

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PRODUITS ANTIBACTÉRIENS ISSUS  
DE LA FORÊT QUÉBÉCOISE

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE  
EXTENSIONNÉ DE  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR  
HÉLOÏSE CÔTÉ

SEPTEMBRE 2019



## REMERCIEMENTS

L'accomplissement et la rédaction d'une thèse est un vaste projet enrichissant, laborieux et passionnant, qui est le résultat d'un véritable travail d'équipe. Au cours de cette thèse j'ai reçu un encadrement, un soutien, des conseils et de l'aide précieuse qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je voudrais dans un premier temps remercier mon directeur de recherche, le professeur Jean Legault. Il a su me transmettre sa passion pour les plantes de la forêt boréale et pour la recherche, il s'est investi sans relâche et a été une inspiration tout au long de mon cheminement académique. Grâce à lui j'ai eu la liberté nécessaire afin de développer mon savoir-faire et apprendre à gérer des projets de grande envergure, il a toujours été présent, enthousiasme et généreux dans son temps et ses conseils. Sous sa direction, j'ai eu la chance d'avoir accès à un laboratoire de grande qualité, une équipe dynamique et des projets de recherche variés et passionnants. Travailler au sein du laboratoire LASEVE dans l'équipe du professeur Legault a vraiment été un plaisir et une expérience enrichissante.

J'aimerais également remercier mon codirecteur, le professeur André Pichette. Le professeur Pichette a toujours été présent lorsque j'avais besoin d'aide, notamment pour les questions plus pointues en chimie. Il s'est tenu informé en tout temps de l'avancée des différents projets et ses conseils avisés étaient toujours d'une aide précieuse. Merci également au professeur Lionel Ripoll pour son aide et ses conseils avec le microscope électronique à balayage (MEB) et la révision des articles. Merci aux professeurs Lucie Beaulieu de l'Université Laval et Maxime Paré de l'UQAC qui m'ont également fourni de judicieux conseils lors de l'examen de synthèse.

J'aimerais également remercier mes collègues de travail qui m'ont aidé tout au long de ce projet. Merci à Catherine Dussault pour son aide dans les différents tests biologiques et pour ses conseils. Merci à Karl Girard-Lalancette pour les tests antioxydants et également tout ce qui touche à l'informatique et aux statistiques. Merci également à Audrey Bélanger, Mouadh Mihoub et Claire Fournier pour leur aide et leurs conseils avisés. Votre présence au laboratoire a toujours été des plus accueillante et chaleureuse, travailler dans cette atmosphère et au sein d'une telle équipe a été un bonheur. J'aimerais remercier également tous les stagiaires post-doctoraux, étudiants au doctorat, à la maîtrise et au baccalauréat qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce projet : François Simard, Marianne-Boucher, Benoît Roger, Marie-Ève Ouellet, Doria Grimard et Joanie Tremblay. Mon projet de thèse a été rendu possible grâce au soutien financier du CRSNG, du FQRNT, de Nutrinor et d'autres supports financiers qui ont été fournis par l'Université du Québec à Chicoutimi et le LASEVE.

Sur une note plus personnelle, j'aimerais remercier mon conjoint Luc Godin qui m'a convaincu d'entreprendre ce beau projet et qui m'a soutenu et épaulé tout au long de mes années d'études. Il a su me redonner courage dans les moments plus difficiles et a toujours été fier et aidant dans mon projet de recherche. Merci beaucoup pour les heures passées à relire mes textes parfois longs et pointus, ton aide a été précieuse et considérable. Merci bien sûr à mes parents de m'avoir soutenu et encouragé dans ce projet. Merci à mon père de m'avoir répété qu'il faut garder l'esprit ouvert et avoir de l'imagination même en sciences, et à ma mère de m'avoir transmis sa passion des plantes et sa persévérance. Finalement, merci à mon fils d'être ce qu'il est! Merci à ma famille et à tous mes amis qui ont été là pour moi et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions passionnantes.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xv
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction générale : les antibiotiques .....	2
1.2 Problématique de la résistance aux antibiotiques.....	3
1.3 Cible des antibiotiques .....	7
1.4 Mécanisme biochimique de la résistance.....	14
1.4.1 Mécanismes de résistances .....	14
1.5 L'utilisation des antibiotiques en nutrition animale.....	18
1.6 L'industrie de la volaille au Canada.....	21
1.6.1 <i>Escherichia coli</i> .....	22
1.6.2 La coccidiose .....	23
1.6.3 <i>Clostridium perfringens</i> .....	25
CHAPITRE II. LA FORÊT BORÉALE, SOURCE POTENTIELLE DE PRODUITS ANTIBACTÉRIENS.....	27
2.1 Introduction.....	28
2.2 Les résines.....	29

2.3 Les huiles essentielles .....	32
2.4 Huiles essentielles dans l'alimentation des animaux d'élevage.....	34
2.4.1 Propriétés antioxydantes.....	35
2.4.2 Propriétés anti-inflammatoires.....	36
2.4.3 Innocuité .....	37
2.4.4 Propriétés antibactériennes .....	37
2.5 Propriétés antibactériennes des composés hydrophobes .....	41
2.6 Hypothèse.....	42
2.7 Objectifs .....	43
2.7 Structure de la thèse .....	44

CHAPITRE III. NEW ANTIBACTERIAL HYDROPHOBIC ASSAY REVEALS <i>ABIES BALSAMEA</i> OLEORESIN ACTIVITY AGAINST <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> AND MRSA.....	46
Résumé.....	48
Graphical abstract.....	49
Abstract .....	50
1. Introduction.....	51
2. Materials and methods .....	52
2.1. Oleoresin and chemicals.....	52
2.2. Bacterial strains .....	53
2.3. Culture methods.....	54
2.4. Standard disk diffusion and broth microdilution assays.....	54
2.5. Antibacterial hydrophobic assay (AHA) .....	55
2.6. Oleoresin distillation.....	56
2.7. Sample preparation for GC analysis.....	57

2.8. Qualitative analysis.....	58
2.9. Quantitative analysis.....	58
2.10. Statistical analysis.....	59
3. Results and Discussion.....	60
Author contributions .....	68
Conflict of interest.....	68
Acknowledgments.....	68
Appendix A. Supplementary material.....	72
CHAPITRE IV. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF <i>TUSSILAGO FARFARA</i> (L.) ESSENTIAL OIL FROM QUEBEC, CANADA.....	77
Résumé.....	79
Graphical abstract.....	80
Abstract .....	81
1. Introduction.....	82
2. Experimental .....	83
2.1. Chemicals .....	83
2.2. Plant material and extraction of essential oil.....	83
2.3. GC-FID and GC-MS analyses.....	84
2.4. Evaluation of antibacterial activity.....	85
3. Results and discussion.....	85
4. Conclusion.....	87
Contribution des auteurs .....	88
Funding .....	88

Disclosure statement .....	88
Acknowledgements .....	88
References .....	92

CHAPITRE V. ANTI-INFLAMMATORY, ANTIOXIDANT, ANTIBIOTIC, AND  
CYTOTOXIC ACTIVITIES OF *TANACETUM VULGARE* L. ESSENTIAL OIL  
AND ITS CONSTITUENTS .....

.....	94
Résumé .....	96
Abstract .....	97
1. Introduction .....	99
2. Experimental Section .....	100
2.1. Chemicals .....	100
2.2. Plant Material and Extraction of Essential Oil .....	101
2.3. GC-MS Analysis .....	101
2.4. Cell Culture .....	102
2.5. Measurement of Anti-Inflammatory Activity .....	103
2.6. Evaluation of Antioxidant Activity Using Cell-Based Assays .....	103
2.7. Evaluation of Antibacterial Activity .....	104
2.8. Cytotoxic Assays .....	105
3. Results and Discussion .....	105
4. Conclusions .....	110
Acknowledgments: .....	111
Conflicts of Interest: .....	111
Contribution des auteurs .....	111
References .....	115



CHAPITRE VI. THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF <i>MONARDA DIDYMA</i> L. ESSENTIAL OIL AND ITS EFFECT AS A DIET SUPPLEMENT IN MICE AND BROILER CHICKEN.....	121
Résumé.....	123
Abstract.....	125
1. Introduction.....	126
2. Materials and methods .....	129
2.1. Chemicals .....	129
2.2. Plant Material and Extraction of Essential Oil .....	129
2.3. GC-MS Analysis.....	129
2.4. <i>In vitro</i> activity of essential oil.....	130
2.4.1. Cell Culture.....	130
2.4.2. Bacterial strains .....	130
2.4.3. Culture methods.....	131
2.4.4. Measurement of Anti-Inflammatory Activity.....	132
2.4.5. Evaluation of Antioxidant Activity Using Cell-Based Assays.....	132
2.4.6. Evaluation of Antioxidant Activity Using ORAC.....	133
2.4.7. Evaluation of Antibacterial Activity.....	133
2.5. Experimental design in mice .....	134
2.6. Experimental design in broiler.....	134
2.7. Statistical analysis.....	136
3. Results and Discussion.....	136
Acknowledgments.....	142
Contribution des auteurs .....	142
References.....	148

CHAPITRE VII. BALSACONE C, A NEW ANTIBIOTIC TARGETING BACTERIAL CELL MEMBRANES, INHIBITS CLINICAL ISOLATES OF METHICILLIN-RESISTANT <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (MRSA) WITHOUT INDUCING RESISTANCE.....	154
Résumé.....	156
Abstract.....	158
1. Introduction.....	159
2. Materials and methods .....	52
2.1 Cell Culture.....	162
2.2 Isolation and characterisation of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolates.....	162
2.3 Antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method .....	163
2.4 Compound and bacterial strains.....	164
2.5 Antibacterial activity measurements using the microdilution method .....	164
2.6 Induction of resistance against BC and rifampicin.....	165
2.7 Membrane integrity .....	166
2.8 Scanning electron microscopy (SEM).....	167
2.9 Release of bacterial intracellular constituents .....	168
2.10 Acridine orange/ethidium bromide staining .....	168
2.11 Calcein-AM cell cytotoxicity assay.....	169
2.12 Statistical analysis.....	170
3. Results and discussion.....	170
4. Conclusions .....	177
Contribution des auteurs .....	178
References.....	191

CHAPITRE VIII. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES FUTURES .....	197
BIBLIOGRAPHIE .....	206

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

- 1.1 : Les principales cibles des antibiotiques ..... 9
- 1.2 : Les principaux mécanismes des résistances aux antibiotiques ..... 16

### CHAPITRE II

- 2.1 : Variations dans la structure des cellules et des parois cellulaires de *S. aureus*  
(Siponnen 2007)..... 31
- 2.2: Structure chimique du thymol et du carvacrol..... 33

### CHAPITRE VII

- 7.1: Induce bacterial resistance using rifampicin and balsacone C..... 181
- 7.2: Fluorescence microscopic images of *S. aureus* and MRSA after 3 h treatment  
with BC..... 182
- 7.3 : Scanning electron micrographs (SEM) of *S. aureus* and MRSA..... 183
- 7.4 : Measurement of cellular leakage of nucleic acid (A) and protein (B) from *S.*  
*aureus* and MRSA upon 3h exposure to balsacone C. .... 184
- 7.5: Membrane integrity after treatments with balsacone C ..... 185
- 7.6: Cell viability (WS1) after treatments with balsacone C ..... 186

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

1.1 : Liste des pathogènes prioritaires pour la recherche de nouveaux antibiotiques selon l'OMS.....	6
--	---

### CHAPITRE III

3.1 Comparison of antibacterial activity of various commercial antibiotics using disk diffusion, microdilution and hydrophobic assays (AHA).....	69
3.2: Composition of whole oleoresin from <i>A. balsamea</i> , residue and essential oil fractions. ....	70
3.3: Antibacterial activity of oleoresin fractions and compounds using hydrophobic assay (AHA). ....	71
3.4: Chemical profile of <i>A. balsamea</i> oleoresin using GC-MS analysis.....	72

### CHAPITRE IV

4.1: Chemical composition of <i>T. farfara</i> essential oil.....	89
4.2: Antibacterial activity of <i>T. farfara</i> essential oil (EO) and some selected compounds against <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> .....	91

### CHAPITRE V

5.1: Chemical composition of <i>T. vulgare</i> essential oil from northern Quebec, Canada .....	112
5.2: Anti-inflammation, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of <i>T. vulgare</i> essential oil and its main constituents.....	114

## CHAPITRE VI

6.1: Composition of <i>Monarda didyma</i> essential oil.....	143
6.2: Antibacterial activity of <i>M. didyma</i> essential oils and its mains compounds against selected bacterial strains .....	144
6.3: Anti-inflammatory, cytotoxic and antioxydant activity of <i>M. didyma</i> essential oils and its mains compounds .....	145
6.4: Comparison of mean body weight gain (g), feed intake (g) and feed efficiency among treatments in mice.....	146
6.5: Comparison of mean body weight gain (g), feed intake (g) and feed efficiency among treatments in broiler. ....	147

## CHAPITRE VII

7.1: Evaluation of antibacterial activity of balsacones C against <i>S. aureus</i> and clinical isolates MRSA. ....	179
7.2: Evaluation of antibacterial activity of balsacones C against different bacteria strains. ....	180

## RÉSUMÉ

L'augmentation de la résistance de certaines bactéries pathogènes aux traitements antibiotiques conventionnels et l'émergence des bactéries multi-résistantes a progressé à un rythme effréné au cours de la dernière décennie. Cette augmentation vient nous rappeler que la lutte contre les maladies infectieuses est loin d'être terminée. Les bactéries sont des organismes qui possèdent une très grande faculté d'adaptation et qui ont une croissance et une reproduction extrêmement rapide, et malheureusement les résistances bactériennes apparaissent plus rapidement que nous développons de nouveaux antibiotiques. Selon l'organisme mondial de la santé, la résistance des bactéries aux antibiotiques pourrait devenir la plus grande cause de mortalité sur la planète d'ici 2050. Trouver de nouvelles stratégies pour contrer le développement de résistances est un enjeu majeur pour la santé publique et pour la communauté scientifique. Les bactéries multi-résistantes émergent non seulement dans les hôpitaux, mais sont également souvent présentes dans le milieu communautaire. L'utilisation excessive et inadéquate des antibiotiques et leur ajout systématique dans la nourriture des animaux d'élevage contribuent à l'émergence rapide et à la propagation de ces résistances. Pour lutter efficacement, il faut d'une part diminuer le niveau de résistance chez les bactéries et d'autre part, trouver de nouveaux composés antibiotiques susceptibles d'être efficaces contre ces nouvelles bactéries multi-résistantes. Présentement les antibiotiques disponibles sur le marché proviennent exclusivement de différents composés isolés chez des champignons ou des bactéries, ou sont le fruit de la chimie de synthèse. Bien que les plantes possèdent une panoplie de composés et de méthodes de défense antibactérienne qui pourraient passer par de nouveaux mécanismes d'action et de nouvelles cibles, encore très peu d'entre elles ont été étudiées en profondeur. L'objectif principal de cette thèse était d'identifier et de développer des extraits et des composés issus de plantes de la forêt boréale possédant des propriétés antibactériennes. Deux types d'extraits de plantes de la forêt boréale pourraient posséder des propriétés antibactériennes très intéressantes pour la lutte aux bactéries résistantes: les huiles essentielles et les résines.

Pour ce projet de recherche, afin de pouvoir tester adéquatement ces deux types d'extraits, un nouveau test antibactérien adapté aux composés et matrices hydrophobes a été développé. Grâce à ce test, l'activité de la résine de sapin baumier (*Abies balsamea*) a été confirmée *in vitro* contre *Staphylococcus aureus* et deux souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM). Il a été observé que cette activité était en grande partie apportée par la présence de sept différents acides résiniques dans l'extrait. Cet extrait serait très intéressant pour le traitement cutané des infections et pour des développements futurs.

Par la suite, trois huiles essentielles (*Monarda didyma*, *Tanacetum vulgare* et *Tussilago farfara*) ont été analysées et comparées afin de sélectionner la plus

prometteuse pour remplacer les antibiotiques en nutrition chez les poulets d'élevage. Leurs compositions chimiques et leurs activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et cytotoxiques ont été déterminées. L'huile essentielle de monarde didyma (*Monarda didyma* L.) s'est révélée très prometteuse, notamment en raison de l'activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens*. Dans les tests *in vivo* chez les souris, une hausse significative du poids a été obtenue lors de l'ajout de l'huile essentielle dans la diète. Pour les tests *in vivo* directement chez les poulets d'élevage, une hausse significative du poids a également été obtenue chez ceux traités avec l'huile essentielle. Des tests supplémentaires restent à effectuer pour une utilisation plus intensive de l'huile essentielle dans la diète des poulets d'élevage, mais les résultats sont très prometteurs.

Finalement la balsacone C, un composé issu de la résine des bourgeons de peuplier baumier (*Populus balsamifera*), a démontré des résultats antibactériens contre une banque de trente-cinq SARM. Le composé semble sélectif envers les bactéries gram positif et possède un faible risque d'apparition de résistances. Pour déterminer des éléments du mécanisme d'action l'intégrité membranaire de bactéries traitées avec la balsacone C a été testé grâce à deux fluorochromes. Une perte de l'intégrité membranaire a été observée après un court temps d'incubation en présence du composé. Par la suite, l'effet sur les membranes a été confirmé grâce à la mesure du relâchement de protéines et d'acides nucléiques dans le milieu, et par microscopie électronique à balayage (MEB). Les résultats de ce chapitre sont très importants et pourraient mener au développement d'un nouvel antibiotique issu du métabolite secondaire des végétaux.

Pour conclure, bien qu'il reste encore beaucoup de recherche à faire, ce projet de thèse a permis de tester et sélectionner des extraits de plantes possédant des activités antibactériennes. Ces extraits pourraient être utilisés à plusieurs niveaux, notamment pour réduire l'incidence des bactéries résistantes dans l'élevage et dans la communauté en général, et pour traiter ces bactéries multi-résistantes lors d'infections. Les résultats présentés pourraient ouvrir des avenues très prometteuses pour ces différents extraits provenant de la forêt boréale québécoise.

Mots-clés : Activité antibactérienne, résine, huile essentielle, forêt boréale, *Abies balsamea*, *Monarda didyma*, *Tanacetum vulgare*, *Tussilago farfara*, *Populus balsamifera*, balsacone C



CHAPITRE I.  
INTRODUCTION

Look deep into nature,  
and then you will understand everything better.

- Albert Einstein

## INTRODUCTION

### **1.1 Introduction générale : les antibiotiques**

Les antibiotiques, dont l'action a été découverte dès le début du XX<sup>e</sup> siècle, sont des molécules possédant des propriétés antibactériennes très puissantes. Ce sont des médicaments naturels ou synthétiques qui inhibent la croissance bactérienne (bactériostatiques) ou tuent les bactéries (bactéricides), et ces propriétés les rendent uniques pour le contrôle des maladies infectieuses mortelles chez les humains. La découverte des antibiotiques a mené à une révolution majeure dans le domaine de la médecine moderne. Le Prontosil (sulfamidochrysoïdine) est le premier produit commercial possédant des propriétés antibactériennes à avoir été disponible sur le marché. Ce produit était vendu dans les années 1930, une décennie avant que la pénicilline ne soit disponible pour le public. Il possédait une activité contre les streptocoques. La pénicilline, découverte par Alexander Flemming en 1940, est maintenant un des produits de base pour le traitement de nombreuses infections bactériennes. Loin des quelques microgrammes initialement isolés par Flemming chez des champignons décomposeurs, cet antibiotique est maintenant à même de soigner des populations entières. L'histoire de la pénicilline est probablement le meilleur exemple de la capacité des chercheurs pour développer un antibiotique, et cela du banc de laboratoire jusqu'à un processus commercialement viable (Dodds, 2017).

