOH 100%	13	>100	>100
	infusion	Water	18	>100	>100
		EtOH 50%	19	>100	>100
		EtOH 100%	8	>100	>100
<i>Trifolium repens</i>					
flower	decoction	Water	31	>100	>100
		EtOH 50%	29	>100	>100
		EtOH 100%	20	>100	>100
	infusion	Water	26	>100	>100
		EtOH 50%	29	>100	>100
		EtOH 100%	17	>100	>100
stem	decoction	Water	33	>100	>100
		EtOH 50%	34	>100	>100
		EtOH 100%	20	>100	>100
	infusion	Water	31	>100	>100
		EtOH 50%	32	>100	>100
		EtOH 100%	16	>100	>100

¹Concentration inhibiting 50% of cell growth
nd - not determined.

Table 3: Extracts antiviral effect from *A. millefolium*, *C. canadensis*, *T. erectum*, *P. major* and *T. repens* against influenza A H1N1 virus. Results are given in percentage of protection compared with untreated infected cells controls

			Inhibitory percentage of infection (at 100 µg/ml)			
Plant / Plant part	Extraction type	Solvent	A	B	C	D
Oseltamivir (positive control)	-	-	NA	NA	NA	81 ± 8
<i>Achillea millefolium</i>						
flower	decoction	Water	NA	NA	NA	24 ± 7
		EtOH 50%	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	NA	NA	NA	Tx
	infusion	Water	NA	NA	NA	31 ± 4
		EtOH 50%	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	NA	NA	NA	Tx
leaf	decoction	Water	NA	NA	NA	35 ± 12
		EtOH 50%	nd	NA	41 ± 26	23 ± 4
		EtOH 100%	78 ± 39	NA	22 ± 12	Tx
	infusion	Water	NA	NA	NA	37 ± 4
		EtOH 50%	NA	NA	nd	15 ± 6
		EtOH 100%	40 ± 15	NA	23 ± 5	Tx
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	23 ± 7
		EtOH 50%	NA	NA	NA	24 ± 6
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	37 ± 3
		EtOH 50%	NA	NA	NA	22 ± 4
		EtOH 100%	NA	NA	NA	31 ± 5
<i>Cornus Canadensis</i>						
flower	decoction	Water	na	NA	NA	Tx
		EtOH 50%	na	NA	NA	16 ± 5
		EtOH 100%	nd	nd	nd	nd
	infusion	Water	NA	NA	NA	29 ± 5
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	nd	nd	nd	nd
leaf	decoction	Water	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 50%	96 ± 15	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	NA	NA	NA	22 ± 3
	infusion	Water	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 50%	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	nd	NA	NA	26 ± 6
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 50%	NA	NA	NA	19 ± 6
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
	infusion	Water	NA	NA	53 ± 28	33 ± 5
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	Tx

			Inhibitory percentage of infection (at 100 µg/ml)			
Plant / Plant part	Extraction type	Solvent	A	B	C	D
<i>Trillium erectum</i>						
flower	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	nd	NA	nd	nd
	infusion	Water	NA	NA	NA	11 ± 5
		EtOH 50%	nd	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	nd	NA	nd	Nd
leaf	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	19 ± 2
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	Tx
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	14 ± 8
	infusion	Water	NA	NA	NA	12 ± 5
		EtOH 50%	nd	NA	nd	nd
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
<i>Plantago major</i>						
leaf	decoction	Water	NA	NA	NA	23 ± 9
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	22 ± 3
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	16 ± 5
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	20 ± 4
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
<i>Trifolium repens</i>						
flower	decoction	Water	NA	NA	NA	29 ± 10
		EtOH 50%	NA	NA	NA	28 ± 9
		EtOH 100%	12 ± 3	NA	14 ± 7	33 ± 7
	infusion	Water	NA	NA	NA	23 ± 4
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	32 ± 9
		EtOH 50%	NA	NA	NA	41 ± 6
		EtOH 100%	NA	NA	NA	39 ± 4
	infusion	Water	NA	NA	NA	27 ± 9
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA

A – Pretreatment of viruses with extract before infection
 B – Pretreatment of cells with extract before infection
 C – Adsorption period
 D – Replication period