## 1.2 Problématique de la résistance aux antibiotiques

Malheureusement, plusieurs études soulignent que l'utilisation excessive et inadéquate des antibiotiques pourrait apporter un risque élevé pour la santé humaine (Holmberg *et al.*, 1984; Spika *et al.*, 1987; Gassner and Wuethrich, 1994; Aarestrup *et al.*, 2001). Le développement de la résistance des bactéries aux antibiotiques avait été pressenti très tôt au XX<sup>e</sup> siècle. Par ailleurs, les mots du professeur Alexander Fleming, lors de la remise de son prix Nobel en 1945, étaient malheureusement annonciateurs de cette nouvelle problématique:

«It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant»

Alexander Fleming, 1945

Globalement, dans les hôpitaux de tous les continents, une augmentation alarmante de la résistance aux antibiotiques est observée depuis plusieurs années et est devenue un problème majeur de santé publique au XXI<sup>e</sup> siècle (Dodds, 2017). La résistance de certaines bactéries hautement pathogènes aux traitements antibiotiques conventionnels et l'émergence des bactéries multi-résistantes a augmenté depuis la dernière décennie à un rythme effréné, et cela vient nous rappeler que la lutte contre les maladies infectieuses est loin d'être terminée. La surutilisation à grande échelle des nombreux antibiotiques aujourd'hui utilisés pourrait mener à l'apparition d'une 'super-bactérie' résistante à toute les classes d'antibiotiques. Par conséquent il pourrait être impossible de la traiter avec les antibiotiques disponibles actuellement. C'est du moins une des craintes soulevées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2000). Il est préoccupant aujourd'hui de constater que les résistances

bactériennes apparaissent beaucoup plus rapidement que nous développons de nouveaux antibiotiques (Phillips *et al.*, 2004). Un bon exemple nous provient de la bactérie *Staphylococcus aureus* qui, au milieu du 20<sup>e</sup> siècle, a rapidement acquis des résistances multiples aux traitements (*S. aureus* résistant à la méticilline, SARM). Par exemple, l'utilisation de la vancomycine, un antibiotique glycopeptidique qui inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire, restait un médicament de choix pour le traitement de ces infections résistantes. Maintenant, *S. aureus* a grandement réduit sa sensibilité à la vancomycine (*S. aureus* intermédiaire à la vancomycine, SAIV), et une résistance complète a émergé au cours des 20 dernières années (*S. aureus* résistant à la vancomycine, SARV) (McGuinness *et al.*, 2017). Heureusement, les souches qui ont développé une résistance à la vancomycine sont encore rares en ce moment, et d'autres antibiotiques comme le linézolide et la daptomycine sont toujours efficaces (Loewen *et al.*, 2017). Toutefois, une résistance au linézolide et à la daptomycine est également apparue récemment. Aujourd'hui, ces antibiotiques restent toujours indiqués contre la grande majorité des SARM et SARV (Bagnoli *et al.*, 2017), mais pour combien d'années encore? D'autres agents tels que la ceftaroline, le ceftobiprole, la dalbavancine, l'oritavancine, le tédizolide et la télavancine ont été approuvés par les organismes de réglementation depuis 2009. Plusieurs dérivés de la tétracyclines et des fluoroquinolones, l'oxazolidinones et la pleuromutilines sont en cours de développement (Bal *et al.*, 2017).

Les infections causées par les bactéries multi-résistantes amènent une augmentation de la mortalité dans les hôpitaux, et également un coût économique très important pour les traitements qui est estimé à plus de 20 milliards de dollars par année aux États-Unis seulement. Le Center for Disease Control (CDC) estime qu'au moins 23 000 personnes meurent chaque année aux É-U d'une infection par un organisme résistant aux antibiotiques (CDC, 2013). Également, ce serait environ 25 000 personnes dans l'Union européenne (ECDC, 2014) et 58 000 personnes en Inde qui succombe annuellement à une infection par des bactéries résistantes (Laxminarayan

*et al.* 2014). Au Canada, la CUPE (Canadian Union of Public Employees) estime qu'il y aurait annuellement entre 8 500 et 12 000 décès, et les coûts associés aux bactéries avoisineraient un milliard de dollars (CUPE, 2009). L'OMS a par ailleurs classé douze bactéries comme étant de préoccupation mondiale en raison de leur résistances (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Liste des pathogènes prioritaires pour la recherche de nouveaux antibiotiques selon l’OMS

<b>Priorité 1 : CRITIQUE</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Acinetobacter baumannii</i>, résistance aux carbapénèmes</li> <li>2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, résistance aux carbapénèmes</li> <li>3. <i>Enterobacteriaceae</i>, résistance aux carbapénèmes, production de BLSE (béta-lactamase à spectre élargi)</li> </ol>
<b>Priorité 2 : ÉLEVÉE</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>4. <i>Enterococcus faecium</i>, résistance à la vancomycine</li> <li>5. <i>Staphylococcus aureus</i>, résistance à la méticilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine</li> <li>6. <i>Helicobacter pylori</i>, résistance à la clarithromycine</li> <li>7. <i>Campylobacter</i>, résistance aux fluoroquinolones</li> <li>8. <i>Salmonellae spp.</i>, résistance aux fluoroquinolones</li> <li>9. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones</li> </ol>
<b>Priorité 3 : MOYENNE</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>10. <i>Streptococcus pneumoniae</i>, insensible à la pénicilline</li> <li>11. <i>Haemophilus influenzae</i>, résistance à l’ampicilline</li> <li>12. <i>Shigella spp.</i>, résistance aux fluoroquinolones</li> </ol>

\*Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, World health organisation.

Il est important de noter que pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*, la proportion de bactéries résistantes aux médicaments antibactériens a dépassé 50% dans de nombreuses régions du monde (Chaudhary, 2016).

L'OMS a par ailleurs nommé la résistance bactérienne aux antibiotiques comme l'un des trois enjeux les plus importants pour la santé publique au 21<sup>e</sup> siècle (Munita and Arias, 2016). L'organisme a récemment mis sur pied le «World Health Day» sous le thème «Combat drug resistance: no action today means no cure tomorrow» qui vise à augmenter la recherche et développer des stratégies prometteuses pour restaurer l'efficacité des traitements contre les infections par des bactéries résistantes (Chellat *et al.*, 2016). La fontaine "dorée" de la découverte d'antibiotiques (entre 1960 et 1985) s'est rapidement asséchée alors que l'identification de nouveaux composés antibiotiques et de nouveaux modes d'action devenait plus difficile. Si nous voulons remédier à ce problème, les efforts de recherche et de développement doivent être fortement accrus et soutenus (Munita and Arias, 2016). Encore aujourd'hui, les compagnies pharmaceutiques préfèrent investir dans des médicaments plus sûrs, tels que les antidépresseurs et les médicaments anti-inflammatoires, qui peuvent apporter un flux régulier de profits (Chaudhary, 2016).

### **1.3 Cible des antibiotiques**

Pour être utilisable en clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les bactéries visées sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes (humaine). Un antibiotique devra donc idéalement affecter une voie métabolique absente ou peu active chez les eucaryotes, mais essentielle aux procaryotes, ou atteindre une cible spécifique aux procaryotes. Les antibiotiques peuvent être classés en fonction du composant ou du système cellulaire qu'ils affectent, en plus de déterminer s'ils induisent la mort cellulaire (bactéricides) ou

simplement inhibent la croissance cellulaire (bactériostatiques). La mort bactérienne est un processus complexe qui commence par l'interaction physique entre une molécule antibiotique et sa cible spécifique chez les bactéries (Kohanski *et al.*, 2010). Au cours des 15 dernières années, la plupart des cibles ont été découvertes grâce à une combinaison d'analyses génomiques, d'études génétiques et de bio-informatique. Le nombre de composants qui fournit de bonnes cibles pour les antibiotiques est limité, néanmoins, une seule cible peut offrir un large éventail de possibilités. Par exemple, la découverte de la pénicilline a conduit à l'identification d'une cible particulière (la membrane), et les efforts subséquents basés sur cette cible ont mené à des douzaines de produits commercialisés : céphalosporines, pénicillines et carbapénèmes, et ces découvertes se poursuivent encore aujourd'hui (Schmid, 2006). Les antibiotiques actuels peuvent se diviser en 5 groupes spécifiques en fonction de leur cible (Bambeke and Tulkens, 2010) : 1) antibiotiques actifs sur la paroi et membrane bactérienne; 2) antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs; 3) antibiotiques actifs sur la synthèse protéique; 4) antibiotiques inhibiteurs de voies métaboliques et 5) antibiotiques anti-anaérobies (Figure 1.1).



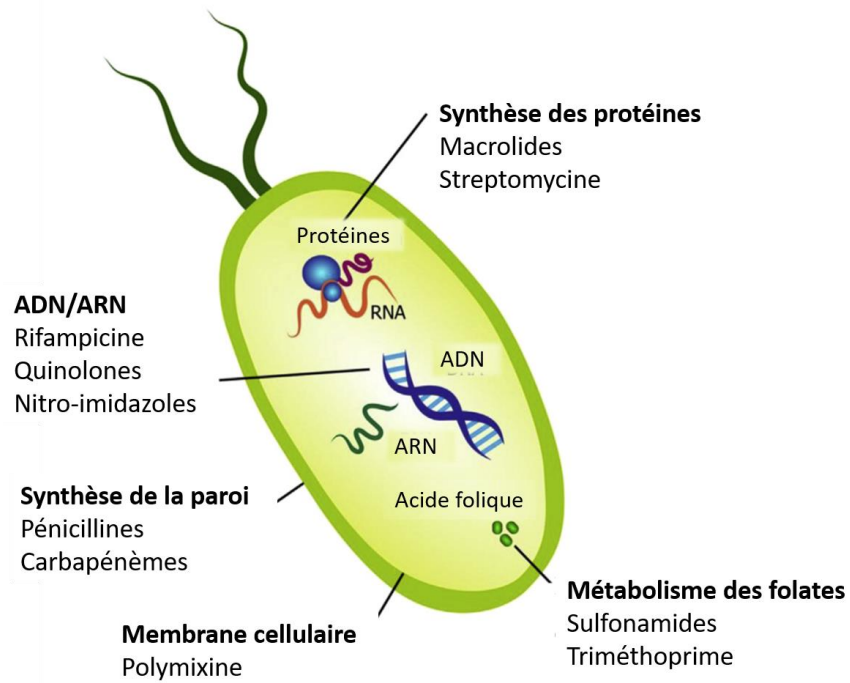


Figure 1.1 : Les principales cibles des antibiotiques, figure adaptée de Ganewatta and Tang, 2015.

1) **Antibiotiques actifs sur la paroi et la membrane bactérienne:** Il existe déjà plusieurs antibiotiques qui ciblent la membrane bactérienne. Cette dernière possède des cibles potentielles pour des nouveaux antibiotiques qui pourraient être efficaces, entre autres, contre les bactéries résistantes. Par exemple, la synthèse des peptidoglycane comporte plusieurs étapes importantes et des antibiotiques inhibants certaines de ces étapes pourrait-être prometteurs. Les antibiotiques utilisent différentes cibles dans la membrane : la synthèse de la membrane externe, l'augmentation de la perméabilité, les phospholipides, les propriétés de la membrane, etc. Les bactéries gram positifs et gram négatifs ont des membranes externes très différentes. Les bactéries à gram négatif sont entourées de deux membranes, la membrane cellulaire cytoplasmique et une membrane externe riche en lipopolysaccharides (Beutler, 2002). Les bactéries gram positif possèdent une membrane cytoplasmique et sont entourées de couches de peptidoglycane (également connu sous le nom de mureine), une matrice de polymère réticulée de manière covalente qui est composée de  $\beta$ -(1-4) -N-acétyl hexosamine liée à un peptide (Bugg and Walsh, 1992). Le maintien de la couche de peptidoglycane est accompli par l'activité des transglycosylases et des protéines liant la pénicilline (PBP, également connue sous le nom de transpeptidases) (Park and Uehara, 2008). Les phospholipides peuvent également être impliqués dans l'action des agents antimicrobiens et il existe trois principaux phospholipides chez la plupart des bactéries à gram négatif et à gram positif : le phosphatidylglycérol, la phosphatidyléthanolamine et la cardiolipine (Epanand *et al.*, 2016). Par exemple, les antibiotiques peptidiques tels que la polymyxine B ou E se lient au lipide A, l'ancre du lipopolysaccharide chez les bactéries à Gram négatif. Cette interaction cause une augmentation de la perméabilité membranaire et permet la fuite du contenu intracellulaire, ce qui mène à la mort des bactéries. Les glycopeptides quant à eux (ex : vancomycine) inhibent la synthèse de la paroi cellulaire en formant un complexe avec "D-Ala-D-Ala" (partie terminale

des peptidoglycanes bactériens) à l'extrémité carboxyle de la chaîne de peptidoglycane naissante (Epanand, 2016)

- 2) **Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs:** La synthèse de l'ADN, la transcription de l'ARNm et la division cellulaire nécessitent la modulation du surenroulement chromosomique par des réactions de rupture et de liaison des brins, processus catalysés par les topoisomérases (Espeli and Marians, 2004). Certains antibiotiques ciblent les complexes ADN-topoisomérase, interfèrent avec le maintien de la topologie chromosomique en ciblant la topoisomérase II et la topoisomérase IV, piégeant ces enzymes au stade de la dissociation de l'ADN et empêchant le retour des brins (Kohanski *et al.*, 2010). L'inhibition de la synthèse de l'ARN de même que l'inhibition de la réplication de l'ADN a un effet répressif sur le métabolisme des acides nucléiques procaryotes et constitue un puissant moyen d'induire la mort bactérienne (Floss and Yu, 2005). Par exemple, les quinolones agissent directement sur la synthèse de l'ADN bactérien. Elles possèdent deux cibles intracellulaires, qui sont deux ADN topoisomérases : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Pour les bactéries à gram négatif, l'ADN gyrase semble être la cible principale, tandis que pour les bactéries à gram positif, c'est la topoisomérase IV qui semble être la cible préférentielle des quinolones. La formation d'un complexe ADN topoisomérase-quinolone empêche la religation des brins d'ADN suite au clivage ce qui bloque la synthèse de l'ADN (Fàbrega *et al.*, 2009).
- 3) **Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique:** Le processus de traduction de l'ARNm se déroule sur trois phases successives (initiation, élongation et terminaison) qui impliquent le ribosome et plusieurs facteurs cytoplasmiques

accessoires (Garrett, 2000). Le ribosome est composé de deux sous-unités ribonucléoprotéiques, la 50S (contient un ARNr 5S, un ARNr 23S et 32 polypeptides) et la 30S (contient un ARNr 16S et 21 polypeptides), qui s'assemblent pendant la phase d'initiation (Nissen *et al.*, 2000). Les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines sont parmi les classes les plus larges d'antibiotiques et peuvent être divisés en deux sous-classes: les inhibiteurs 50S et les inhibiteurs 30S (Kohanski *et al.*, 2010). La streptomycine est un inhibiteur de la synthèse des protéines. L'antibiotique se lie à l'ARN ribosomique 16S de la sous-unité ribosomique 30S du ribosome bactérien et interfère avec la liaison entre l'ARNt de la N-formylméthionine à la sous-unité 30S. Cette interférence conduit à des lectures erronées de codons de l'ADN, à l'inhibition de la synthèse de protéines et entraîne la mort des bactéries (Luzzatto *et al.*, 1968).

- 4) **Antibiotiques inhibiteurs de voies métaboliques:** Les inhibiteurs de la synthèse des folates (ou antifolates) sont couramment utilisés en médecine. Le terme folate désigne un ensemble de molécules qui ont pour structure de base l'acide folique, qui elle-même est essentielle pour la synthèse des bases purine et pyrimidine de l'ADN. Contrairement aux eucaryotes, les bactéries pathogènes sont autotrophes pour le folate (Nzila, 2006). À l'heure actuelle, seulement deux enzymes de la voie de biosynthèse du folate sont ciblées par les antibiotiques, la dihydropteroate synthase (DHPS) qui intervient lors de l'assemblage du noyau pterin et du pABA (acide para-aminobenzoïque), et la dihydrofolate reductase (DHFR) qui transforme le dihydrofolate en tétrahydrofolate (Camara 2012). Par exemple, le triméthoprim inhibe le fonctionnement de la dihydrofolate réductase qui catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate, la forme active de l'acide folique qui est nécessaire à la synthèse des bases puriques, pyrimidiques et des acides

aminés. Le triméthoprimine agit donc par inhibition de la synthèse des acides nucléiques des bactéries sensibles (Gleckman *et al.*, 1981).

- 5) **Antibiotiques anti-anaérobies:** Finalement, certaines bactéries pathogènes peuvent vivre en anaérobie en utilisant des voies d'oxydo-réduction indépendantes de l'oxygène, et peuvent atteindre des niveaux de potentiel rédox nettement plus bas que ce que l'on retrouve chez l'humain. Ce mécanisme permet l'activation métabolique spécifique de certaines molécules antibiotiques, les nitroimidazoles (Bambeke and Tulkens, 2010). Les 5-nitroimidazoles (ex : métronidazole) pénètrent par simple diffusion à travers la membrane puis sont activés par réduction du groupement nitro, catalysée par des nitroréductases, libérant ainsi des intermédiaires toxiques. La production subséquente d'ions de type anion superoxyde et anion radical -nitro se fixe sur l'ADN, inhibant ainsi sa synthèse. Chez certaines bactéries, les radicaux produits empêcheraient également la libération d'hydrogène au cours de la réaction pyruvate-phosphoroclastique, réaction essentielle pour le métabolisme du pyruvate et de la production d'énergie (Zink, 2012).

Comme le mentionne Becker *et al.* (Becker *et al.*, 2006) dans un article paru dans *Nature*, les défis de la découverte d'antibiotiques concernent principalement l'identification de nouvelles cibles. Selon Schmid (2006), la découverte de médicaments nécessite beaucoup d'optimisme et de compromis à chaque étape : les cibles ne sont pas parfaites, les composés ne sont pas parfaits et les effets positifs des composés sont parfois confondus par leurs effets secondaires. Néanmoins, la découverte de quelques nouvelles cibles serait suffisante pour offrir des opportunités pour des générations de nouveaux antibiotiques.

## 1.4 Mécanisme biochimique de la résistance

Afin de bien comprendre le phénomène de la résistance, il est utile de regarder certains concepts fondamentaux. Premièrement, ce phénomène est fréquent et il est le résultat de l'interaction de plusieurs organismes avec leur environnement. La plupart des composés antibiotiques utilisés aujourd'hui dans les traitements proviennent à la base de molécules produites naturellement par différents organismes, et qui ont par la suite été synthétisés. Certaines bactéries ont développé des outils pour survivre à l'attaque des antibiotiques. Également, la sensibilité des organismes *in vivo* à un antibiotique peut varier en fonction de le nombre de bactéries présentes, une situation qui a été bien documentée chez des infections par *S. aureus* lors de traitements avec des céphalosporines (Munita and Arias, 2016). La réponse bactérienne à "l'attaque" des antibiotiques et la reproduction rapide de l'organisme résistant est un très bon exemple de l'adaptabilité des bactéries et de leur évolution. La très grande plasticité génétique des bactéries pathogènes déclenche des réponses spécifiques qui résultent en l'apparition de mutations adaptatives, d'acquisition de matériel génétique ou d'altération de l'expression de certains gènes. Ces mécanismes permettent l'apparition de résistance à possiblement tous les antibiotiques (Munita and Arias, 2016). Le développement de la résistance bactérienne doit être vu comme une réponse adaptative "normale" et une manifestation claire du principe darwiniste d'évolution, soit la survie et la reproduction de l'individu le mieux adapté au milieu (Munita and Arias, 2016).

### 1.4.1 Mécanismes de résistances

Les bactéries utilisent principalement deux stratégies génétiques afin de s'adapter à l'action d'un antibiotique, i) des mutations génétiques souvent associées avec le

mécanisme d'action d'un composé et ii) l'acquisition d'ADN étranger qui code pour des résistances aux antibiotiques via transfert horizontal des gènes (THG) (Munita and Arias, 2016).

En général, les mutations génétiques modifient l'action des antibiotiques par l'un des mécanismes suivants: i) la modification de la cible antimicrobienne (diminution de l'affinité pour le médicament), ii) la diminution de l'absorption du médicament, iii) l'activation des mécanismes d'efflux pour expulser la molécule nocive, iv) des changements globaux dans les voies métaboliques importantes via la modulation des réseaux de régulation ou v) la formation de biofilms (Singh and Barrett, 2006; Martens and Demain, 2017). On peut par ailleurs voir, dans la Figure 1.2 les principales voies de résistance utilisée par les bactéries, tels que adapté de Ganewatta and Tang, 2015. Voici quelques exemples de résistances aux antibiotiques développées par les bactéries: 1) la résistance à la polymyxine (cible les lipopolysaccharides) est apparue, entre autres, après l'apparition de certaines modifications des groupes phosphates du lipide A à laquelle l'antibiotique est lié; 2) dans le cas de la fosfomycine qui cible la membrane bactérienne, plusieurs formes différentes de résistance se sont développées, telles qu'une diminution de l'absorption du médicament et l'inactivation de l'antibiotique (Epanand, 2016); 3) la résistance à la rifampicine provient de mutations modifiant les résidus du site de fixation de la rifampicine à l'ARN polymérase, ce qui entraînent une diminution de l'affinité pour l'antibiotique (Feklistov et al., 2008).

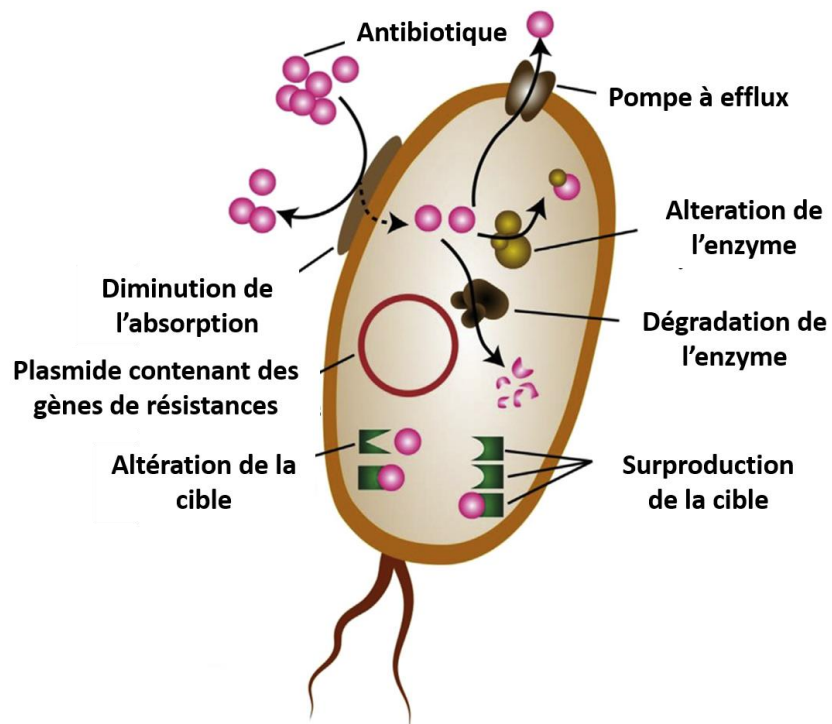


Figure 1.2 : Les principaux mécanismes des résistances aux antibiotiques, figure adaptée de Ganewatta and Tang, 2015.



Pour ce qui est du transfert horizontal des gènes, les bactéries peuvent acquérir du matériel génétique exogène par trois stratégies principales soient: i) lors de la transformation, la bactérie incorpore de l'ADN exogène libre présent dans son environnement, ii) lors de la transduction la bactérie reçoit une partie d'un génome bactérien par le biais d'un vecteur, tel un bactériophage et, iii) lors de la conjugaison, les bactéries échangent des plasmides qui peuvent être porteurs d'un ou plusieurs gènes de résistances. La transformation est probablement le type le plus simple de THG, mais seul quelques espèces bactériennes sont capables d'incorporer l'ADN exogène libre pour développer une résistance (ex : *Streptococcus pneumoniae*) (Munita and Arias, 2016).

Depuis 1970, uniquement trois catégories d'antibiotiques entièrement nouvelles ont été approuvées. Selon une estimation récente, 20 nouvelles classes de médicaments seraient nécessaires pour que les antibiotiques fonctionnent efficacement pendant les 50 prochaines années (Chaudhary, 2016). Les défis actuels associés aux infections bactériennes sont dus à la pénurie annoncée de thérapies, le manque de mesures de prévention efficaces et le manque de nouveaux antibiotiques, ce qui requiert le développement de nouvelles options et des traitements alternatifs (Kong *et al.*, 2016). Trouver de nouvelles stratégies contre le développement de résistances chez les bactéries est un enjeu très important pour la santé publique et pour la communauté scientifique. Les dernières années ont vu un accroissement dramatique partout sur la planète des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (Frieri *et al.*, 2016). Les bactéries multi-résistantes émergent non seulement dans les hôpitaux, mais sont également présentes dans les milieux communautaires, suggérant que des réservoirs sont maintenant présents à l'extérieur des milieux hospitaliers (Munita and Arias, 2016).

Une seconde source importante d'apparition de bactéries résistantes, outre les hôpitaux, se retrouve au sein de l'élevage avicole, porcin et bovin. Selon de très

nombreuses études, l'ajout d'antibiotiques de façon systématique dans la nourriture des animaux d'élevage augmente de manière fulgurante la proportion de bactéries résistantes (Witte, 2000; Aarestrup *et al.*, 2001; Aarestrup, 2003; Phillips *et al.*, 2004; Dibner and Richards, 2005; Diarra and Malouin, 2014)

### **1.5 L'utilisation des antibiotiques en nutrition animale**

Les bactéries résistantes aux antibiotiques proviennent fréquemment du milieu hospitalier (infection nosocomial), mais l'utilisation des antibiotiques en nutrition animale serait une seconde source non négligeable de bactéries pathogènes multi-résistantes. L'utilisation des antibiotiques comme promoteur de croissance en nutrition animale a débuté dans les années 1940. En effet, après la Seconde Guerre mondiale, la nécessité d'accroître la production alimentaire était impérative. Les premiers résultats concluants avec les antibiotiques ont été obtenus par accident: des animaux nourris avec une diète supplémentée de mycélium séché de *Streptomyces aureofaciens* ont montré des performances hautement améliorées. Il s'est avéré que la diète contenait des résidus de chlortétracycline, un antibiotique produit naturellement par cette espèce de champignon et le premier à être découvert appartenant à la classe des tétracyclines (Castañón, 2007). Au début des années 50, l'utilisation délibérée de la pénicilline, de l'auroéomycine, de la bacitracine, de la streptomycine et de la terramycine comme promoteurs de croissance était répertoriée un peu partout en Europe (Matterson *et al.*, 1951). Dans les années subséquentes, l'utilisation d'antibiotiques dans la production animale destinée à l'alimentation s'est popularisée et a fourni un avantage économique considérable aux éleveurs (Diarra and Malouin, 2014). Il a été estimé que les antibiotiques chez les animaux améliorent le poids corporel et l'indice de consommation, avec les effets les plus prononcés observés chez les jeunes animaux (Butaye *et al.*, 2003). Par exemple, en 1928 le poulet moyen

requérait en moyenne 112 jours de croissance et 22 kg de nourriture pour atteindre un poids corporel de 1,7 kg. Depuis les années 1990, les poulets nécessitent maintenant environ 35 à 42 jours de croissance et 4 kg de nourriture pour atteindre 2 kg (National Research Council, 1999). Cet effet serait expliqué en partie par une meilleure absorption des nutriments, les antibiotiques diminuant l'effet des toxines bactériennes dans l'intestin.

Quelques années après le début de l'utilisation systématique des antibiotiques en nutrition animale, une alarme a été sonnée avec le rapport du Conseil de la Présidence; «Des preuves substantielles démontrent que l'utilisation d'antibiotiques dans l'élevage animal favorise le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les animaux, et que la viande de détail peut être une source de microorganismes résistants» (Butaye *et al.*, 2003). En effet, la propagation de la résistance peut s'effectuer tout au long de la chaîne alimentaire par contact direct ou indirect. Le contact direct se produit suite à l'exposition immédiate d'êtres humains à des animaux et à des substances biologiques (sang, urine, excréments, lait et salive) (Dodds, 2017). Également, la population humaine peut être exposée indirectement à des bactéries résistantes aux antibiotiques par contact ou consommation de produits alimentaires contaminés (viande, œufs, lait et produits laitiers). Les personnes exposées comme les vétérinaires, les agriculteurs, les travailleurs des abattoirs et les manipulateurs d'aliments courent un risque plus élevé d'être infectées par des bactéries résistantes (Marshall and Levy, 2011). On reconnaît maintenant que les travailleurs exposés et leurs familles fournissent une voie probable pour l'entrée de bactéries résistantes aux antibiotiques dans la communauté humaine et les établissements de soins de santé (Marshall and Levy, 2011). Également, de nombreux rapports ont décrit la présence de grandes quantités de bactéries résistantes aux antibiotiques dans différents produits alimentaires (viande prête à l'emploi, viande cuite et lait en vrac) provenant de diverses sources animales (volaille, porc, chèvre et mouton) (Coetzee *et al.*, 2016). De plus, la plupart des agents antibiotiques

administrés via l'alimentation ou dans l'eau ne sont pas complètement absorbés dans l'intestin des animaux, et jusqu'à 90% de la dose de certains antibiotiques pourrait être rejetée dans les excréments. Des résidus d'antibiotiques comme la bacitracin, la chlortetracycline, le monensin, la narasin, le nicarbazin, la pénicilline, la salinomycine et la virginiamycine peuvent être détectés dans la litière des animaux à de fortes concentrations (Furtula *et al.*, 2003). Une telle litière, si elle n'est pas traitée, pourrait-être une source importante de résidus d'antibiotiques lorsqu'elle est utilisée comme engrais. Ces résidus pourraient également contribuer à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques.

Suite à l'apparition de bactéries résistantes, l'Union européenne a banni complètement l'utilisation des antibiotiques à des fins non thérapeutiques en 2006 (Windisch *et al.*, 2008). Le fait d'interdire l'utilisation des antibiotiques pour la promotion de la croissance dans l'élevage en Europe a d'ailleurs montré une diminution subséquente des niveaux de bactéries résistantes aux antibiotiques chez le bétail, dans la viande, et au sein de la population humaine en général (Smith *et al.*, 2005). Au Danemark par exemple, des changements majeurs dans l'utilisation des agents antimicrobiens pour la promotion de la croissance chez les poulets ont eu lieu en 1995-1996. De 1995 à 2000, des bactéries *Enterococcus faecium* provenant de poulets d'élevage ont été isolées et testées pour leur sensibilité à l'avoparcine et l'avilamycine dans le cadre du programme danois de surveillance de la résistance. L'interdiction de l'avoparcine en 1995 a été suivie d'une diminution de la présence de la bactérie *E. faecium* résistante chez les poulets, passant de 72,7% de résistance en 1995 à 5,8% en 2000. Également, l'utilisation de l'avilamycine a grandement diminué depuis 1996, ce qui a entraîné une diminution de la résistance à 4,8% des échantillons en 2000. Ces observations montrent qu'il est possible de réduire la résistance aux antibiotiques dans une population d'animaux destinés à l'alimentation lorsque la pression sélective des antibiotiques est supprimée (Aarestrup, 2003). En Amérique du Nord, les antibiotiques sont encore utilisés de façon systématique (Diarra and

Malouin, 2014). Au Canada, la stratégie des producteurs de poulet est : « Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation: un cadre d'action pancanadien ». Cette stratégie visait dans un premier temps l'élimination des antibiotiques de catégorie I chez le poulet comme promoteur de croissance en 2014. La stratégie visait ensuite l'élimination de ceux de catégorie II en 2018 et de ceux de catégorie III en 2020. Les antibiotiques de catégorie I et II ne sont présentement plus disponibles en vente libre et doivent faire l'objet d'une prescription par un vétérinaire pour être utilisés. Cette stratégie de réduction représente une étape importante et les éleveurs continuent de travailler fort afin d'assurer une utilisation responsable des antibiotiques.

## **1.6 L'industrie de la volaille au Canada**

La production de volaille est une industrie importante au Canada. En 2005, le Canada était le treizième plus grand pays producteur de poulets avec 981,2 millions de kilos (1,4% de la production mondiale) (Agriculture and Agri-Food Canada, 2006). En 2012, la valeur des produits de poulets canadiens a été estimée à 2,4 milliards de dollars, et elle impliquait environ 2645 producteurs réglementés. Cette même année, le Canada a produit 1,02 milliard de kg de poulet (poids net), dont 60% ont été produits dans les provinces du Québec et de l'Ontario. Quant à la consommation domestique canadienne, elle était de 30 kg par personne par année en moyenne (Diarra and Malouin, 2014). Plusieurs classes d'agents antimicrobiens sont approuvées comme additifs alimentaires pour les volailles : les glycolipides (bambermycine), les polypeptides (bacitracine), les ionophores (salinomycine), les  $\beta$ -lactames (pénicilline), les streptogramines (virginiamycine) et les tétracyclines (chlortétracycline) (Diarra and Malouin, 2014). Malheureusement, des estimations précises du volume d'antibiotiques spécifiquement utilisé comme promoteur de

croissance dans les productions animales canadiennes font défaut. Selon l'Institut canadien de la santé animale, entre 1,6 et 1,8 million de kg d'antimicrobiens ont été distribués au Canada pour être utilisés chez les animaux chaque année (données récoltées entre 2006 et 2009). Plusieurs études ont également démontré la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques chez la volaille canadienne (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *Enterococcus sp.*, *C. perfringens*) (Diarrassouba *et al.*, 2007; St-Amand *et al.*, 2013).

Différentes maladies peuvent subvenir dans les poulaillers et causer des pertes de poids, de la déshydratation et une hausse importante de la mortalité. Au Québec, trois micro-organismes sont responsables de la grande majorité des infections qui surviennent régulièrement dans l'élevage de poulets et elles causent d'importantes pertes économiques pour les éleveurs : *E. coli*, *Eimeria sp.* (coccidiose) et *Clostridium perfringens* (entérite nécrotique).

### 1.6.1 *Escherichia coli*

Toutes les espèces aviaires sont sensibles à la bactérie *E. coli*. C'est une infection extrêmement fréquente et de répartition mondiale. Ces bactéries à gram négatif font partie de la microflore normale du tractus digestif inférieur de nombreuses espèces aviaires et sont généralement présentes dans le contenu intestinal des oiseaux ( $10^4$  à  $10^7$  unités formatrices de colonie (UFC) par gramme). La bactérie *E. coli* colonise également le tractus respiratoire supérieur (pharynx et trachée) et peut être isolée à partir de la peau et des plumes, selon le niveau de contamination environnementale. La contamination des oiseaux par *E. coli* se produit généralement dans les premières heures suivant l'éclosion, et les souches se multiplient rapidement dans l'intestin (Dho-moulin and Fairbrother, 1999). La plupart des maladies associées à *E. coli* sont dues aux facteurs environnementaux et aux prédispositions de l'hôte (Dho-moulin and

Fairbrother, 1999). Les facteurs prédisposant la volaille sont : l'âge, le stress, le taux élevé d'ammoniac, une baisse de la température et la présence d'infections concomitantes. Par exemple, en présence de 25 ppm d'ammoniac il y a une augmentation de la sécrétion de mucus dans les voies aériennes des poulets et cela donne le feu vert aux agents pathogènes qui colonisent les animaux, se développent et causent des maladies. De plus, une exposition prolongée à 50 ppm de ce gaz entraîne une perte en moyenne de 243 grammes par animal (USDA-ARS Poultry Research Unit). La bactérie *E. coli* est principalement associée à des infections des voies respiratoires ou des infections systémiques, et entraîne une variété de maladies responsables de pertes économiques importantes chez les éleveurs. Il existe plusieurs formes de la maladie: localisées, septicémiques aiguës ou chroniques. Au Québec, les poussins sont particulièrement sensibles à la forme septicémique lors de leur arrivée au poulailler. Les infections des vitellus sont fréquemment observées vers la fin de la période d'incubation des œufs, généralement après une contamination fécale de la surface des œufs. Elles entraînent une mortalité embryonnaire ou la mort des jeunes oiseaux jusqu'à trois semaines après l'éclosion. La bactérie est également associée aux cellulites et aux dermatites nécrotiques de l'abdomen et des cuisses (Dho-moulin and Fairbrother, 1999). Différentes souches peuvent infecter les oiseaux au cours de leur vie. Puisqu'elle est une hôte normale du tractus digestif des volailles, les souches pathogènes peuvent se développer dès qu'un oiseau est malade.

### 1.6.2 La coccidiose

La coccidiose, chez les volailles, est considérée comme l'une des principales maladies affectant les performances dans les systèmes de production aviaire (Gussem, 2006). La coccidiose est une infection parasitaire causée par des protozoaires de la famille des *Eimeriidae*. L'espèce *Eimeria* appartient au phylum *Apicomplexa*, qui inclus

également diverses espèces bien connues dans le monde médical et vétérinaire comme *Cryptosporidium*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Theileria* et *Toxoplasma* (Lal *et al.*, 2010). Neuf espèces sont connues pour infecter les poulets, et elles montrent une grande variation dans leur pathogénicité (Hafez, 2008). Les neuf espèces pouvant affecter les poulets sont : *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria tenella*, *Eimeria praecox*, *Eimeria hagani*, *Eimeria mivati* et *Eimeria mitis* (Castañeda and González, 2015). Les différentes variétés d'*Eimeria* sont très spécifiques à leurs hôtes (Lillehoj and Lillehoj, 2000). Chaque espèce de parasite a une prédilection pour un site particulier dans le tractus gastro-intestinal. Par exemple, *E. acervulina* se développe dans le duodénum et l'ileum, *E. mitis* se développe uniquement dans l'ileum, *E. tenella* se développe dans le caecum, *E. brunetti* se développe dans le caecum et le rectum, *E. necatrix* se développe dans le jejunum, l'ileum et le caecum (Castañeda and González, 2015). Les espèces d'*Eimeria* qui sont signalées comme très pathogènes sont *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* et *E. tenella*.

Lors d'une infection par *Eimeria*, les protozoaires causent d'importants dommages à l'épithélium intestinal et il en résulte une inflammation sévère. Beaucoup de changements physiologiques s'ensuivent, comme un temps de passage de la nourriture prolongé, une baisse de la viscosité intestinale, une mauvaise absorption des nutriments, une augmentation de l'acidité et une baisse d'activité des enzymes digestives. L'infection provoque une perte de poids et une hausse de mortalité chez les poulets (Bozkurt, 2013). Lors d'une infection, la cause est liée très rarement à une seule espèce, mais plutôt à un mélange des neuf espèces d'*Eimeria* spécifiques aux poulets, en concentration très variable, ce qui rend le traitement d'autant plus complexe (Castañeda and González, 2015).

La coccidiose cause d'importantes pertes économiques en raison du mauvais taux de conversion alimentaire, du gain de poids réduit et de la mortalité accrue chez les poulets. Une grande densité de population et des contacts fréquents avec les matières



fécales présentes dans le milieu conduisent à une hausse de l'infection, et donc un nombre de mortalités très important (Bozkurt *et al.*, 2013). En outre, l'utilisation de médicaments anticoccidiens ou de vaccins pour le traitement et la prévention représentent un coût de production important pour les éleveurs (Hafez, 2008).

### 1.6.3 *Clostridium perfringens*

L'entérite nécrotique chez les poulets, rapportée pour la première fois par Parish en 1961, est une maladie entérique causée par *Clostridium perfringens*, une bactérie en forme de cône, anaérobique et à gram positif (Shojadoost *et al.*, 2012). Cette bactérie cause parfois de grands ravages dans les élevages de poulets un peu partout sur la planète. *C. perfringens* est un hôte fréquent du tractus gastro-intestinal, mais le nombre de bactéries chez les oiseaux sains et malades est très différent. Chez des animaux sains, la population de *C. perfringens* est habituellement inférieure à  $10^4$  UFC/g (unités formant des colonies par gramme d'intestin), par rapport à  $10^7$  à  $10^9$  UFC/g chez les oiseaux malades (Dahiya *et al.*, 2006). Plus de 800 sérotypes de *C. perfringens* sont connus et 17 fractions toxiques différentes ont été isolées chez cette bactérie (Hatheway, 1990). L'infection à *C. perfringens* se produit généralement chez les poulets entre deux à six semaines. La mortalité est parfois très élevée et peut atteindre un total de 10 à 40% de l'élevage. Chez les oiseaux, les signes cliniques incluent la dépression (état léthargique), la déshydratation, la diarrhée, les plumes ébouriffées et un apport alimentaire plus faible. Deux formes de la maladie sont décrites, soit la forme clinique et la forme sous-clinique (Songer, 1996; Keyburn *et al.*, 2010). La forme clinique aiguë classique de la maladie se caractérise par une augmentation soudaine de la mortalité des élevages, souvent sans signes apparents, bien que la litière humide soit parfois un indicateur précoce de la maladie (Timbermont *et al.*, 2011). La forme sous-clinique se présente comme une mauvaise

performance des individus (réduction de la croissance, réduction de l'efficacité alimentaire), mais peu de mortalité (Shojadoost *et al.*, 2012). À l'échelle mondiale, l'impact économique de la maladie est estimé à deux milliards de dollars américains chaque année en raison de la mortalité, des mauvaises performances et des coûts de prévention et de traitements de l'infection (Lovland *et al.*, 2001; Immerseel *et al.*, 2004).