Tx – These extracts could not be tested at 100µg/ml with method D due to cytotoxicity
 nd – not determined
 NA – Not Active

Table 4: Extracts antiviral effect from *A. millefolium*, *C. canadensis*, *T. erectum*, *P. major* and *T. repens* against HSV-1. Results are given in percentage of inhibition of lysis plaques compared with untreated infected cells controls

			Inhibitory percentage of lysis plaques (at 100 µg/ml)			
Plant / Plant part	Extraction type	Solvent	A	B	C	D
Acyclovir (positive control)	-	-	NA	NA	NA	100
<i>Achillea millefolium</i>						
flower	decoction	Water	63 ± 9	NA	NA	NA
		EtOH 50%	95 ± 9	NA	49 ± 27	NA
		EtOH 100%	93 ± 23	NA	47 ± 12	Tx
	infusion	Water	59 ± 14	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	NA	NA	NA	Tx
leaf	decoction	Water	96 ± 4	NA	80 ± 7	53 ± 10
		EtOH 50%	100	NA	100	42 ± 16
		EtOH 100%	NA	NA	85 ± 7	Tx
	infusion	Water	84 ± 5	NA	NA	NA
		EtOH 50%	100	NA	67 ± 8	54 ± 13
		EtOH 100%	96 ± 4	NA	NA	***
stem	decoction	Water	84 ± 14	NA	NA	NA
		EtOH 50%	92 ± 8	NA	56 ± 13	NA
		EtOH 100%	NA	NA	43 ± 21	NA
	infusion	Water	95 ± 7	NA	NA	NA
		EtOH 50%	72 ± 24	NA	NA	27 ± 16
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
<i>Cornus canadensis</i>						
flower	decoction	Water	100	NA	96 ± 6	NA
		EtOH 50%	100	NA	100	NA
		EtOH 100%	nd	nd	nd	nd
	infusion	Water	100	NA	93 ± 6	NA
		EtOH 50%	100	NA	97 ± 3	69 ± 14
		EtOH 100%	nd	nd	nd	nd
leaf	decoction	Water	100	NA	100	69 ± 11
		EtOH 50%	100	NA	99 ± 2	94 ± 4
		EtOH 100%	100	NA	90 ± 0	91 ± 16
	infusion	Water	100	NA	99 ± 2	85 ± 7
		EtOH 50%	100	NA	98 ± 4	82 ± 10
		EtOH 100%	100	NA	100	100
stem	decoction	Water	100	NA	NA	NA
		EtOH 50%	100	NA	97 ± 5	NA
		EtOH 100%	NA	NA	43 ± 15	55 ± 21
	infusion	Water	100	NA	100	NA
		EtOH 50%	91 ± 9	NA	NA	43 ± 4
		EtOH 100%	81 ± 22	NA	72 ± 35	NA

			Inhibitory percentage of lysis plaques (at 100 µg/ml)			
Plant / Plant part	Extraction type	Solvent	A	B	C	D
<i>Trillium erectum</i>						
flower	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 100%	nd	nd	nd	Nd
	infusion	Water	NA	NA	NA	46 ± 9
		EtOH 50%	52 ± 19	NA	79 ± 6	Tx
		EtOH 100%	nd	nd	nd	Nd
leaf	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	57 ± 19	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	73 ± 6	NA	NA	NA
		EtOH 100%	66 ± 4	NA	NA	NA
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	Tx
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	nd	nd	nd	nd
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
<i>Plantago major</i>						
leaf	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	89 ± 18	NA	NA	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	73 ± 13	NA	NA	39 ± 18
		EtOH 100%	100	NA	NA	NA
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	85 ± 8	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	62 ± 25	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	79 ± 9
<i>Trifolium repens</i>						
flower	decoction	Water	89 ± 5	NA	NA	NA
		EtOH 50%	89 ± 10	NA	NA	NA
		EtOH 100%	74 ± 24	NA	43 ± 12	NA
	infusion	Water	29 ± 4	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	97 ± 5	NA	NA	NA
stem	decoction	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	NA	NA	NA	NA
	infusion	Water	NA	NA	NA	NA
		EtOH 50%	NA	NA	NA	NA
		EtOH 100%	83 ± 8	NA	NA	NA