Plusieurs facteurs prédisposent les élevages à l'entérite nécrotique. Un environnement intestinal qui favorise la croissance de la bactérie, tel que la présence de coccidiose, est le principal facteur de risque. La nature de l'alimentation est également un facteur important qui influence l'incidence de l'entérite nécrotique. Les diètes avec des taux élevés de polysaccharides non hydrosolubles (Timbermont *et al.*, 2011) et des concentrations alimentaires élevées de protéines animales (ex : farine de poisson) augmentent les risques (Drew *et al.*, 2004). Le stress et la présence d'ammoniac sont d'autres facteurs importants.

## CHAPITRE II.

### LA FORÊT BORÉALE, SOURCE POTENTIELLE DE PRODUITS ANTIBACTÉRIENS

## 2.1 Introduction

Les maladies infectieuses sont maintenant la deuxième plus grande cause de mortalité dans le monde, et de nombreux auteurs ont souligné que la découverte de nouveaux antibiotiques seraient nécessaires pour combattre ces agents pathogènes (Laxminarayan *et al.*, 2014; Assis *et al.*, 2017; Subramani *et al.*, 2017). Les plantes de la forêt boréales pourraient apporter des solutions encore trop négligées jusqu'à aujourd'hui. En effet, elles représentent une source riche de métabolites secondaires, tels que les quinones, les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les flavonoïdes et les polyphénols, qui sont dans certain cas utilisés comme mécanismes de défense contre les micro-organismes pathogènes (Subramani *et al.*, 2017).

Les plantes sont utilisées depuis des millénaires en médecine traditionnelle et les Amérindiens en faisaient particulièrement usage pour traiter une panoplie de problèmes de santé. La science moderne a démontré l'efficacité de certaines de ces plantes pour leurs vertus curatives. Par exemple, la griffe du diable (*Harpagophytum procumbens subsp. procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.) est utilisée depuis très longtemps par les populations d'Afrique du Sud pour traiter différentes maladies (Mncwangi *et al.*, 2012). Par ailleurs, des études scientifiques ont démontré l'activité de cette plante pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite et certaines maladies cardiaques (Wichtl and Bisset, 2000; Stewart and Cole, 2005). Elle est très souvent utilisée pour traiter l'arthrose en combinaison avec la glucosamine dans le domaine vétérinaire (Galowade). Également les Amérindiens utilisaient l'if du Canada (*Taxus canadensis*) en infusion principalement pour traiter les rhumatismes et pour les désordres internes. Des études scientifiques ont révélé la présence de paclitaxel, un composé utilisé dans le traitement du cancer (Li et al., 2013). Malgré l'efficacité reconnue de certaines de ces plantes, encore très peu de recherches se sont penchées sur leurs diverses propriétés médicinales. Deux types de produits issus de

plantes sont particulièrement connus pour leurs propriétés antibactériennes, les huiles essentielles et les résines.

## 2.2 Les résines

Il existe environ 600 espèces qui font partie de l'ordre des Coniférales et qui peuplent environ 80% des niches écologiques disponibles sur la terre (Scagel *et al.*, 1965). Le succès des conifères découle en grande partie de leurs systèmes de défense très évolués, qui leur permet de résister efficacement à la compétition interspécifique, aux pathogènes ainsi qu'à la prédation des herbivores. La plus connue de ces défenses est la sécrétion d'oléorésine, ou la résine, cette sécrétion visqueuse et odorante répandue sur les sites de blessure et d'infection de l'arbre (Phillips and Croteau, 1999). L'excrétion de résine fournit aux arbres une protection contre les infections bactériennes et fongiques (Rautio *et al.*, 2007). Elle est un mélange complexe de monoterpènes, de sesquiterpènes, d'acides diterpénoïdes et autres composés (Phillips and Croteau, 1999). L'oléorésine est composée de deux fractions principales : la fraction térébenthine (monoterpène, C10 et sesquiterpène, C15) et la partie 'colophane' (diterpène, C20). La fraction de térébenthine contient des composés reconnus pour leurs activités toxiques contre les insectes, les champignons et les bactéries (limonène, 3-carène, etc.) (Phillips and Croteau 1999). La fraction colophane est connue pour être riche en acides diterpéniques (C20) tricycliques de la famille des isopimaranes, des pimaranes et des abiétanes. Il s'agit essentiellement d'acides résiniques tels que l'acide abiétique, déhydroabiétique, isopimarique, lévopimarique, néoabiétique, 7-oxodéhydroabiétique, palustrique, pimarique, et sandaracopimarique.

Certains acides résiniques présents dans l'oléorésine ont démontré des effets antibiotiques contre les bactéries pathogènes pour l'homme comme *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *enterococcus faecalis* et *Streptococcus pyogenes* (Rautio *et al.*, 2007). L'étude menée par Rautio *et al.* (2007) a suggéré que la résine pourrait être un outil thérapeutique et clinique utile pour le traitement des plaies infectées. Également, l'étude de Mahady (2005) a conclu que les produits dérivés de la résine peuvent constituer des outils potentiels pour traiter les infections de la peau. Cependant, la résine a reçu peu d'attention dans la médecine moderne, entre autre en raison de sa nature hydrophobe, et les effets antibactériens contre les microorganismes cliniquement importants chez l'homme sont encore très peu connus. Dans une étude menée en 2009 sur l'effet de la résine de *Picea abies* sur la membrane de *S. aureus*, l'équipe du professeur Sipponen a montré que des changements morphologiques marqués se sont produits dans les parois cellulaires de *S. aureus* après exposition à la résine contre les bactéries gram positif. L'épaisseur de la paroi cellulaire a augmenté, les cellules ont eu tendance à s'agglutiner (Figure 2.1) et la mitose semble s'être arrêtée. Ces effets pourraient être une conséquence de la perte d'énergie et de l'inactivation du métabolisme cellulaire. L'équipe conclue que l'exposition des bactéries à la résine de *P. abies* affecte les structures de la paroi cellulaire et les fonctions membranaires dans les cellules bactériennes dans des conditions de culture, compatibles avec un effet bactériostatique de la résine.

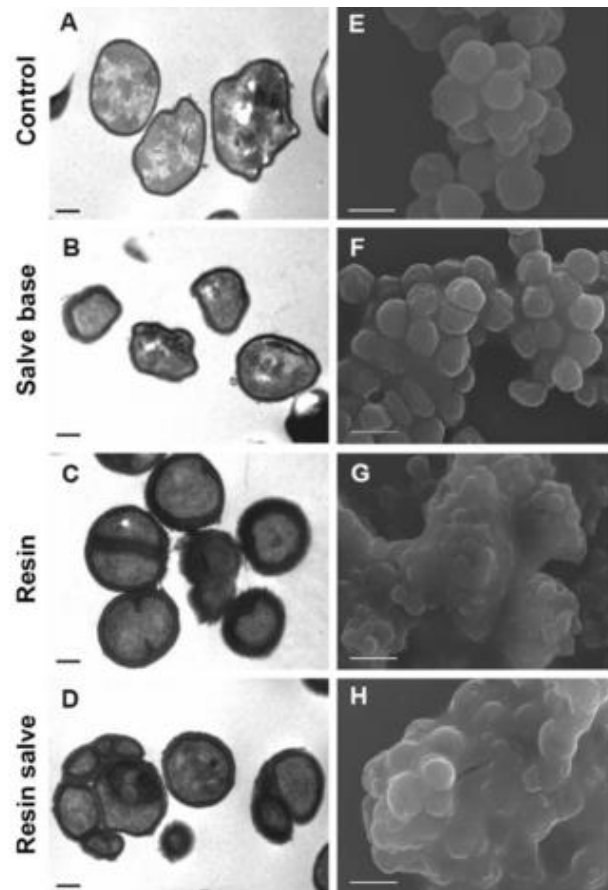


Figure 2.1: Variations dans la structure des cellules et des parois cellulaires de *S. aureus* (à gauche: microscopie électronique à transmission, TEM; à droite: microscopie électronique à balayage, SEM) après une exposition de 18 h à la résine de *Picea abies*, à la solution de dissolution ou à la base (E – H) Échelle: (A – D) 0,2  $\mu$ m; (E – H) 1,0  $\mu$ m (Siponnen, 2007).

Un autre type de résine est également utilisé par différentes espèces d'arbres pour la protection de leurs bourgeons au cours de l'hiver (exsudat), notamment par le genre *Populus* (peuplier), une espèce bien connue en Amérique du Nord. Une étude réalisée dans nos laboratoires a préalablement fait l'objet d'une vaste revue de littérature sur les composés présents dans la résine de bourgeons du genre *Populus* et elle a également démontré les propriétés antibactériennes des bourgeons de *Populus balsamifera*. L'équipe du LASEVE (UQAC) a par ailleurs isolé les composés responsables de cette activité, soit les balsacones (Lavoie *et al.*, 2013; Simard *et al.*, 2014). Pour ce projet de recherche, deux types de résines de la forêt Québécoise ont été étudiés: la résine de sapin baumier (*Abies balsamea*) et la résine de bourgeon du peuplier baumier (*Populus balsamifera*)

### **2.3 Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles (HE) ont gagné de l'attention au cours des dernières années en raison des propriétés antioxydantes, antiinflammatoires et antimicrobiennes qu'elles peuvent détenir (Bakkali *et al.*, 2008 ; Kumar and Tyagi, 2013 ; Miguel, 2010 ; Sobral *et al.*, 2014). Les huiles essentielles peuvent agir chez les plantes comme antibactériens, antiviraux, antifongiques, insecticides et protègent certaines plantes des herbivores. Il est possible de lister plus de 3000 HE, mais uniquement 10 % d'entre elles sont commercialisées, et ce en tant que remèdes naturels (médicaments à base de plantes d'usages traditionnels). (Bakkali *et al.*, 2008). Elles sont par contre largement utilisées dans les secteurs cosmétiques et alimentaires : parfums, crèmes, savons, produits sanitaires, dentisterie, conservateurs et additifs de saveur pour les aliments, dans les produits ménagers et solvants industriels (Burt, 2004).

Les principaux composants actifs des HE sont les terpènes (monoterpènes, diterpènes, sesquiterpènes), les phénols et les aldéhydes. Par exemple, l'origan, le thym, la sauge,



le romarin et le clou de girofle sont tous riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés phénoliques possèdent des activités antimicrobiennes reconnues (Burt, 2004). De plus, différents composés peuvent travailler en synergie et décupler l'effet de l'extrait (Senatore, 1996; Russo *et al.*, 1998). Beaucoup de ces composés semblent avoir un effet antibactérien principalement contre la membrane cytoplasmique cellulaire (Xu *et al.*, 2008; De Sousa *et al.*, 2012) (Figure 1.1). Des molécules analogues, comme le thymol et le carvacrol, peuvent exercer des effets antimicrobiens similaires, mais leur mécanisme d'action peut différer en raison de légèrement différent (Figure 2.2). Une autre molécule, le cymène, un précurseur du carvacrol, possède une haute affinité pour la membrane lipidique et peut permettre au carvacrol d'être plus facilement transporté dans la cellule, de sorte qu'un effet synergique soit obtenu lorsque les deux sont utilisés simultanément (Ultee *et al.*, 2002).

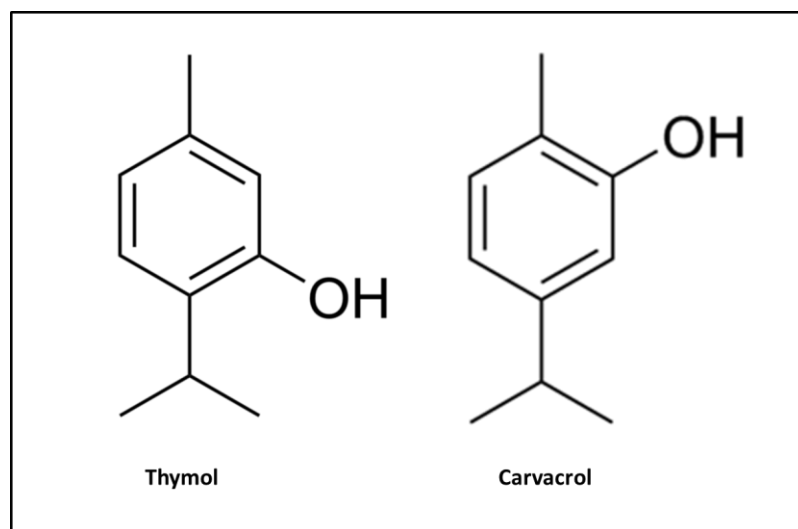


Figure 2.2 : Structure chimique du thymol et du carvacrol

## 2.4 Huiles essentielles dans l'alimentation des animaux d'élevage

Dans le domaine de l'alimentation animale, la communauté scientifique mondiale est consciente de la nécessité de trouver des solutions alternatives efficaces et adéquates aux antibiotiques en tant que stratégie essentielle pour contourner le défi de la résistance. Considérant la problématique des bactéries résistantes, la suppression progressive, voire l'interdiction totale d'utilisation des antibiotiques en nutrition animale au Canada devient impérative. Par conséquent, le développement de solutions de rechange doit être mis de l'avant. La pression publique et les préoccupations concernant la sécurité alimentaire et environnementale (résidus d'antibiotiques, propagation de gènes de résistance, pathogènes résistants aux antibiotiques, etc.) ont conduit à rechercher activement des approches alternatives qui pourraient éliminer ou diminuer l'utilisation d'antibiotiques tout en maintenant des rendements de production et une faible mortalité chez les animaux (Diarra and Malouin, 2014). Parmi toutes ces approches, les huiles essentielles provenant de plantes de la forêt Québécoise représentent un nouveau groupe intéressant d'additifs alimentaires qui pourraient se substituer efficacement aux antibiotiques. Certains mécanismes sont suggérés comme étant en partie responsables des actions bénéfiques chez les animaux, notamment i) la modification de la surface des cellules qui touchent à l'hydrophobie et, par conséquent, à la virulence des bactéries; ii) la stimulation du système immunitaire, notamment l'activation des lymphocytes, des macrophages et des cellules NK; iii) la protection de la muqueuse intestinale contre la colonisation par des bactéries pathogènes; et iv) la promotion de la croissance des bactéries bénéfiques telles que les *Lactobacilli* et *Bifidobacteria* (Vidanarachchi *et al.*, 2005; Windisch and Kroismayr, 2007).

Plusieurs études ont documenté les avantages des huiles essentielles sur la croissance et la survie des porcs et des volailles. Les études menées par les équipes de Franz *et al.*, (2009) et de Windisch *et al.*, (2007) ont rapporté les résultats obtenus par diverses

autres équipes chez les poulets et les porcs. Elles ont signalé que l'amélioration moyenne du gain de poids, de l'apport alimentaire et de la conversion alimentaire induite par certaines huiles essentielles était entre 0,9 et 3,0 % pour les porcelets et entre 0,5 et 2,6 % pour les poussins. Cette amélioration pourrait être apporté par des activités antibactériennes, anti-inflammatoires et antioxydantes de l'huile essentielle. La variabilité dans les résultats des différentes études peut être expliquée par l'origine et le type d'HE utilisées, la quantité ajoutée aux aliments et les conditions environnementales utilisées lors des essais (Zeng *et al.*, 2015). Également, il est généralement admis que les HE sont légèrement plus actives contre les bactéries gram positif que gram négatif (Senatore, 1996; Ouattara *et al.*, 1997; Smith-Palmer *et al.*, 1998; Burt, 2004; Brenes and Roura, 2010).

#### 2.4.1 Propriétés antioxydantes

Beaucoup d'huiles essentielles sont connues pour leurs propriétés antioxydantes, en raison principalement de leurs composés phénoliques (Craig, 1999; Nakatani, 2000; Franz *et al.*, 2009). Les huiles essentielles de certaines plantes comme la cannelle, la muscade, le clou de girofle, le basilic, le persil, l'origan, le poivre noir ou le thym possèdent des composés antioxydants tels que le thymol et le carvacrol (Edris, 2007). L'activité antioxydante des huiles essentielles ne peut être attribuée uniquement à la présence de composés phénoliques. Les alcools monoterpéniques, les cétones, les aldéhydes et les éthers peuvent également contribuer au piégeage des radicaux libres (Edris, 2007). Lors d'une infection, grâce à leur effet antioxydant, certains composés peuvent aider à protéger les tissus et les cellules et limiter les dommages de la paroi intestinale induits ce qui résulte en un intestin moins endommagé, une meilleure absorption des nutriments et, à terme, de meilleures performances (Bozkurt *et al.*, 2013). Les propriétés antioxydantes de nombreux composés phyto-gènes peuvent

également contribuer à la protection des lipides alimentaires contre les dommages oxydatifs, comme ceux généralement ajoutés aux régimes alimentaires (Windisch *et al.*, 2008). Également, le potentiel antioxydant de certains additifs alimentaires à base de plantes pour améliorer la préservation de la viande a déjà été démontré chez les volailles (Botsoglou *et al.*, 2004). Malheureusement, beaucoup d'extraits de plantes ayant des propriétés antioxydantes peuvent avoir un goût piquant ou désagréable, ce qui restreint leur utilisation en nutrition animale (Windisch *et al.*, 2008). De plus, le potentiel des huiles essentielles et des plantes aromatiques pour améliorer la stabilité face à l'oxydation de la viande a été démontrée dans une série d'études chez les poulets et les dindes (Botsoglou *et al.*, 2002; Giannenas *et al.*, 2005; Florou-Paneri *et al.*, 2006; Marcincak *et al.*, 2008). La viande de volaille est particulièrement sensible à la détérioration causée par l'oxydation des lipides. La préservation des lipides de la viande générée par une supplémentation alimentaire en huiles essentielles pourrait par conséquent se révéler particulièrement intéressante (Zeng *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 Propriétés anti-inflammatoires

Plusieurs huiles essentielles possèdent également de bonnes propriétés anti-inflammatoires. Par exemple, l'étude de Silva *et al.*, (2003) a mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* et d'*Ocimum gratissimum* par mesure de l'inhibition de production d'œdème chez le rat (induite par le carraghénane et le dextrane). Certains composés actifs reconnus comme anti-inflammatoires agissent en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation ou en empêchant la libération d'histamine. La capacité de l'extrait de plante ayant des propriétés anti-inflammatoires pourraient contribuer à diminuer les dommages causés par les micro-organismes à la paroi intestinale lors de réactions

pro-inflammatoires. Il en résulte donc une meilleure absorption des nutriments et un meilleur ratio de conversion des aliments (Bozkurt *et al.*, 2013).

#### 2.4.3 Innocuité

Les HE sont rapidement absorbées et métabolisées après une administration orale, pulmonaire, ou par voie cutanée, et elles sont généralement éliminées par les reins sous forme de glucuronides. Par conséquent, leur accumulation dans l'organisme est peu probable en raison de leur élimination rapide et de leur courte demi-vie. Par exemple, l'étude de Kohlert *et al.* (2000) mentionne que les composants des huiles essentielles sont rapidement éliminés avec une demi-vie d'environ 1 heure. Cependant, des études toxicologiques supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les effets de l'administration orale et des niveaux de dosage acceptable d'HE dans l'alimentation. En outre, la manipulation des formulations pures doit se faire en toute sécurité, car beaucoup sont potentiellement irritantes et peuvent provoquer une dermatite de contact (Burt, 2004).

#### 2.4.4 Propriétés antibactériennes

Une huile essentielle qui possède une bonne activité antibactérienne contre *E. coli* pourrait être utilisée afin de prévenir ou traiter les infections. Certaines huiles essentielles ont démontré leur efficacité contre cette bactérie, notamment les huiles essentielles de thym (Rivera *et al.*, 2015; Smith-Palmer *et al.*, 1998), d'origan (Rivera *et al.*, 2015; Sharopov *et al.*, 2015), de lavande (Hammer *et al.*, 1999), d'eucalyptus (Hammer *et al.*, 1999; Cimanga *et al.*, 2002), de menthe (Hammer *et al.*, 1999; Gupta and Saxena, 2010), de clou de girofle (Burt, 2004; Smith-Palmer *et al.*, 1998) et de cannelle (Smith-Palmer *et al.*, 1998).