A – Pretreatment of viruses with extract before infection

B – Pretreatment of cells with extract before infection

C – Adsorption period

D – Replication period

Tx – These extracts could not be tested at 100µg/ml with method D due to cytotoxicity

nd – not determined

NA – Not Active

Table 5: Determination of the concentration reducing HSV-1 lysis plaques by 50% of more active extracts

			IC ₅₀ (µg/ml) ¹			
Plant / Plant part	Extraction type	Solvent	A	B	C	D
<i>Achillea millefolium</i>						
leaf	decoction	EtOH 50%	4.8 ± 0.6	NA	45 ± 7	NA
stem	decoction	Water	20 ± 6	NA	36 ± 1	NA
<i>Cornus canadensis</i>						
flower	decoction	Water	6.0 ± 0.9	NA	10 ± 3	NA
		EtOH 50%	16 ± 4	NA	30 ± 5	NA
	infusion	Water	31 ± 3	NA	94 ± 16	NA
		EtOH 50%	25 ± 5	NA	29 ± 6	NA
leaf	decoction	Water	17 ± 6	NA	9 ± 1	69 ± 18
		EtOH 50%	14 ± 4	NA	31 ± 5	44 ± 8
		EtOH 100%	22 ± 3	NA	44 ± 8	61 ± 3
	infusion	Water	14 ± 3	NA	17 ± 2	NA
		EtOH 50%	11 ± 2	NA	9 ± 3	51 ± 8
		EtOH 100%	28 ± 6	NA	40 ± 5	67 ± 24
stem	decoction	Water	15 ± 4	NA	54 ± 9	50 ± 19
		EtOH 50%	8 ± 3	NA	36 ± 9	NA
	infusion	Water	16 ± 2	NA	39 ± 8	NA
<i>Platango major</i>						
stem	decoction	EtOH 100%	60 ± 17	NA	NA	NA

¹Concentration inhibiting 50% of cell growth

A – Pretreatment of viruses with extract before infection

B – Pretreatment of cells with extract before infection

C – Adsorption period

D – Replication period

NA – Not Active

CHAPITRE 3

CONCLUSION

Les Amérindiens utilisent depuis longtemps les plantes pour traiter les symptômes de la grippe et du rhume tel que la toux et la fièvre. Nous avons sélectionné cinq d'entre elles afin d'évaluer leur activité biologique *in vitro* : *Achillea millefolium* L., *Cornus canadensis* L., *Trillium erectum* L., *Plantago major* L. et *Trifolium repens* L.. L'objectif principal de ce travail consistait donc à évaluer et ainsi à confirmer l'activité antivirale de ces plantes utilisées en médecine traditionnelle contre l'influenza de type A. Les résultats ont montré que toutes les plantes possèdent une activité antivirale faible à modérée contre l'influenza. Le *C. canadensis* est la plante présentant la plus grande activité avec une inhibition de l'infection de 77% à une concentration de 100 µg/ml. D'autre part, nous avons également évalué l'activité antivirale des extraits de plantes contre l'herpès simplex de type 1. La plupart des extraits de *T. erectum*, *P. major* et *T. repens* n'ont pu protéger les cellules VERO contre l'infection. Par contre, plusieurs extraits de *C. canadensis* ont montré une forte activité antivirale autant au niveau de l'adsorption que de la réplication du virus mais ils ont aussi eu une action directe sur le virus HSV-1. L'ensemble des résultats obtenus montrent que les plantes utilisées par les Amérindiens possèdent une activité antivirale contre l'influenza. Nos travaux ont donc permis d'établir un lien entre l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle et l'activité antivirale *in vitro*. De plus, nous avons décrit pour la première fois une activité antivirale contre l'herpès simplex de type 1 pour la plupart des plantes testées.

Puisque plusieurs extraits ont montré une forte activité antivirale, les perspectives de recherche sont vastes. D'abord, les composés responsables de cette activité pourraient être

isolés en effectuant des tests d'activité pour chaque nouvelle fraction produite afin de sélectionner celle la plus active et contenant possiblement le ou les composés responsables de l'activité antivirale. Ainsi, ces composés pourraient être identifiés. La découverte de nouveaux composés pourraient permettre d'améliorer l'arsenal clinique actuel ou encore permettre de lutter plus adéquatement contre les souches résistantes. Aussi, une étude plus approfondie des modes d'action des extraits ou des composés isolés pourrait être faite. Par exemple, la quantité de protéines virales produites pendant les différentes étapes de la réplication pourrait être évaluée par immunobuvardage afin de nous aider à comprendre le mécanisme d'action du composé antiviral. Aussi, l'activité *in vivo* pourrait être évaluée en utilisant un modèle animal comme la souris. Le modèle SKH-1, qui est une souche de souris immunocompétente sans poils, peut être utilisé pour tester de nouvelles thérapies antivirales contre l'herpès labial (HSV-1). Le modèle animal serait l'étape précédant l'essai clinique sur l'humain, qui pourrait ainsi mener à l'élaboration et la mise en marché d'un nouveau traitement pour traiter les feux sauvages.

BIBLIOGRAPHIE

Al-Mamun, M., Yamaki, K., Masumizu, T., Nakai, Y., Saito, K., Sano, H. and Tamura, Y., 2007. Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern Japan determined using electron spin resonance spectrometry. *International Journal of Biological Sciences* 3: 349-355.

Babaei, M., Abarghoei, M.E., Akhavan, M.M., Ansari, R. and Vafaei, A.A., 2007. Antimotility effect of hydroalcoholic extract of yarrow (*Achillea millefolium*) on the guinea-pig ileum. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 3673-3677.

Bacon, T.H., Levin, M.J., Leary, J.J., Sarisky, R.T. and Sutton, D., 2003. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 114-128.

Barrett, S.A. and Gifford, E.W., 1933. Miwok material culture. *Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee, Milwaukee, Wis.*, 376p.

Beara, I.N., Lesjak, M.M., Jovin, E.D., Balog, K.J., Anackov, G.T., Orcic, D.Z. and Mimica-Dukic, N.M., 2009. Plantain (*Plantago* L.) Species as Novel Sources of Flavonoid Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9268-9273.

Beara, I.N., Orcic, D.Z., Lesjak, M.M., Mimica-Dukic, N.M., Pekovic, B.A. and Popovic, M.R., 2010. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52: 701-706.

Beigel, J. and Bray, M., 2008. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Research* 78: 91-102.

Benedek, B., Geisz, N., Jager, W., Thalhammer, T. and Kopp, B., 2006. Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver. *Phytomedicine* 13: 702-706.

Benedek, B. and Kopp, B., 2007. *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 157: 312-314.

Bolshakova, I.V., Lozovskaya, E.L. and Sapezhinskii, II, 1998. Antioxidant properties of a number of plant extracts. *Biofizika* 43: 186-188.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. and Akpulat, H.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 87: 215-220.

Carrier Linguistic Committee, 1973. *Plants of Carrier Country*. Carrier Linguistic Committee, B.C., 86p.

Cavalcanti, A.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Rieck, L., de Sousa, R.S., Da Silva-Santos, J.E., Mesia-Vela, S. and Marques, M.C.A., 2006. Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 277-284.

Chiang, L.C., Chiang, W., Chang, M.Y., Ng, L.T. and Lin, C.C., 2002. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research* 55: 53-62.

Cox, R.J., Brokstad, K.A. and Ogra, P., 2004. *Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies*. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology* 59: 1-15.

Csupor-Löffler, B., Hajdu, Z., Zupko, I., Rethy, B., Falkay, G., Forgo, P. and Hohmann, J., 2009. Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on Cultured Human Tumour Cell Lines. *Phytotherapy Research* 23: 672-676.

De Clercq, E., 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology* 30: 115-133.

de Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A.M. and Osterhaus, A.D.M.E., 2000. Influenza Virus: a Master of Metamorphosis. *Journal of Infection* 40: 218-228.

Field, H.J., 2001. Herpes simplex virus antiviral drug resistance -- current trends and future prospects. *Journal of Clinical Virology* 21: 261-269.