De plus, l'activité antiparasitaire de certaines huiles essentielles est bien documentée (Janssen *et al.*, 1987; Mitsch *et al.*, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Mohsenzadeh *et al.*, 2011) et beaucoup de produits phytogènes sont considérés comme contribuant à la protection de l'épithélium intestinal contre les dommages causés par la coccidiose (*Eimeria* sp.) (Denli *et al.*, 2004). Des plantes aromatiques de la famille des Lamiaceae, et en particulier le thym et l'origan, montrent une activité contre *E. tenella* lorsque l'huile essentielle est incorporée dans le régime alimentaire des poulets (Giannenas *et al.*, 2003). En 2001, l'équipe de Evans *et al.* a étudié un mélange d'huile essentielle de clou de girofle, de thym, de menthe poivrée et de citron et elle a montré une réduction de l'excrétion d'oocystes (œuf encapsulé des protozoaires sporozoaires) chez les poussins nourris avec l'ajout de ce mélange à leur diète. En 2011, l'étude menée par Remmal *et al.*, a étudié 10 différentes HE (origan, artémise, thym, clou de girofle, romarin, arbre à thé, orange, menthe, verveine (*listea*) et cannelle) contre les oocytes de *Eimeria*. Parmi ces dernières, quatre ont montré des propriétés anticoccidiennes : l'artémise, l'arbre à thé, le thym et le clou de girofle ont tous un IC<sub>50</sub> inférieur à 1 mg/ml. Une autre étude menée dans leur laboratoire sur l'action de ces quatre HE chez des poulets infectés expérimentalement a donné des résultats préliminaires qui confirment leur action anticoccidienne, sans apparition de résistance, sans récurrence après l'interruption du traitement, et sans aucun problème de goût ou de toxicité pour les poulets. Le carvacrol et le thymol sont également considérés comme possédant une activité anticoccidienne. Les résultats *in vitro* ouvrent également la possibilité pour utiliser ces huiles essentielles dans la désinfection des locaux d'élevage où il y a eu un épisode de coccidiose, même en présence de poulets infectés.

Finalement, plusieurs recherches ont déjà été menées sur certains extraits de plantes et huiles essentielles pour traiter l'entérite nécrotique, et elles nous ouvrent la porte sur certaines pistes très intéressantes. Selon une étude menée en 2003 par Saini *et al.*,

Orego-Stim®, un mélange de cultivars spécialement sélectionnés d'*Origanum vulgare*, a été très efficace pour réduire la sévérité de l'entérite nécrotique. L'étude de Mitsch *et al.*, (2002) a constaté que l'utilisation de Crina® (Crina®, Crina SA, Gland, Suisse), une préparation commerciale d'huile essentielle (dont le composant majoritaire est *Thymus vulgaris*), diminue le nombre intestinal de *C. perfringens* de façon significative chez les poulets aux jours 14, 21 et 30. Une seconde étude de cette équipe a démontré que des mélanges spécifiques de composants d'huiles essentielles contenant du thymol, du carvacrol, de l'eugénol, de la curcumine et de la pipérine peuvent contrôler la prolifération de *C. perfringens* dans l'intestin des poulets (Mitsch *et al.*, 2004). Ce contrôle permettrait, par conséquent, de réduire le risque d'entérite nécrotique. Ils ont suggéré que l'effet antibactérien de l'huile essentielle *in vitro* serait dû à l'effet de la stimulation des enzymes digestives, à la stabilisation de la microflore intestinale et à l'inactivation des toxines de *C. perfringens*. Également, l'équipe de Si *et al.*, en 2009 a évalué le potentiel de 66 composés et huiles essentielles dans l'inhibition de la croissance de *C. perfringens* pour le contrôle de l'entérite nécrotique chez les poulets. Neufs composés ou huiles essentielles se sont révélés très intéressants pour le contrôle de l'infection, soit : l'huile essentielle de cannelle, l'huile essentielle de clou de girofle, le 2-tert-butyl-4-méthylphénol, le mandelonitrile, l'eugénol, le géraniol, le m-anisaldehyde, le carvacrol et le thymol.

À ce jour, aucune de ces stratégies alternatives n'a encore été systématiquement mise en œuvre pour remplacer les antibiotiques en nutrition animale. Des investissements considérables dans la recherche sont encore nécessaires avant que l'une des possibilités ci-dessus ne soit commercialement disponible à l'échelle mondiale. Les huiles essentielles ont un très grand potentiel, mais il y a un immense besoin de développer une approche systématique permettant d'évaluer leur efficacité, leurs modes d'action et la dose de substance active nécessaire pour avoir une bonne activité. En outre, des facteurs tels que l'espèce, les conditions climatiques, le moment

de la récolte, la partie de la plante utilisée et la méthode d'extraction de l'HE affectent tous grandement la composition chimique finale (Aboukhalid *et al.*, 2017). Par conséquent, l'exploration de nouvelles approches pour prévenir les maladies chez les volailles et la colonisation de celles-ci par des agents pathogènes d'origine alimentaire se poursuivent dans le monde entier. Par contre, la faible disponibilité des matières premières (huiles essentielles) et le coût de production plus élevé pour l'obtention de ces produits en grande quantité pourraient être un obstacle important à leur utilisation dans les fermes d'élevage. En contrepartie, le coût pourrait en valoir la peine si l'on considère que ces alternatives sont respectueuses de l'environnement, des producteurs et des consommateurs (Castañeda and González, 2015).

Dans le cadre de ce projet de thèse, plusieurs plantes de la forêt boréale ont été investiguées en raison soit de leurs utilisation par les Amérindiens pour stimuler l'appétit ou encore pour leurs propriétés antibactériennes : *Achillea millefolium* L., *Comptonia peregrina* L., *Epilobium angustifolium* L., *Ledum groenlandicum* Retzius, *Monarda didyma* L., *Myrica gale* L., *Pinus strobus* L., *Prunus virginiana* L., *Rhus typhina* L., *Tanacetum vulgare* L., *Thuja occidentalis* L. et *Tussilago farfara* L. (Moerman, 1998). Suite aux tests préliminaires (rendement d'huile essentielle et activités antibactériennes), trois espèces de la forêt boréales semblent posséder des huiles essentielles particulièrement intéressantes, il s'agit du tussilage (*Tussilago farfara* L.), de la tanaïsie vulgaire (*Tanacetum vulgare* L.) et de la monarde didyma (*Monarda didyma* L.).



## 2.5 Propriétés antibactériennes des composés hydrophobes

Une des principales lacunes qui continue encore à poser des problèmes dans l'étude de ces extraits (huiles essentielles et résines) est l'évaluation des propriétés antibactériennes des composés hydrophobes. Les deux méthodes préconisées présentement pour évaluer l'activité antimicrobienne sont: i) la méthode de diffusion sur disque de gélose ii) la méthode de dilution en milieu liquide (Morris *et al.*, 1979; Janssen *et al.*, 1987; Carson and Riley, 1995; Smith and Navilliat, 1997; Felten *et al.*, 2002; Valgas *et al.*, 2007). La méthode de diffusion sur disque utilise des petits disques absorbants ou différentes concentrations de produits antibiotiques ont été déposées en quantité prédéterminée. Cette méthode permet d'investiguer le niveau de sensibilité d'une bactérie à un composé spécifique (EUCAST, 2013). Ce test est réalisé en effectuant un étalement bactérien sur un pétri contenant du Nutrient-Brot-Agar. Les disques contenant les composés en différentes concentrations sont alors déposés sur la gélose d'Agar. Les pétris sont incubés 24 h à 37°C afin d'obtenir les résultats. L'inhibition de la croissance autour de chaque disque est ensuite mesurée et le diamètre de la zone est relié à la sensibilité des bactéries. Le résultat obtenu avec cette méthode est qualitatif : les bactéries peuvent être sensibles, intermédiaires ou résistantes (EUCAST, 2013). En contrepartie, un composé ou un extrait hydrophobe ne pourra pas diffuser adéquatement et uniformément sur le disque de gélose, et les résultats obtenus risquent fort d'être biaisés. Pour le test de dilution, les micro-organismes sont testés selon leur habilité à produire une croissance visible dans un bouillon de culture contenant différentes concentrations de composés antibactériens (EUCAST, 2000). Avec cette méthode, les composés hydrophobes ne peuvent se mélanger uniformément au bouillon nutritif et risquent par conséquent de biaiser les résultats. En effet, les résultats obtenus pour les composés hydrophobes avec la méthode de dilution en milieu liquide sont très variables, autant au niveau de la croissance microbienne, de l'exposition des micro-organismes aux produits, de la

solubilité des extraits et de ses composants et de la quantité d'émulsifiant (stabilisateur de l'émulsion) utilisée (Hammer *et al.*, 1999).

Par conséquent, l'utilité de ces méthodes est très limitée en raison de la nature hydrophobe des extraits, empêchant d'une part la diffusion uniforme de ces substances à travers la gélose et de l'autre la dissolution uniforme des composés dans le milieu liquide (Janssen *et al.*, 1987; Carson and Riley, 1995). Il a été démontré que ces techniques sous-estimaient l'efficacité des huiles essentielles contre les bactéries (Morris *et al.*, 1979; Chand *et al.*, 1994). La nécessité de mettre au point une méthode standard et reproductible pour déterminer les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et des résines a été soulignée par plusieurs auteurs (Mann and Markham 1998, Hood *et al.*, 2003, Othman *et al.*, 2011).

## **2.6 Hypothèse**

Différents extraits et composés issus de la forêt Québécoise possèdent des propriétés antibactériennes qui pourraient permettre de remplacer les antibiotiques en nutrition animale et de développer de nouveaux produits antibiotiques.

## 2.7 Objectifs

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'identifier et de développer des extraits et des composés de la forêt Québécoise possédant des propriétés antibactériennes afin de remplacer les antibiotiques en nutrition animale et de développer de nouveaux produits antibiotiques.

Pour ce faire les objectifs spécifiques suivants seront réalisés :

1. Mettre au point un test qui permet de déterminer l'activité antibactérienne de matrices et composés hydrophobes
2. Analyser l'activité de la résine complète et des composés majoritaires d' *Abies balsamea* L.
3. Évaluer l'activité antibactérienne d'huiles essentielles sélectionnées, caractériser leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques *in vitro*. Tester l'huile essentielle la plus active *in vivo* chez les poulets d'élevage.
4. Caractériser l'activité antibactérienne de la balsacone C issue de l'exsudat de bourgeons de *Populus balsamifera* L. et déterminer son mécanisme d'action.

## 2.7 Structure de la thèse

Le premier chapitre de ce projet de thèse présente la problématique grandissante de la résistance aux antibiotiques dans le domaine hospitalier et dans le domaine de l'élevage animal. Le second chapitre présente une revue de littérature sur la possibilité d'utilisation des plantes issus de la forêt boréale, plus spécifiquement la résine et les huiles essentielles, comme substitut aux antibiotiques. Ce chapitre est divisé en trois parties, soit une première partie sur la forêt boréale en général, une seconde partie sur les résines et la dernière sur les huiles essentielles.

Le troisième chapitre présente un article scientifique publié en 2016 dans *Journal of Ethnopharmacology*. L'article porte sur le développement d'une nouvelle méthode simple et rapide pour analyser l'activité antibactérienne des composés et matrices hydrophobes. L'article analyse également l'activité antibactérienne de la résine entière et des composés majoritaires de sapin baumier (*Abies balsamea* L.).

Le quatrième chapitre présente un article scientifique qui porte sur l'huile essentielle de tanaïsie vulgaire (*Tanacetum vulgare* L.) pour remplacer les antibiotiques en nutrition animale. Sa composition chimique et ses activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et cytotoxiques ont été déterminées. Bien que cette huile essentielle possède des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoire *in vitro*, elle n'a pas été sélectionnée pour les tests *in vivo*. Les résultats *in vitro* complets ont été publiés dans la revue *Medecines* en 2017.

Le cinquième chapitre présente un article qui a été publié dans le journal *Natural Product Research* (NPR) en 2018. Ce chapitre fait suite aux travaux préliminaires réalisés dans le cadre du mémoire de Mme Marie-Anne Boucher, déposé à l'UQAC en 2015, où la composition chimique de l'huile essentielle avait été analysé. Dans cette thèse, l'huile essentielle du tussilage (*Tussilago farfara* L.) a été analysée pour ses activités antibactériennes, cytotoxiques, et celles des composés majoritaires afin

de remplacer les antibiotiques en nutrition animale, mais elle n'a pas été retenue pour les tests *in vivo*.

Le sixième chapitre présente les résultats obtenus avec l'huile essentielle de monarde didyma (*Monarda didyma* L.) Sa composition chimique et ses activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et cytotoxiques *in vitro* ont été évaluées dans un premier temps. En raison des très bonnes activités antibactériennes obtenues *in vitro* contre *S. aureus*, *E. coli* et *C. perfringens*, l'huile essentielle a également été testée *in vivo* dans la diète des souris en laboratoire avec l'obtention de résultats positifs et significatifs. Elle a par la suite été testée directement chez des poulets d'élevages, dans un poulailler expérimental. Les résultats de ce chapitre seront soumis prochainement dans la revue scientifique *Poultry Science*.

Le septième chapitre est rédigé sous forme d'article scientifique et a été accepté pour publication dans la revue scientifique *Frontiers in microbiology* en septembre 2019. Ce chapitre caractérise dans un premier temps une banque de SARM provenant de l'hôpital de Chicoutimi. L'activité antibactérienne de la balsacone C, issue de la résine de bourgeons de peuplier baumier, a été évaluée contre la banque de SARM ainsi que dix autres bactéries pathogènes. La balsacone C possède une très bonne activité contre les SARM et semble sélectif envers les bactéries gram-positif. Le mécanisme d'action du composé a été élucidé en partie par la mesure de l'intégrité membranaire, le relâchement de constituants intracellulaire dans le milieu et par microscopie électronique à balayage. Les résultats de ce chapitre sont très importants et pourraient mener au développement d'un antibiotique issu du métabolite secondaire des végétaux.

Finalement, le huitième chapitre présente la conclusion générale de cette thèse et les perspectives futures pour chaque extrait antibactérien provenant de la forêt boréale.

CHAPITRE III.

NEW ANTIBACTERIAL HYDROPHOBIC ASSAY REVEALS *ABIES BALSAMEA*  
OLEORESIN ACTIVITY AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND MRSA.

**Published research paper**

Title: New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA.

Authors: Héloïse Coté, Marie-Anne Boucher, André Pichette, Benoit Roger, and Jean Legault\*

Affiliation :

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7G 4B7, Canada.

Keywords: Balsam fir, *Abies balsamea*, oleoresin, resin, gum, antibacterial activity, resin acids

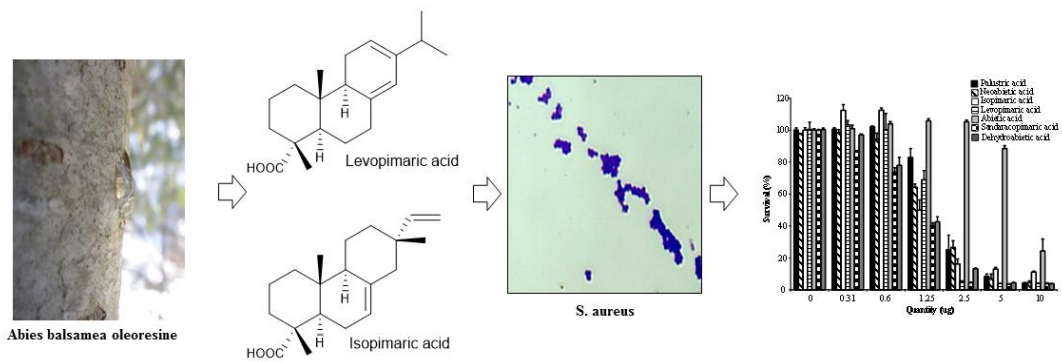
Coté, H., M. Boucher, A. Pichette, B. Roger, and J. Legault. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Journal of Ethnopharmacology* 194:684–689.

## RÉSUMÉ

La résine de sapin baumier (*Abies balsamea* L.) est traditionnellement utilisée par les Amérindiens pour soigner les coupures, brûlures et éraflures afin d'éviter les risques d'infections. Cet article vise à valider l'activité antibactérienne de la résine de sapin baumier (*Abies balsamea*) *in vitro*, tester son activité contre des bactéries résistantes aux antibiotiques et déterminer les composés responsables de l'activité. Pour se faire, un nouveau test qui permet d'évaluer l'activité antibactérienne des composés et matrices hydrophobes a été développé. Le nouveau test adapté aux composés et matrices hydrophobes (Antibacterial Hydrophobic Assay, AHA) est adapté aux plaques 96 puits et permet de déterminer rapidement l'activité antibactériennes des composés (hydrophiles et hydrophobes). D'autre part, l'analyse de la résine a été effectuée à l'aide d'un GC-MS et d'un GC-FID afin d'identifier les composés majoritaires. La résine est principalement constituée de monoterpènes (28%), sesquiterpènes (2%), et diterpènes (45%). Les résultats ont démontré que la résine est inactive contre *Escherichia coli* mais possède une activité contre les *Staphylococcus aureus* sensible et ceux résistants (SARM). Les acides résiniques (7) présents dans la résine sont en grande partie responsables de l'activité antibactérienne, principalement l'acide lévopimarique et isopimarique. En conclusion, cette étude a permis de développer un nouveau test adapté aux matrices et composés hydrophobes et soutient l'usage de la résine par les Amérindiens.



## GRAPHICAL ABSTRACT



**ABSTRACT**

*Ethnopharmacological relevance:* Oleoresin of *Abies balsamea* (L.) Mill. was used by native Americans of the boreal forest of Canada and French Canadians to treat various infections, suggesting that oleoresin has antibacterial properties. *Aim of the study:* In this study, the antibacterial activity of whole oleoresin from *A. balsamea* was investigated against *E. coli*, *S. aureus* and two methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains using a new sensitive assay developed to evaluate hydrophobic matrix and compounds. *Materials and methods:* Antibacterial activity of oleoresin was first investigated using dilution and disk diffusion methods against *E. coli* and *S. aureus*, and compared to a new sensitive assay for hydrophobic matrix. Moreover, whole oleoresin was analyzed by GC-MS to characterize the composition and to identify the compounds responsible of the antibacterial activity. *Results:* The results showed that whole oleoresin was inactive against Gram-negative *E. coli* (MIC<sub>90</sub> >90 µg/ml) but active against Gram-positive *S. aureus* and MRSA with MIC<sub>90</sub> ranging from 18.2 to 30 µg/ml. The oleoresin is mainly composed of monoterpene (28%), sesquiterpenes (2%), and diterpenes (45%). Resin acids were found, in part, responsible for the antibacterial activity of whole oleoresin. Isopimaric acid and levopimaric acid are the most active with a MIC<sub>90</sub> of respectively 9.7 µg/ml and 10 µg/ml. *Conclusion:* This study supports the use of oleoresin of *A. balsamea* by the native Americans and French Canadians to treat bacterial infections due to *S. aureus*.

## 1. INTRODUCTION

Native Americans have treated various ailments and diseases with medicinal plants for thousands years (Moerman, 1998; Uprety et al., 2012). Balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.), especially its oleoresin (gum), was among the most commonly used by many different Amerindian nations including: Abenaki, Algonquin, Chippewa, Cree, Iroquois, Malecite, Menominee, Micmac, Ojibwa, Penobscot, and Potawatomi (Moerman, 1998; Uprety et al., 2012). As example, Abnaki used fir gum for 'slight' itches and as an antiseptic (Rousseau, 1947). Algonquin made poultice of gum and applied on open sores, insect bites, boils and infections (Black, 1980). Cree made also poultice of gum to apply to cuts (Leighton, 1985). Iroquois infused gum and hot milk and used it as an antiseptic for colds (Rousseau, 1945). Menominee used liquid balsam pressed from trunk for colds and also applied to sores (Smith, 1923; Densmore, 1932). Ojibwa used balsam gum for skin sores and for eyes sores. Also, bark gum taken for chest soreness from colds and also applied to cuts (Smith, 1932; Hoffman, 1891). Potawatomi used fresh balsam gum swallowed for colds and as a salve for sores (Smith, 1933; Moerman, 1998). On the other hand, the fir gum is one of the essential items of folk medicine of French Canadians, who used it, and rightly so, as scurvy, as an antiseptic in wounds, and poultices for burns (Marie-Victorin, 2002). Still now, among the first Nation Innu Matimekush-Lac-John, the fir balsam (Pitshuatiku) was used as a poultice for treating rheumatism and neuralgia, and it treats the inflammation of mucous membranes and skin ulcers.