Fleury, H.J.A., 2002. *Virologie humaine*. Masson, Paris, 798p.

Frey, F. and Meyers, R., 2010. Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10: 64.

Galvez, M., Martin-Cordero, C., Lopez-Lazaro, M., Cortes, F. and Ayuso, M.J., 2003. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 125-130.

Goldberg, A.S., Mueller, E.C., Eigen, E. and Desalva, S.J., 1969. Isolation of anti-inflammatory principles from *achillea millefolium* (compositae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58: 938.

Greco, A., Diaz, J.J., Thouvenot, D. and Morfin, F., 2007. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. *Infectious Disorders Drug Targets* 7: 11-18.

Gunther, E. and Janish, J.R., 1973. *Ethnobotany of western Washington : the knowledge and use of indigenous plants by Native Americans*. University of Washington Press, Seattle, 71p.

Hamel, P.B. and Chiltoskey, M.U., 1975. *Cherokee plants and their uses a 400 years history*. Herald Pub Co., Sylva, 65p.

Hart, J., 1992. *Montana native plants and early peoples*. Montana Historical Society Press, Helena, 75p.

Hart, J.A., 1981. The Ethnobotany of the Northern Ceyenne Indians of Montana. *Journal of Ethnopharmacology* 4: 1-55.

Herrick, J.W., 1977. *Iroquois Medical Botany*. State University of New York, Albany, 563p.

Howard, M., Sellors, J.W., Jang, D., Robinson, N.J., Fearon, M., Kaczorowski, J. and Chernesky, M., 2003. Regional distribution of antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 in men and women in Ontario, Canada. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 84-89.

Hureaux, J.-M., 2003. *Traité de virologie médicale*. ESTEM, Paris, 699p.

Kintzios, S., Papageorgiou, K., Yiakoumettis, I., Baricevic, D. and Kusar, A., Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53: 773-776.

Krämer, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Müller, U., Orf, S., Wubbolts, M. and Raeven, L., 2003. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering* 5: 277-283.

Li, S., Yuan, W., Wang, P., Zhang, Z., Zhang, W. and Ownby, S., 2007. Processes for the extraction and purification of shikimic acid and the products of such processes. United States. 20070161818. <<http://www.freepatentsonline.com/y2007/0161818.html>>.

Lin, L.T., Liu, L.T., Chiang, L.C. and Lin, C.C., 2002. In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytotherapy Research* 16: 440-444.

Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Hamill, F.A., Fabricant, D., Dietz, B.M. and Chadwick, L.R., 2005. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research* 19: 988-991.

Marie-Victorin, 1995. Flore Laurentienne. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 1093p.

Moerman, D.E., 1998. Native American ethnobotany. Timber Press, Portland, 927p.

MRNF. Bref portrait de la forêt boréale au Québec. [En ligne]. Québec. 2003.

MSSS, 2009. Flash Influenza : La diminution du nombre de cas de grippe A(H1N1) se poursuit au Québec. Québec, volume 13.

Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70: 461-477.

Oliveira, A.P., Valentão, P., Pereira, J.A., Silva, B.M., Tavares, F. and Andrade, P.B., 2009. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology* 47: 2841-2846.

Park, W.Z. and Fowler, C.S., 1989. Park's ethnographic notes on the Northern Paiute of western Nevada, 1933-1940. University of Utah Press, Salt Lake City, Utah, 192p.

Pires, J.M., Mendes, F.R., Negri, G., Duarte-Almeida, J.M. and Carlini, E.A., 2009. Antinociceptive Peripheral Effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: Both Plants known popularly by Brand Names of Analgesic Drugs. *Phytotherapy Research* 23: 212-219.