The applications reported in the literature strongly suggest that the oleoresin from *A. balsamea* may have antibiotic properties. Despite this evidence, to the best of our knowledge, no study has validated, *in vitro*, the antibacterial activity of whole oleoresin.

In this study, a new antibacterial assay appropriated for hydrophobic matrix as *A. balsamea* oleoresin was developed and its antibacterial activity was evaluated against *E. coli*, *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The chemical composition of oleoresin was also characterized and antibacterial activity of most compounds was tested using antibacterial hydrophobic assay.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Oleoresin and chemicals*

*A. balsamea* oleoresin was supplied by SAPINO (Montréal, Qc, Canada). The plant was identified at the Université du Québec à Chicoutimi by a botanist, M. Patrick Nadeau. Voucher specimens of *A. balsamea* (QFA0616716) was also deposited at the Herbarium Louis-Marie of Université Laval, Québec, Canada. Standards compound used for GC analyzes or biological tests were supplied by Sigma-Aldrich ( $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\delta$ -3-carene, limonene,  $\alpha$ -terpineol, bornyl acetate, longifolene,  $\beta$ -bisabolene, abietic acid, methyl caprilate, and methyl palmitate), Helix Biotech corporation (sandaracopimaric acid, isopimaric acid, palustric acid,

levopimaric acid, neoabietic acid), and Pfaltz & Bauer, inc. (dehydroabietic acid). The antibiotics tested were chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, penicillin, trimethoprim, and vancomycin (Sigma).

## 2.2. Bacterial strains

The *in vitro* antimicrobial activities of *A. balsamea* oleoresin were tested against Gram-negative *E. coli* (ATCC 25922), Gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923), and two different methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from Chicoutimi hospital, Saguenay, Canada. Identification of *S. aureus* was performed using the Slidex Staph-Kit (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) according to the manufacturer's instructions. Quality control was performed with MRSA strain ATCC 43300 and *S. aureus* strain ATCC 25923. A latex agglutination (SLIDEX) test detecting methicillin resistance in Staphylococci based on the production of low-affinity PBP2a, which is encoded by the *mecA* gene, was performed on both MRSA strains (data not shown).

### 2.3. Culture methods

Bacteria were stored at -80°C. All micro-organisms were first left 16–18 hours at 37°C in Nutrient Broth base (NB, Difco). Cellular density of inoculum was obtained by optical densities measured at 600 nm for *E. coli* (Pal et al. 2007) and 660 nm for *S. aureus* (Kaatz et al. 2000) using a Multiscan go UV/Vis microplate spectrophotometer (Labsystems). Inoculum was re-diluted in NB to obtain the required bacterial concentration.

### 2.4. Standard disk diffusion and broth microdilution assays

Antibacterial activity of each antibiotic was first investigated using dilution and disk diffusion methods against *E. coli* and *S. aureus* at different concentrations. First, disk diffusion methods use antibiotic-impregnated wafers on agar disk to investigate whether particular bacteria are susceptible to specific antibiotics (EUCAST, 2013). The test is performed by applying a bacterial inoculum to the Nutrient broth agar plate. Fixed concentrations of antibiotics are applied on paper disks, and then placed on the inoculated agar surface. Plates are incubated for 24 h at 37°C prior to obtaining the results. The growth inhibition zones around each disk are measured and the diameter of the zone is related to the bacteria susceptibility. The results of the disk diffusion test are “qualitative”; in terms of susceptibility: susceptible, intermediate, or resistant (EUCAST, 2013).

Subsequently, with regard to dilution test, microorganisms are tested for their ability to produce a visible growth of broth microdilution containing dilutions of the antimicrobial agent in microplate wells (EUCAST, 2000). The broth dilution test was evaluated using the method described by Banfi *et al.* (2003). Briefly, growing bacteria were plated in 96-well plates (Costar, Corning Inc.) in 50  $\mu$ l nutrient broth (Difco). Increasing concentrations of antibiotics (diluted in methanol) were then added to a maximum concentration of 16  $\mu$ g/ml (100  $\mu$ l per well). The final concentration of methanol in the culture medium was maintained at 0.1% (v/v) to avoid solvent toxicity. Microplates were incubated for 6 h at 37°C. Absorbance was measured after 6 h at 540 nm using an automated Varioskan Ascent plate reader. The minimal inhibiting concentration (MIC) was determined as the lowest concentration to result in 90 % inhibition of bacterial growth.

#### *2.5. Antibacterial hydrophobic assay (AHA)*

New antibacterial assay adapted for hydrophobic compounds was developed to evaluate oleoresin activity. First, 100  $\mu$ l of Nutrient Agar were distributed in 96-well plates and were kept at room temperature for 1 hour. A volume of methanol (20  $\mu$ l) containing growing concentrations of commercial antibiotics (0.0019 to 16  $\mu$ g/ml), oleoresin (1.4 to 90  $\mu$ g/ml) and compounds (0.7 to 45  $\mu$ g/ml) were distributed on the Nutrient Agar of 96-well plates. Then, 96-well plates were kept at room temperature for 2 hours or until solvent was completely evaporated. Bacterial stains (20  $\mu$ l)

including *E. coli*, *S. aureus* and MRSA was added at concentration of  $5 \times 10^3$  colony forming units CFU/ml of nutrient broth. Bacterial suspension without treatment was used as negative control (where maximal growth was observed) and bacterial suspension plus solvent was tested in parallel to demonstrate absence of solvent toxicity. Blank consisted of culture medium only and was subtracted from all subsequent measurements of every other wells. 96-well plates were then incubated at 37°C for 5 hours for bacterial growth. Then, 100 µl of resazurin sodium salt solution 50 µg/ml (Sigma R-2127) was added in each well and fluorescence was read, after 2 hours for *S. aureus* and MRSA, and 3 hours for *E. coli*, on automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm respectively. MIC<sub>90</sub> was expressed as the lowest concentration inhibiting 90 % of bacterial growth.

## 2.6. Oleoresin distillation

*A. balsamea* oleoresin (9.6 g) was distilled with a Clevenger apparatus. Oleoresin was distilled for 1 h with approximately 20 ml of distilled water and two fractions were collected: the essential oil and the residue.



### 2.7. Sample preparation for GC analysis

Before GC analysis, *A. balsamea* oleoresin was methylated using the following method: 300 mg of diazald (N-methyl-N-nitroso-*p*-toluenesulfonamide) were solubilised in 5 ml of diethyl ether in a reaction tube. 5 ml of an aqueous solution of sodium hydroxide at 500 mg/ml were added and the reaction tube was tightly closed with a cap fitted with a glass tube immersed in this mixture, and a rubber hose connected to another glass tube introduced in a second reaction tube kept in ice. A stream of nitrogen was bubbled into the first reaction tube mixture (diazald and sodium hydroxide mixture) and 6 ml of methanol were gradually added to the mixture to initiate the production of diazomethane which was brought to the second reaction tube through a nitrogen stream. This stream of diazomethane was bubbled in a solution of *A. balsamea* oleoresin or composed of extracts dissolved in chloroform (second reaction tube) until it turned yellow. Samples were then considered as entirely methylated and quickly analyzed by GC.

For qualitative analysis, 1g of oleoresin, 500 mg of essential oil and 500 mg were dissolved in 20 ml of chloroform, methylated, and analyzed by GC-MS. For quantitative analysis, 50 mg of methyl caprilate and 50 mg of methyl palmitate (internal standards) were added to each sample before methylation; these solutions were then analyzed by GC-FID.

### 2.8. *Qualitative analysis*

Qualitative analysis were carried out on an Agilent GC-MS comprising a 7890A GC system fitted with a split/splitless inlet, a GC sampler 80, and a 5975C MSD (EI mode 70 eV). Separations were performed on an Agilent DB-5MS capillary column (30 m × 250 μm id × 0.25 μm film thickness) with 1 ml/min of helium as carrier gas and the following temperature setting: 60°C held for 2 min, then 60°C to 325 at 10°C/min and 325 held for 60 min. Injections were performed in split mode 20:1. Inlet, transfer line, MS source and MS quadrupole temperatures were set at 280°C, 300°C, 230°C and 150°C, respectively. Compounds were identified by their retention index, mass spectra using Wiley 6n and NIST08 database and standard injection when available.

### 2.9. *Quantitative analysis*

Quantitative analysis were carried out on an Agilent 7890A GC-FID system fitted with a split/splitless inlet and an automatic liquid sampler. Separations were performed on the same capillary column using the same method as qualitative analysis. Identified compounds were quantified using an internal standard calibration method with two standards: methyl caprilate for mono- and sesquiterpenes, and methyl palmitate for diterpenes. Relative response coefficients (K) between quantified terpenes and internal standards were experimentally determined with triplicate analysis of limonene / methyl caprilate solutions ( $K_{\text{monoterpenes/m.caprilate}} =$

0.67), longifolene / methyl caprilate solutions ( $K_{\text{sesquiterpenes/m.caprilate}} = 0.68$ ) and methyl neoabietate / methyl palmitate solutions ( $K_{\text{diterpenes/m.palmitate}} = 0.85$ ).

### *2.10. Statistical analysis*

For statistical analysis, two-way ANOVA followed by post-test Student-Newman-Keuls will be performed using the SigmaStat ® software (Systat Software Inc, California, USA). The differences are statistically significant when  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Oleoresin is a complex hydrophobic matrix produced by several conifers as *A. balsamea* to protect tree against infections (Holbom et al., 2008; Zulac et al., 2010). As previously mentioned, Aboriginal people of the boreal forest of Canada and French Canadian using oleoresin from *A. balsamea* to treat various skin bacterial infections. Kizil et al. (2002) has demonstrated, with the disc diffusion method, that powdered oleoresin of *Abies cilicia* has an antibacterial activity against most bacteria. However, to the best of our knowledge, no study confirmed the antibacterial activity of *A. balsamea* oleoresin. The main objective of this study was to evaluate antibacterial activity of whole oleoresin from *A. balsamea* to confirm their ethnopharmacologic use against bacterial infections.

Firstly, the antibacterial property of whole oleoresin was evaluated against Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *S. aureus* bacteria using classical methods including disc diffusion and microdilution assays. The results, presented in Table 3.1, are expressed as bacterial susceptibility (susceptible, intermediate, or resistant) for the disc diffusion assay (CLSI, 2007) and as the minimal inhibition concentration inhibiting 90% of the bacterial growth (MIC<sub>90</sub>) for the microdilution assay. As expected, the results obtained using disc diffusion correspond with those obtained by the microdilution assay. The susceptibility of *E. coli* was found intermediate or resistant for all antibiotics except for chloramphenicol (S) and ciprofloxacin (S) while

*S. aureus* was sensitive to all antibiotics with the exception of gentamycin (I) and erythromycin (I). Unfortunately, whole oleoresin of *A. balsamea* was not found active against both bacteria using conventional methods. These negative results suggest that the antibiotic activity of the oleoresin may not be revealed using classical methods, probably due to the highly hydrophobic nature of the latter and of its components. Consequently, a new antibacterial assay more suitable for hydrophobic matrix as oleoresin and its components has been developed to evaluate antibiotic activity.

In this new antibiotic hydrophobic assay (AHA), whole oleoresin was first solubilized in methanol and deposited directly on nutrition broth agar in 96-wells plate before evaporation at room temperature. The bacteria was then added on the agar and quantified after 5 hours using resazurin. The antibacterial activity of whole oleoresin of *A. balsamea* and eight commercial antibiotics, including: penicillin, gentamycin, erythromycin, trimetoprim, vancomycin, chloramphenicol, clindamycin and ciprofloxacin, were evaluated against *E. coli* and *S. aureus* using AHA. The results were compared with standard disc diffusion (EUCAST, 2013) and microdilution assays (Banfi et al., 2003).

For *E. coli*, the MIC<sub>90</sub> of commercial antibiotics ranges from 0.005 to 15 µg/ml. As previously determined with microdilution assay, *E. coli* was found sensitive to gentamycin, chloramphenicol and ciprofloxacin with MIC<sub>90</sub> ≤ 1 µg/ml and relatively

resistant to penicillin, erythromycin and clindamycin with MIC<sub>90</sub> ranging from 10 to 15 µg/ml. Surprisingly, *E. coli* was found sensitive to vancomycin using AHA with a MIC<sub>90</sub> of 0.005 µg/ml in comparison with a MIC<sub>90</sub> >16 µg/ml using microdilution assay. For *S. aureus*, all antibiotics tested were found active with a MIC<sub>90</sub> ranging from 0.005 µg/ml to 5 µg/ml. At the exception of trimetoprim, the antibacterial activity (MIC<sub>90</sub>) is relatively similar to those obtained using the microdilution assay. As example, the MIC<sub>90</sub> of gentamycin, clindamycin and chloramphenicol using AHA are respectively 0.005, 0.013 and 0.73 µg/ml in comparison with 0.004, 0.017 and 0.98 µg/ml using microdilution assay. Altogether, these results indicate that AHA developed for hydrophobic matrix can also measure efficiently the antibacterial activity of commercial antibiotics.

Antibacterial activity of whole oleoresin from *A. balsamea* was tested using AHA. Growing quantities of whole oleoresin ranging from 1.4 to 90 µg/ml were incubated in the presence of *E. coli* and *S. aureus*. The results presented in Table 3.1 show that whole oleoresin is inactive against Gram-negative *E. coli* (MIC<sub>90</sub> >90 µg/ml) but active against Gram-positive *S. aureus* with a MIC<sub>50</sub> of 8.04 µg/ml and a MIC<sub>90</sub> of 24 µg/ml. In addition, the activity of whole oleoresin was evaluated against two methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA) isolated in Chicoutimi hospital and characterized as described in Materials and methods. The results show that both MRSA were significantly more resistant to penicillin, erythromycin, trimetoprim,

clindamycin, and ciprofloxacin with a MIC<sub>90</sub> at least 10 times higher than for sensitive *S. aureus*. Interestingly, the results show that whole oleoresin was active against both MRSA. Indeed, MRSA1 and MRSA2 were not resistant to whole oleoresin with a MIC<sub>90</sub> similar to sensitive *S. aureus*, respectively of 18.8 µg/ml and 30 µg/ml for the MRSA1 and MRSA2. Altogether, these results confirm the antibacterial properties of whole oleoresin from *A. balsamea*, and that resistant bacteria strains are also sensitive.

In order to identify the compounds mainly responsible for this antibacterial activity, the chemical composition of *A. balsamea* oleoresin was first analyzed by GC-MS, and the main compounds were quantified using internal calibration with GC-FID (Table 3.2). Whole oleoresin is composed of about 28% monoterpenes mainly β-pinene (10.44%), β-phellandrene (6.19%), α-pinene (5.97%), and limonene (3.98%); about 2% sesquiterpenes mainly longifolene (0.80%), and β-bisabolene (0.35%); and about 45% diterpenes mainly cis abienol (12.31%), abietic acid (9.41%), neoabietic acid (8.15%), palustric acid (7.95%), and isopimaric acid (2.26%). Some minor diterpenes and heavier compounds were not identified in this study. These results are consistent with literature. Indeed, some works published between 1969 and 1974 reported the presence of the main monoterpenes (β-pinene, β-phellandrene, α-pinene, limonene) and sesquiterpenes (longifolene, β-bisabolene) identified in our study (Smedman et al., 1969; Zavarin and Snajberk, 1972; Lee et al., 1974; Chung et al.,

1974). In addition, Gray and Mills (1964) identified abienol, abietic, and neoabietic acid from *A. balsamea* oleoresin. The 4,4-dimethyl-2-cyclohepten-1-one was also reported in the cortical oleoresin by Balogh et al. (1972). More recently, we isolated and characterized eighteen terpenoids and two new tetraterpenoids (Lavoie et al., 2012; Lavoie et al., 2013). To the best of our knowledge, we report here for the first time the presence of five resin acids including sandacopimaric acid, isopimaric acid, palustric acid, levopimaric acid, and dehydroabietic acid in oleoresin from *A. balsamea*.

To separate monoterpenes and diterpenes, whole oleoresin was distilled for 1 hour to yield about 25 % of essential oil and 75 % of residue. The chemical composition of the residue and essential oil fractions was analyzed and the antibacterial activity was determined using AHA. In Table 3.2, the results show that the essential oil fraction is composed mainly of monoterpenes including  $\beta$ -pinene (35.69%),  $\alpha$ -pinene (20.47%),  $\beta$ -phellandrene (20.26%), and limonene (13.20%). No diterpene was measured in this fraction. As shown in Table 3.3, the essential oil fraction is inactive against *E. coli*, *S. aureus* and MRSA with a MIC<sub>90</sub> >90  $\mu$ g/ml indicating that monoterpenes in whole oleoresin are inactive. In contrast, the residue fraction, containing mainly diterpenes, is active against *S. aureus* and both MRSA with a MIC<sub>90</sub> ranging from 34.5 to 63  $\mu$ g/ml. This result suggests that the antibacterial activity of oleoresin is in part due to diterpenes. Interestingly, the residue is



approximately two times less active than whole oleoresin suggesting a possible synergy between diterpenes and monoterpenes, or with other active compounds.

To identify the compounds responsible for the antibacterial activity, resin acids including palustric acid, neoabietic acid, isopimaric acid, levopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid, and sandaracopimaric acid were evaluated against *E. coli* and *S. aureus*. Growing concentrations of resin acids ranging from 1.4 to 45 µg/ml were incubated with both bacteria strains. As shown in Table 3.3, resin acids are inactive against *E. coli* with a MIC<sub>90</sub> >45 µg/ml but active against *S. aureus*. Isopimaric acid and levopimaric acid are the most active, respectively, with a MIC<sub>90</sub> of 9.7 µg/ml and 10 µg/ml in comparison with sandacopimaric acid (MIC<sub>90</sub>=13 µg/ml), dehydroabdietic acid (MIC<sub>90</sub>=13.2 µg/ml), palustric acid (MIC<sub>90</sub>=15.5 µg/ml), neoabietic acid (MIC<sub>90</sub>=21 µg/ml) and abietic acid (MIC<sub>90</sub>=54 µg/ml). The antibacterial activity of resin acids was also evaluated against both MRSA strains. In Table 3.3, the results show that antibacterial activity of resin acids against MRSA are relatively similar to sensitive *S. aureus* with MIC<sub>90</sub> ranging from 6.8 µg/ml (levopimaric acid) to 63 µg/ml (abietic acid). Altogether, these results show that resin acids are, in part, responsible for the antibacterial activity against *S. aureus* and MRSA.

Even today, oleoresin of *A. balsamea* is sold in pharmacies and proposed by herbalist and naturopath to treat various infections. However, medicinal traditional use of oleoresin by Native Americans and French Canadians to treat infections has never been confirmed *in vitro* against bacteria strains probably due to its high hydrophobicity. In the literature, two studies analyzed essential oil from bark of *A. balsamea* (Lee et al., 1973; Ross et al., 1996). These works reported a high level of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene, limonene and  $\beta$ -phellandrene. In 2006, our research group reported the chemical composition of leaf essential oil from *A. balsamea* (Pichette et al., 2006). This oil composed of  $\beta$ -pinene (29.9%),  $\delta$ -3-carene (19.6%) and  $\alpha$ -pinene (14.6%) was found active against *S. aureus*. However, the presence of these monoterpenes in the oleoresin does not explain antibacterial activity. In contrast to essential oils from bark and leaf, oleoresin is mainly composed of diterpenes (45%) as resin acids which were found strongly active against *S. aureus* and MRSA. Some studies reported the antibacterial activity of resin acids isolated from coniferous species. Fallarero et al. (2013) identified the activity of dehydroabietic acid against *S. aureus* biofilm. Moreover, Smith et al. (2005) and Li et al. (2008) reported the activities of isopimaric acid against MRSA obtained respectively from immature cones of *Pinus nigra* and *Cryptomeria japonica*. The development of a new antibacterial hydrophobic assay allowed to demonstrate a strong activity of oleoresin against *S. aureus* and MRSA. The identification and antibacterial testing of seven bioactive resin acids largely explain oleoresin activity. On the other hand, a cycloartane triterpenoid isolated by our research group was also found active against

*S. aureus* (Lavoie et al., 2013). Altogether, the results reported in this work support ethnopharmacological use of *A. balsamea* oleoresin by Native Americans and French Canadians to treat bacterial infections due to Gram-positive *S. aureus*. Additional studies will be needed to evaluate the action spectrum of *A. balsamea* oleoresin against other bacterial strains.