- Ponce, M.M., Navarro, A.I. and Martinez, G.M.N., 1994. In vitro effect against Giardia of 14 plants extracts. *Revista de investigación clínica* 46: 343-347.
- Pope, L.E., Marcelletti, J.F., Katz, L.R., Lin, J.Y., Katz, D.H., Parish, M.L. and Spear, P.G., 1998. The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Research* 40: 85-94.
- Potrich, F.B., Allemand, A., da Silva, L.M., dos Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mendes, D., Andre, E., Werner, M.F.D. and Marques, M.C.A., 2010. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 85-92.
- Raymond, M., 1945. Notes ethnobotaniques sur les Tete-de-Boule de Manouan. *Contributions botaniques de l'Université de Montréal*. 55: 113-134.
- Rousseau, J., 1947. Ethnobotanique Abenakise. *Archives de Folklore*. 11: 145-182.
- Sacks, S., 2010. Herpès : huit types de virus.
- Sarkar, S.K. and Malhotra, S.S., 1979. Gas-liquid-chromatographic method for separation of organic-acids and its application to pine needle extracts. *Journal of Chromatography* 171: 227-232.
- Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B.I. and Assous, M.V., 1999. *Microbiologie et pathologie infectieuse*. Paris, 1000p.
- Shipochliev, T., Dimitrov, A. and Aleksandrova, E., 1981. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Veterinarno-meditsinski nauki* 18: 87-94.
- Shors, T., 2009. *Understanding viruses*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Mass., 639p.
- Smith, H., 1929. *Materia Medica of the Bella Coola and Neighboring Tribes of British Columbia*. National Museum of Canada Bulletin 56: 47-68.
- Smith, J.S. and Robinson, N.J., 2002. Age-specific Prevalence of Infection with Herpes Simplex Virus Types 2 and 1: A Global Review. *The Journal of Infectious Diseases* 186: S3-S28.

Stiver, G., 2003. The treatment of influenza with antiviral drugs. *Canadian Medical Association Journal* 168: 49-57.

Stojanovic, G., Radulovic, N., Hashimoto, T. and Palic, R., 2005. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 185-190.

Sugrue, R.J., Tan, B.H., Yeo, D.S.Y. and Sutejo, R., 2008. Antiviral drugs for the control of pandemic influenza virus. *Annals Academy of Medicine Singapore* 37: 518-524.

Superti, F., Ammendolia, M.G. and Marchetti, M., 2008. New advances in anti-HSV chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry* 15: 900-911.

Takzare, N., Hosseini, M.-J., Mortazavi, S.H., Safaie, S. and Moradi, R., 2010. The effect of *Achillea millefolium* extract on spermatogenesis of male Wistar rats. *Human & Experimental Toxicology*.

Tantaquidgeon, G., 1928. Mohegan medicinal practices, weather-lore and superstitions. SI-BAE Annual report, pp. 264-270.

Tantaquidgeon, G., 1972. Folk medicine of the Delaware and related Algonkian Indians. Pennsylvania Historical and Museum Commission, Harrisburg, 145p.

Tozyo, T., Yoshimura, Y., Sakurai, K., Uchida, N., Takeda, Y., Nakai, H. and Ishii, H., 1994. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42: 1096-1100.

Treister, N.S. and Woo, S.B., 2010. Topical n-docosanol for management of recurrent herpes labialis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11: 853-860.

Turel, I., Ozbek, H., Erten, R., Oner, A.C., Cengiz, N. and Yilmaz, O., 2009. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian Journal of Pharmacology* 41: 120-124.

Turner, N.J., 1990. Thompson ethnobotany: knowledge and usage of plants by the Thompson Indians of British Columbia. Royal British Columbia Museum, Victoria, 335p.

Turner, N.J., Bouchard, R. and Kennedy, D.I.D., 1980. Ethnobotany of the Okanagan-Colville Indians of British Columbia and Washington. British Columbia Provincial Museum, Victoria, 179p.

Turner, N.J. and Efrat, B.S., 1982. Ethnobotany of the Hesquiat Indians of Vancouver Island. British Columbia Provincial Museum, Victoria, 101p.

Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Roman-Ramos, R., Vega-Avila, E. and Perez-Gutierrez, M.S., 2006. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 36-42.

WHO. Influenza. [En ligne]. 2010.

Yaeesh, S., Jamal, Q., Khan, A.U. and Gilani, A.H., 2006. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. *Phytotherapy Research* 20: 546-551.

Yokosuka, A. and Mimaki, Y., 2008. Steroidal glycosides from the underground parts of *Trillium erectum* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 69: 2724-2730.