In conclusion, a new antibacterial assay developed for hydrophobic matrix testing allowed to reveal for the first time, activity of whole oleoresin against *S. aureus* and MRSA. The main components of whole oleoresin, resin acids are, in part, responsible for the antibacterial activity. This result supports the use of oleoresin by Native Americans and French Canadians to treat bacterial infections.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Héloïse Coté conceived and designed the experiments and analyzed data and wrote the manuscript. Marie-Anne Boucher performed some experiments and analyzed data. André Pichette analyzed data and revised manuscript. Benoit Roger performed some experiments and analyzed data. Jean Legault conceived and designed the experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors have no conflict of interest to declare

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for their help in biological assay and Carol Grenon for his suggestions regarding GC-MS. This work was supported by funds from the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (Grant 2012-VN-164529).

Table 3.1 Comparison of antibacterial activity of various commercial antibiotics using disk diffusion, microdilution and hydrophobic assays (AHA).

Antibiotics	Disc diffusion assay <sup>1-8</sup>		Microdilution assay MIC <sub>90</sub> (µg/ml)		Hydrophobic assay MIC <sub>90</sub> (µg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA1	MRSA2
Penicillin	R	S	16 ±1	0.0137 ±0.0003	15 ±2	0.0060 ±0.0002	0.19 ±0.02	1.8 ±0.2
Gentamycin	I	I	0.020 ±0.003	0.0040 ±0.0006	0.9 ±0.2	0.0050 ±0.00005	0.041 ±0.004	0.082 ±0.004
Erythromycin	R	I	>16	0.12 ±0.02	12 ±2	0.09 ±0.02	18 ±4	> 45
Trimetoprim	R	S	11.6 ±0.8	0.113 ±0.001	3.27 ±0.05	5.0 ±0.2	41 ±4	> 45
Vancomycin	R	S	>16	1.4 ±0.1	0.005 ±0.001	0.45 ±0.09	1.4 ±0.3	1.0 ±0.3
Chloramphenicol	S	S	0.73 ±0.07	0.98 ±0.05	0.9 ±0.1	0.73 ±0.03	1.8 ±0.3	1.86 ±0.09
Clindamycin	R	S	>16	0.017 ±0.002	10.3 ±0.2	0.013 ±0.002	45 ±9	45 ±33
Ciprofloxacin	S	S	0.0045 ±0.0002	0.19 ±0.02	0.010 ±0.003	0.11 ±0.01	> 45	> 45
Whole oleoresin	NA	NA	NA	NA	NA	24 ±1	18.8 ±0.1	30 ±1

Data are representative of three different experiments.

Main ± standard deviation, n=6

<sup>1</sup>Disc contains 10 µg of penicillin. Zone diameter: R ≤ 28; I-; S ≥ 29

<sup>2</sup>Disc contains 10 µg of gentamycin. Zone diameter: R ≤ 12; I 13-14; S ≥ 15

<sup>3</sup>Disc contains 15 µg of erythromycin. Zone diameter: R ≤ 13; I 14-22; S ≥ 23

<sup>4</sup>Disc contains 5 µg of trimetoprim. Zone diameter: R ≤ 10; I 13-15; S ≥ 16

<sup>5</sup>Disc contains 30 µg of vancomycin. Zone diameter: R -; I -; S ≥ 15

<sup>6</sup>Disc contains 30 µg of chloramphenicol. Zone diameter: R ≤ 12; I 13-17; S ≥ 18

<sup>7</sup>Disc contains 2 µg of clindamycin. Zone diameter: R ≤ 14; I 15-20; S ≥ 21

<sup>8</sup>Disc contains 5 µg of ciprofloxacin. Zone diameter: R ≤ 15; I 16-20; S ≥ 21

S: sensitive; I: intermediate; R: resistant

NA: Not Active

Table 3.2: Composition of whole oleoresin from *A. balsamea*, residue and essential oil fractions.

Identified compounds			Concentration (% m/m)		
RI	Name	Identification <sup>1</sup>	Oleoresin	Residue	Essential oil
930	$\alpha$ -thujene	MS, RI	< 0.05	< 0.05	0.12
940	$\alpha$ -pinene	MS, RI, Std	5.97	0.54	20.47
957	camphene	MS, RI, Std	0.06	< 0.05	0.22
978	sabinene	MS, RI	< 0.05	< 0.05	0.12
987	$\beta$ -pinene	MS, RI, Std	10.44	1.52	35.69
991	myrcene	MS, RI, Std	0.30	< 0.05	1.01
1014	$\delta$ -3-carene	MS, RI, Std	0.68	0.11	2.23
1038	limonene	MS, RI, Std	3.98	0.18	13.20
1040	$\beta$ -phellandrene	MS, RI	6.19	0.51	20.26
1090	terpinolene	MS, RI	0.11	< 0.05	0.09
1202	$\alpha$ -terpineol	MS, RI, Std	< 0.05	< 0.05	0.12
1232	thymol methyl ether	MS, RI	0.07	< 0.05	0.11
1291	bornyl acetate	MS, RI, Std	0.08	< 0.05	0.09
1364	$\alpha$ -longipinene	MS, RI	0.12	0.09	0.15
1405	Sativene	MS, RI	0.07	< 0.05	< 0.05
1428	longifolene	MS, RI, Std	0.80	0.71	0.71
1433	$\beta$ -caryophyllene	MS, RI	0.06	< 0.05	< 0.05
1513	$\beta$ -bisabolene	MS, RI, Std	0.35	0.32	0.19
2134	neo abienol <sup>2</sup>	MS, RI	12.01	10.57	-
2161	cis abienol	MS, RI	0.30	0.32	-
2276	sandaracopimaric acid	MS, RI, Std	0.40	0.48	-
2328	isopimaric acid	MS, RI, Std	2.26	3.38	-
2332	palustric acid	MS, RI, Std	7.95	8.82	-
2335	levopimaric acid	MS, RI, Std	0.46	0.55	-
2358	dehydroabietic acid	MS, RI, Std	0.59	1.19	-
2421	abietic acid	MS, RI, Std	9.41	10.42	-
2472	neoabietic acid	MS, RI, Std	8.15	8.99	-

<sup>1</sup>MS: Identification by GC-MS; RI: Validation by retention time comparison with literature data; Std: Validation by injection of commercial standards.

<sup>2</sup>Neo abienol is mainly produced by isomerisation of cis abienol during GC analyses (Miyazawa and Tamura, 2008).

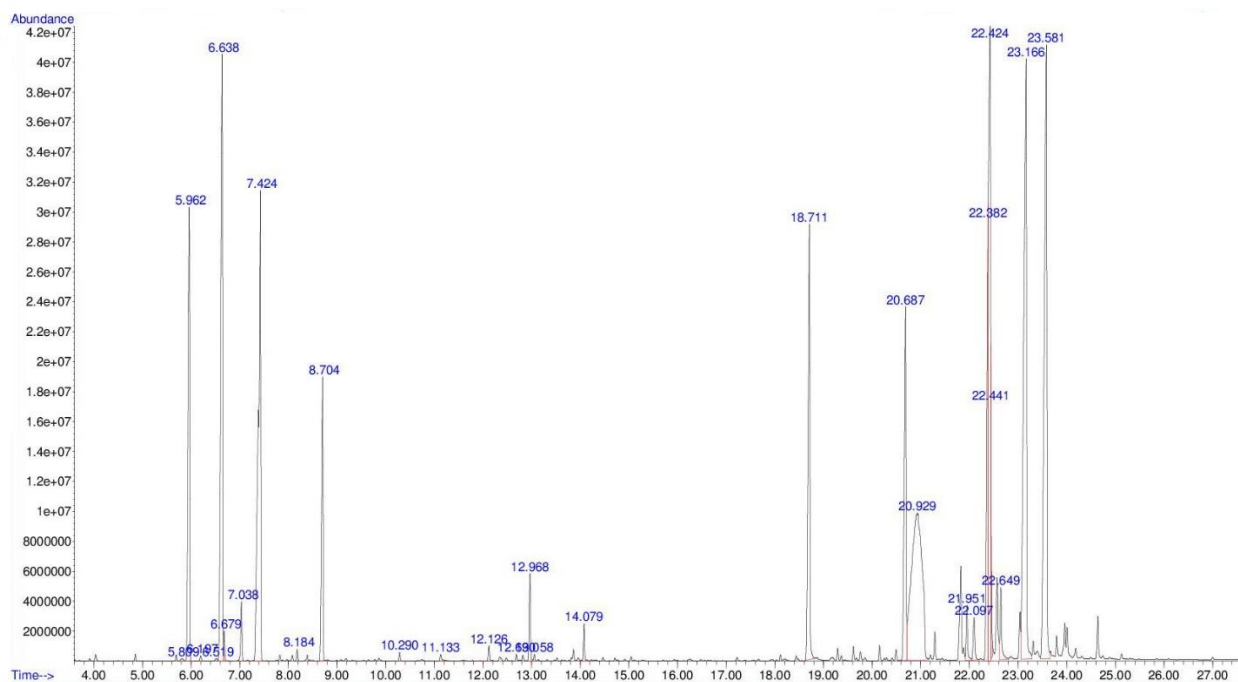
Table 3.3: Antibacterial activity of oleoresin fractions and compounds using hydrophobic assay (AHA).

Oleoresin fractions/compounds	MIC <sub>90</sub> (µg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA1	MRSA2
Essential oil fraction	>90	>90	>90	>90
Residu fraction	>90	55 ± 2 <sup>a</sup>	34.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	63 ± 3 <sup>a</sup>
Dehydroabietic acid	>45	13.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	20 ± 1 <sup>a</sup>
Palustric acid	>45	15.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	11.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	22.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
Neobietic acid	>45	21 ± 3 <sup>a</sup>	10.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.9 <sup>a</sup>
Isopimeric acid	>45	9.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>a</sup>	>45 <sup>c</sup>
Levopimaric acid	>45	10 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.4 <sup>a</sup>
Abietic acid	>45	54 ± 3 <sup>a</sup>	48 ± 4 <sup>ab</sup>	63 ± 4 <sup>ac</sup>
Sandaracopimaric acid	>45	13 ± 1 <sup>a</sup>	7.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>a</sup>

Data are representative of three different experiments.

Main ± standard deviation, n=6

Values with different letters (a–c) differ significantly (two-way analysis of variance, P<0.05).

**APPENDIX A. SUPPLEMENTARY MATERIAL**Table 3.4: Chemical profile of *A. balsamea* oleoresin using GC-MS analysis.



## References

- Banfi, E., Scialino, G., Monti-Bragadin, C., 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 796–800.
- Black, M.J., 1980. Algonquin ethnobotany: an interpretation of aboriginal adaptation in south western Quebec. Mercury series number Ottawa, Canada, p. 124.
- Balogh, B., Wilson, D.M., Burlingame, A.L., 1972. 4,4-Dimethyl-2-cyclohepten-1-one in the cortical oleoresin of *Abies Balsamea*. *Phytochemistry* 11, 1481-1484.
- Chung, J.L., Snajberk, K., Zavarin, E., 1974. Chemical composition of the cortical essential oil from *Abies balsamea*. *Phytochemistry* 13, 179-183.
- Clinical and laboratory standards institute, 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; seventeenth informational supplement. 52–60.
- Densmore, F., 1932. Menominee Music. Washington DC: Government printing office, p. 132.
- EUCAST, 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical microbiology and infection* 6, 509-515.
- EUCAST, 2013. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. P. 18.
- Fallarero, A., Skogman, M., Kujala, J., Rajaratnam, M., Moreira, V.M., Yli-Kauhaluoma, J., Vuorela, P., 2013. (+)-Dehydroabietic acid, an abietane-type

- diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*. International journal of molecular sciences 14, 12054–12072.
- Gray, P.S., Mills, J.S., 1964. The isolation of Abienol from Canada balsam, the oleoresin of *Abies balsamea* (L.) Mill. Journal of the Chemical Society 1109, 5822–5825.
- Holmbom, T., Reunanen, M., Fardim, P., 2008. Composition of callus resin of Norway spruce, Scots pine, European Larch and Douglas fir. *Holzforschung* 62, 417- 422.
- Hoffman, J.W., 1891. The Midewiwin or “Grand Medicine Society” of the Ojibwa. Government printing office, Washington, p. 198.
- Kaatz, G.W., Seo, S.M., Brien, L.O., Foster, T.J., Kaatz, G.W., Seo S.M., Brien, L.O., Wahiduzzaman, M., Foster, T.J., 2000. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 1404-1406.
- Kizil, M., Kizil, G., Yavuz, M., Aytakin, C., 2002. Antimicrobial activity of the resins obtained from the roots and stems of *Cedrus libani* and *Abies cilicica*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38, 144–146.
- Lavoie, S., Legault, J., Gauthier, C., Mshvildadze, V., Mercier, S., Pichette, A., 2012. Abibalsamins A and B, two new tetraterpenoids from *Abies balsamea* oleoresin. *Organic Letters* 14, 1504–1507.
- Lavoie, S., Gauthier, C., Legault, J., Mercier, S., Mshvildadze, V., Pichette, A., 2013. Lanostane- and cycloartane-type triterpenoids from *Abies balsamea* oleoresin. *Journal of Organic Chemistry* 9, 1333-1339.

- Lee, C.J., Snajberk, K., Zavarin, E., 1974. Chemical composition of the cortical essential oil from *Abies Balsamea*. *Phytochemistry* 13, 179-183.
- Leighton, A., 1985. Wild plant use by the woods cree (Nihithawak) of east-central saskatchewan. National Museums of Canada, Ottawa p. 21.
- Li, W.-H., Chang, S.-T., Chang, S.-C., Chang, H.-T., 2008. Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark. *Natural Product Research* 22, 1085–93.
- Marie-Victorin, F., Rouleau, E., Brouillet L., 2002. Flore laurentienne, 3rd edition. Les presses de l'Université de Montréal, Canada, p. 1093.
- Moerman, D., 1998. Native american ethnobotany.. Timbre Press. Portland, Oregon, USA, p. 927.
- Pal, S., Tak, Y.K., and Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 73, 1712–20.
- Pichette, A., Larouche, P.-L., Lebrun, M., Legault, J., 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research* 20, 371–373.
- Ross, J., Gangnon, H., Girard, D., Hachey, J.M., 1996. Chemical composition of the bark oil of balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill. *Journal of Essential oil Research* 8, 343-346.
- Rousseau, J., 1945. Le folklore botanique de Caughnawaga. *Contributions de l'institut botanique l'Université de Montreal* 55, 7-72.

- Rousseau, J., 1947. Ethnobotanique Abenakise, Les Archives de Folklore 11, 145-182.
- Smedman, L.A., Snajberk, K., Zavarin, E., 1969. Oxygenated monoterpenoids and sesquiterpenoid hydrocarbons of the cortical turpentine from different *Abies* species. *Phytochemistry* 8, 1471–1479.
- Smith, H., 1923. Ethnobotany of the Menomini Indians. *Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee* 4, 1-174.
- Smith, H., 1932. Ethnobotany of the Ojibwe Indians. *Bulletin of the Public Museum of Milwaukee* 4, 327-525.
- Smith, H., 1933. Ethnobotany of the forest Potawatomi Indians. *Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee* 7, 1-230.
- Smith, E., Williamson, E., Zloh, M., Gibbons, S., 2005. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy research* 19, 538–42.
- Uprety, Y., Asselin, H., Dhakal, A., Julien, N., 2012. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 8, 1-7.
- Zavarin, E., Snajberk, K., 1972. Geographical variability of monoterpenes from *Abies Balsamea* and *A. Fraseri*. *Phytochemistry* 11, 1407-1421.
- Zulak, K.G., Bohlmann, J., 2010. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 86–97.

CHAPITRE IV.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF  
*TUSSILAGO FARFARA* (L.) ESSENTIAL OIL FROM QUEBEC, CANADA

**Published research paper**

Title: Chemical composition and antibacterial activity of *Tussilago farfara* (L.) essential oil from Quebec, Canada

Authors : Marie-Anne Boucher, Héloïse Côté, André Pichette, Lionel Ripoll and Jean Legault\*

Affiliations :

*Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec    Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC, G7H 2B1, Canada*

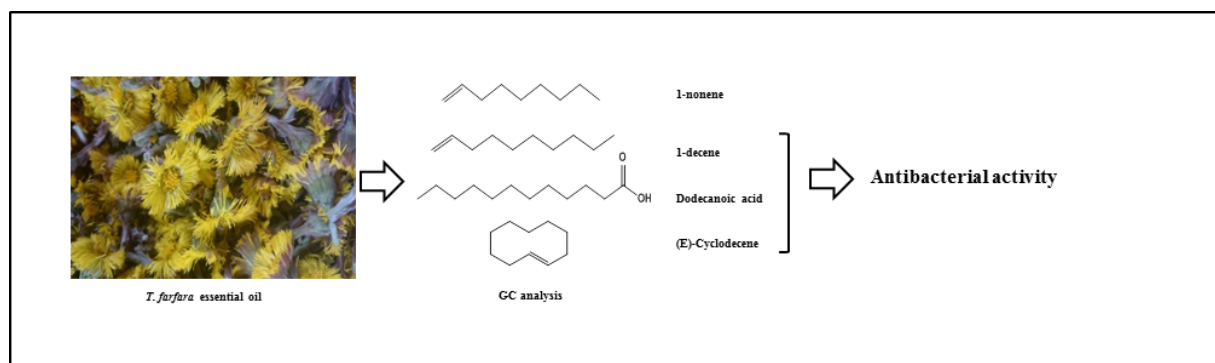
*\*Corresponding author: Jean.Legault@uqac.ca*

Boucher, M.A., H. Côté, A. Pichette, L. Ripoll, J. Legault. 2018. Chemical composition and antibacterial activity of *Tussilago farfara* (L.) essential oil from Quebec, Canada. Natural Product Research 1-4.

## Résumé

Le tussilage farfara (*Tussilago farfara* L.) est une plante vivace de la famille des Asteraceae (Compositae). Cette plante qui écloit très tôt au printemps est utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays. Par contre, peu d'étude ont analysé la composition chimique de son huile essentielle ainsi que son activité biologique. Dans cet article, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de tussilage provenant du Saguenay-Lac-St-Jean, Québec, Canada, a été analysée. Les composés majoritaires présents dans l'huile essentielle ont été déterminés par GC-MS et GC-FID. L'huile essentielle est principalement constituée de 1-nonène (40,1%),  $\alpha$ -phellandrène (26,0%) et de  $p$ -cymène (6,6%). Cette étude suggère la présence d'un nouveau chemotype de tussilage farfara au Saguenay. De plus, il est rare qu'un composé aliphatique (1-nonène) soit retrouvé en grande quantité dans une huile essentielle. L'huile essentielle est active contre une bactérie gram positif (*Staphylococcus aureus*) et une bactérie gram négatif (*Escherichia coli*). L'acide dodécanoïque, un composé minoritaire, est également actif contre les deux bactéries et le 1-décène et le (E)-cyclodécène ont tous deux une activité contre *E. coli*. Des recherches supplémentaires pourraient être effectuées afin de caractériser l'activité antibactérienne contre une vaste gamme de bactéries, et également de tester la composition de cette plante issue d'autres régions du Québec.

## GRAPHICAL ABSTRACT





**ABSTRACT**

The chemical composition of *Tussilago farfara* L. essential oil from the Saguenay-Lac-St-Jean region of Quebec, Canada was analysed by gas chromatography – flame ionisation detector (GC-FID) and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), and the antibacterial activity of the oil was tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Forty-five (45) compounds were identified from the GC profile. The main components were 1-nonene (40.1%),  $\alpha$ -phellandrene (26.0%) and  $p$ -cymene (6.6%). The essential oil demonstrated antibacterial activity against *E. coli* ( $MIC_{50} = 468 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $MIC_{90} = 6869 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and *S. aureus* ( $MIC_{50} = 368 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $MIC_{90} = 773 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Dodecanoic acid was found to be active against both bacteria having a  $MIC_{50}$  and  $MIC_{90}$  of  $16.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively for *E. coli* and a  $MIC_{50}$  and  $MIC_{90}$  of  $9.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $27.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively for *S. aureus*. In addition, 1-decene and (E)-cyclodecene were also found to be active against *E. coli*.

**Keywords:** *Tussilago farfara*, essential oil, antibacterial activity, volatile compounds, terpenes, aliphatic compounds

## 1. INTRODUCTION

*Tussilago farfara* L. (coltsfoot) is a useful vernal plant introduced into Quebec from Europe during the 18<sup>th</sup> century (Marie-Victorin 1995). In North America, *Tussilago* roots were traditionally used by Iroquois, Micmac and Malecite amerindians to treat coughing and tuberculosis (Herrick 1977; Hooper and Chandler 1984), while the leaves were smoked as a domestic remedy for asthma (Marie-Victorin 1995). In China, the flower buds of this plant have traditionally been used to treat coughing, asthma and bronchitis (Li and Wang 1988). Although this plant was widely used for its medicinal properties (Hooper and Chandler 1984; Li and Wang 1988; Marie-Victorin 1995), they have an important lack of investigations on its essential oil composition and their biological properties. Furthermore, a comparison of two studies from China and Lithuania shows that the composition of essential oil differs between plants originating (Liu et al. 2006; Judzentiene and Budiene 2011). In this study, we investigate the chemical composition and the antibacterial activity of *T. farfara* essential oil collected from the Saguenay-Lac-St-Jean region of Quebec, Canada. A new composition of *T. farfara* essential oils was described, and, even more, antibacterial activity of the essential oil was tested for the first time.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

For gas chromatography (GC) analyses and biological testing, we used standard compounds obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (1-nonene,  $\rho$ -cymene,  $\alpha$ -phellandrene, (E)-cyclodecene, tetracosane), Fluka (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) ( $\alpha$ -humulene), Takasago (Takasago International Corporation, Tokyo, Japan) ( $\beta$ -caryophyllene) and Acros Organics (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada) (1-decene, dodecanoic acid, tricosane).

### 2.2. Plant material and extraction of essential oil

The flowers of *T. farfara* were collected in May 2014 and May 2015 in Saguenay, Quebec, Canada. Stem and flower come from 3 different locations (48°14'42.45" 71°15'16.20"; 48°30'1.55" 70°59'29.13"; 48°31'33.12" 71°5'18.78") in Saguenay-Lac-St-Jean, all plant are pooled for hydrodistillation. Voucher specimen no. QFA0610841 has been filed at the Louis-Marie herbarium of Laval University, Quebec, QC, Canada. Essential oil was obtained from freshly harvested flowers by hydrodistillation over a 3-hour period (yield = 0.08% (w/w); refractive index = 1.4534; density = 0.84594 g·mL<sup>-1</sup>). The essential oil extraction yield depended on the total amount of the raw material. The extracted essential oil was then stored in the

dark at a temperature of 4 °C. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. was purchased from Aliksir Inc (thymol chemotype).

### 2.3. GC-FID and GC-MS analyses

All chromatographic analyses were run on an Agilent 6890N GC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a non-polar DB-5 column and a polar SolGel-Wax column (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) as well as two flame ionisation (FID) detectors (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The oils were injected in an undiluted (0.1 µL injection volume, split 1:235) and undried state. The temperature program began at 40 °C for 2 min, then rose 2 °C·min<sup>-1</sup> up to 210 °C. The temperature was then held at 210 °C for 13 min. Samples were also injected on an Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to an Agilent 5975C InertXL EI/CI mass spectrometer (MS) equipped with a DB-5MS column using the same temperature program as above and a split of 1:1000. Compounds were identified from their retention indexes as calculated from even-numbered C8 to C36 alkane standards and/or from MS databases (NIST08), HPCH 2205 and custom libraries built from pure compounds (LASEVE, UQAC, Chicoutimi, QC, Canada). Quantification was derived from the FID detector response on the DB-5 column without any correction factor. All standards were co-injected to validate the identification.

#### 2.4. Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activity of *T. farfara* essential oils and compounds was evaluated against gram-negative *Escherichia coli* (ATCC bacteria 25922) and gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC bacteria 25923) using an antibacterial hydrophobic assay as described by Côté et al. (2016). First, 100 µL of nutrient agar was distributed in 96-well plates and were kept at room temperature for 1 h. Subsequently, 20 µL of methanol containing growing concentrations of *T. farfara* essential oil or compounds was distributed on the 96-well plates. After evaporation of methanol, 20 µL of nutrient broth containing bacteria ( $2.5 \times 10^5$  colony forming units per mL) was added to each well. The 96-well plates were then incubated at 37 °C for 5 h. After, 100 µL of a 50 µg·mL<sup>-1</sup> resazurin sodium salt solution (Sigma R-2127, St-Louis, MO, USA) was added to each well. Fluorescence was read on an automated Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) after 2 h of incubation for *S. aureus* and 3 h of incubation for *E. coli*. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were determined as the lowest concentration resulting in a 50% and 90% inhibition, respectively, of bacterial growth.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The flowers of *T. farfara* were harvested from plants collected in the Saguenay-Lac-St-Jean region of Quebec, Canada. The essential oil was then extracted from the

flowers by hydrodistillation. The chemical composition of *T. farfara* essential oil was analysed by gas chromatography – flame ionisation detector (GC-FID) and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). The essential oil of *T. farfara* is constituted mainly of aliphatic compounds (47%), monoterpenes (32%), sesquiterpenes (4%) and fatty acid (4%). A total of forty-five (45) compounds were identified in the oil (Table 4.1). The main constituents were 1-nonene (40.1%),  $\alpha$ -phellandrene (26%) and  $p$ -cymene (6.6%). Few essential oils are composed mainly of aliphatic compounds such as alkenes (Bajpai et al. 2008; Hammami et al. 2015). However, 1-nonene has been found in relatively high concentrations in the essential oils of *Farfugium japonicum* (19.83%) and *Ruta chalepensis* (13.95%) (Kim et al. 2008; Haddouchi et al. 2013). Interestingly, the composition of essential oil of *T. farfara* from China (Yu-feng et al. 2006) and Lithuania (Judzentiene and Budiene 2016) is quite different than that of *T. farfara* essential oil from the Saguenay-Lac-St-Jean region of Quebec, Canada, suggesting a new chemotype. *Tussilago farfara* essential oil from China is principally composed of  $\beta$ -bisabolene, (E)-cycloundecene, 1-undecene, 1-pentadecene and 1-tridece, while *T. farfara* essential oil from Lithuania is constituted mainly of n-tricosane, n-pentacosane, n-dodecane,  $\alpha$ -fenchocamphorone and n-hexacosane.

Tests for antibacterial activity showed that *T. farfara* essential oil was active against *E. coli* having a MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of 468  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and of 6869  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Against *S. aureus*, the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 368  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 773

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively (Table 4.2). To the best of our knowledge, there have been no previous studies reporting on the antibacterial activity of *T. farfara* essential oil. To identify those compounds responsible for the antibacterial activity of *T. farfara*, we evaluated 1-nonene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\rho$ -cymene, dodecanoic acid, 1-decene, (E)-cyclodecene,  $\beta$ -caryophyllene, tricosane, tetracosane and  $\alpha$ -humulene. Our results (Table 4.2) show that 1-decene ( $\text{MIC}_{50} = 4.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $\text{MIC}_{90} = 48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (E)-cyclodecene ( $\text{MIC}_{50} = 6.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $\text{MIC}_{90} = 117 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and dodecanoic acid ( $\text{MIC}_{50} = 16.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $\text{MIC}_{90} = 95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were, in part, responsible for the antibacterial activity against *E. coli* while dodecanoic acid ( $\text{MIC}_{50} = 9.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $\text{MIC}_{90} = 27.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was, in part, responsible for the antibacterial activity against *S. aureus*. Ouattara et al. (1997) reported the positive activity of dodecanoic acid against three taxa of gram positive bacteria, but dodecanoic acid has not been previously tested against *E. coli* and *S. aureus*.

#### 4. CONCLUSION

This study suggests a new chemotype of *T. farfara* essential oils, and, even more, antibacterial activity of the essential oil was tested for the first time. For future research, it would be very interesting to test several types of essential oils from others regions of Quebec and Canada. Also, today, extensive search for new antibacterial products taking great place everywhere, so it can be relevant to investigate susceptibility of other pathogenic bacteria to this particular essential oil.

### **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

M.-A. Boucher et H. Côté ont effectuées les analyses chimiques et analysées les résultats. H. Côté a effectué les analyses biologiques et écrits le manuscrit de cet article. A. Pichette a analysé les données et révisé le présent manuscrit, et finalement J. Legault a conçu les expérimentations, analysé les données et contribué à la rédaction du manuscrit.

### **FUNDING**

This study was supported by funds from the Fonds de recherche québécois sur la nature et les technologies (FRQNT).

### **DISCLOSURE STATEMENT**

No conflict of interest was reported by the authors.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for their help with the biological assays. Benoit Roger and Laboratoire Phytochemia provided advice regarding GC use and analysis.



Table 4.1: Chemical composition of *T. farfara* essential oil.

Name	DB-5 column		SolGel-Wax column	
	I. R.	%	%	I. R.
1-octene	787	0.2	0.2	821
1-nonene	877	40.1	40.5	910
(E)-1,3-nonadiene	912	0.2	0.2	910
$\alpha$ -thujene	915	<0.1	<0.1	1010
$\alpha$ -pinene	917	<0.1	<0.1	1006
myrcene	987	1.0	0.8	1138
1-decene	987	1.1	0.9	1026
$\alpha$ -phellandrene	1001	26.0	25.4	1133
$\rho$ -cymene	1019	6.6	6.6	1243
limonene	1023	0.1	0.1	1172
$\beta$ -phellandrene	1023	0.1	0.1	1181
(E)- $\beta$ -ocimene	1045	<0.1	<0.1	1233
$\gamma$ -terpinene	1053	<0.1	<0.1	1220
1,10-undecadiene	1094	4.1	4.2	1158
unknown <sup>1</sup>	1098	3.1	3.1	1220
1-undecene	1089	0.4	0.4	1121
(E)-cyclodecene	1247	1.0	-	-
unknown <sup>2</sup>	1278	0.8	-	-
pregeijerene B	1282	0.6	-	-
unknown <sup>3</sup>	1321	1.3	-	-
unknown <sup>4</sup>	1331	0.4	-	-
7-epi-silphiperfol-5-ene	1337	0.3	-	-
silphiperfol-6-ene	1374	<0.1	-	-
$\alpha$ -copaene	1373	<0.1	<0.1	1463
$\beta$ -cubebene	1384	<0.1	<0.1	1509
unknown <sup>5</sup>	1388	0.5	-	-
$\beta$ -caryophyllene	1411	0.7	0.5	1556
$\alpha$ -humulene	1446	0.2	0.2	1625
<i>trans</i> - $\beta$ -farnesene	1456	<0.1	<0.1	1655
germacrene D	1475	1.1	1.1	1667
$\beta$ -selinene	1486	0.2	0.2	1673
( <i>Z,E</i> )- $\alpha$ -farnesene	1494	<0.1	<0.1	1688
$\alpha$ -muurolene	1496	<0.1	<0.1	1692
$\beta$ -bisabolene	1506	0.1	0.1	1698
$\gamma$ -cadinene	1509	<0.1	<0.1	1728

Name	DB-5 column		SolGel-Wax column	
	I. R.	%	%	I. R.
$\delta$ -cadinene	1525	0.1	0.1	1718
spathulenol	1572	0.3	0.3	2075
dodecanoic acid	1572	2.4	2.7	2454
lauric acid. ethyl ester	1594	0.3	0.3	1826
humulene epoxyde II	1599	0.2	0.2	2012
$\tau$ -muurolol	1635	<0.1	<0.1	2138
$\tau$ -cadinol	1635	<0.1	<0.1	2122
$\alpha$ -cadinol	1647	<0.1	<0.1	2183
tetradecanoic acid	1767	0.4	0.4	2697
ethyl myristate	1793	<0.1	<0.1	2031
palmitic acid	1962	0.3	0.3	2882
ethyl palmitate	1993	<0.1	<0.1	2236
tricosane	2291	0.3	0.3	2178
tetracosane	2316	0.3	-	-
Total		88.4	86.7	

<sup>1</sup>Non identified compound: MS fragmentation peaks 67, 79 (44), 108 (29), 55 (25), 81 (20), 93 (15), 77 (15) 135 (2) m/z

<sup>2</sup>Non identified compound: MS fragmentation peaks 67, 81 (80), 55 (71), 54 (62), 82 (57), 79 (54), 95 (46) 180 (1) m/z

<sup>3</sup>Non identified compound: MS fragmentation peaks 111, 126 (97), 71 (58), 109 (34), 95 (28), 93 (24), 55 (23) 175 (1) m/z

<sup>4</sup>Non identified compound: 97, 107 (44), 55 (29), 83 (22), 81 (22), 109 (20), 69 (18) 139 (12) m/z

<sup>5</sup>Non identified compound: 100, 71 (100), 111 (80), 109 (43), 69 (41), 55 (28), 95 (23) 155 (4) m/z

\* Result is representative of two different hydrodistillations.

Table 4.2: Antibacterial activity of *T. farfara* essential oil (EO) and some selected compounds against *E. coli* and *S. aureus*.

<i>Tested product</i>	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<b><i>Tussilago farfara</i> EO</b>	468 ± 23	6869 ± 390	368 ± 27	773 ± 50
<b>1-nonene</b>	> 200	> 200	> 200	> 200
<b>1-decene</b>	4.4 ± 0.4	48 ± 4	36 ± 4	> 200
<b><math>\alpha</math>-humulene</b>	> 200	> 200	> 200	> 200
<b><math>\alpha</math>-phellandrene</b>	63 ± 9	> 200	> 200	> 200
<b><math>\beta</math>-caryophyllene</b>	106 ± 19	> 200	> 200	> 200
<b>p-cymene</b>	> 200	> 200	> 200	> 200
<b>(E)-cyclodecene</b>	6.8 ± 0.5	117 ± 4	100 ± 9	> 200
<b>dodecanoic acid</b>	16.4 ± 0.9	95 ± 4	9.8 ± 0.3	27.3 ± 0.9
<b>tetracosane</b>	12 ± 1	> 200	> 200	> 200
<b>tricosane</b>	14 ± 1	> 200	> 200	> 200
<b><i>Thymus vulgaris</i> EO</b>	121 ± 12	342 ± 33	26 ± 2	397 ± 15

\* Result is representative of two different hydrodistillations.

**REFERENCES**

- Bajpai V. K., Shukla S., and Kang S.C. 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L . Bioresource Technology 99: 8903–8908.
- Coté H., Boucher M.-A., Pichette A., Roger B., Legault J. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. J. Ethnopharmacol. 194: 684–689.
- Haddouchi F., Chaouche T.M., Zaouali Y., Ksouri R., and Attou A. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. Food Chemistry 141: 253–258.
- Hammami I., Smaoui S., Hsouna A.B., Hamdi N., and Triki M.A. 2015. *Ruta Montana* L. leaf essential oil and extracts: characterisation of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. Excli Journal 14: 83–94.
- Herrick J.W. 1977. Iroquois Medical Botany. State University of New York at Albany .
- Hooper S.N. and Chandler R.F. 1984. Herbal remedies of the maritime Indians: Phytosterols and triterpenes of 67 plants. Journal of Ethnopharmacology 10: 181–194.
- Judzentiene A. and Budiene J. 2011. Volatile oils of flowers and stems of *Tussilago farfara* L . from Lithuania. Journal of Essential Oil Bearing Plants 5026: 413–416.
- Kim J.Y., Oh T.H., Kim B.J., Kim S.S., Lee N.H. and Hyun C.G. 2008. Chemical composition and anti-inflammatory effects of essential oil from *Farfugium japonicum* flower. Journal of Oleo Science 57(11): 623–628.

Li Y.P. and Wang Y.M. 1988. Evaluation of tussilagone: a cardiovascular-respiratory stimulant isolated from Chinese herbal medicine. *General Pharmacology* 19: 261–263.

Liu Y.F., Yang, X.W. and Bin W.U. 2006. GC - M S analysis of essential oil constituents from buds of *Tussilago farfara* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 15(1): 10–14.

Marie-Victorin F. 1995. Flore Laurentienne. Third edition. L. Brouillet, Hay S.G. et Goulet I. Collaboration with Blondeau M., Cayouette J., Labrecque J. Les Presses de l'Université de Montréal.

Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A, Piette G.J.-P. and Bégin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37(2-3): 155–162.

CHAPITRE V.  
ANTI-INFLAMMATORY, ANTIOXIDANT, ANTIBIOTIC, AND  
CYTOTOXIC ACTIVITIES OF *TANACETUM VULGARE* L. ESSENTIAL  
OIL AND ITS CONSTITUENTS

**Published research paper**

Title: Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and its Constituents

Authors : Héloïse Coté<sup>1,2</sup>, Marie-Anne Boucher<sup>1,2</sup>, André Pichette<sup>1,2</sup>, and Jean Legault<sup>1,2</sup> \*

Affiliations :

<sup>1</sup> Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H 2B1, Canada; Heloise.cote@uqac.ca (H.C.); Marieanne.boucher@uqac.ca (M.-A.B.); Andre.Pichette@uqac.ca (A.P.)

<sup>2</sup> Chaire de recherche sur les agents anticancéreux d'origine naturelle, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H 2B1, Canada

\* Correspondence: Jean.Legault@uqac.ca; Tel.: +1-418-545-5011

Academic Editor: Eleni Skaltsa

Received: 30 March 2017; Accepted: 22 May 2017; Published: 25 May 2017

Coté H, Boucher M-A, Pichette A, Legault J. 2017. Anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and its constituents. *Medicines* 4:1-34

## Résumé

La tanaïsie vulgaire (*Tanacetum vulgare* L.) est une plante vivace de la famille des Asteraceae (Compositae). Cette plante est largement répandue en Europe et en Asie. Introduite en Amérique du Nord au XVIII<sup>e</sup> siècle, elle s'est bien adaptée au climat nordique. La tanaïsie vulgaire est bien connue pour la variabilité de sa composition chimique en fonction des régions (chénotypes). Peu d'études ont analysé la composition chimique de son huile essentielle en relation avec son activité biologique. Dans cette étude, l'activité anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne et cytotoxique de l'huile essentielle de tanaïsie vulgaire provenant du Saguenay-Lac-St-Jean, Québec, Canada, ont été analysés. De plus, les composés présents dans l'huile essentielle et leurs pourcentages relatifs ont été déterminés par GC-MS et GC-FID. L'huile essentielle était principalement constituée de camphor, bornéol et 1,8-cinéole. L'extrait a démontré une bonne activité anti-inflammatoire et antioxydante principalement apportées par le  $\alpha$ -humulène, le  $\alpha$ -pinène et l'oxyde de caryophyllène. Également, l'huile essentielle est active contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Deux des composés majoritaires, le camphor et l'oxyde de caryophyllène sont actifs contre ces bactéries, ce qui pourrait expliquer en grande partie l'activité. Finalement, l'huile essentielle de *T. vulgare* est légèrement cytotoxique contre les WS1, alors que le  $\alpha$ -humulène et le caryophyllène oxide ont une activité cytotoxique contre A-549, DLD-1, et WS1. Pour conclure, le lien a été démontré pour la première fois entre les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Tanacetum vulgare* et les activités anti-inflammatoires, antioxydantes, antibactériennes et cytotoxiques. L'huile essentielle de *T. vulgare* possède des activités biologiques très intéressantes et des recherches supplémentaires pourraient être effectuées en vue d'une utilisation pharmacologique.



**ABSTRACT:** *Background:* *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae) is a perennial herb that has been used to treat multiple ailments. Regional variability of the chemical composition of *T. vulgare* essential oils is well-known. Despite these regional chemotypes, most relevant studies did not analyze the complete chemical composition of the *T. vulgare* essential oil and its constituents in relation to their biological activities. Here, we assess the anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of *T. vulgare* collected from northern Quebec (Saguenay-Lac-St-Jean), Canada. *Methods:* Essential oil was extracted from plants by steam distillation and analyzed using GC-FID. Biological activities of essential oil and its main constituents were evaluated *in vitro*. *Results:* We identified the major compounds as camphor, borneol, and 1,8-cineole. The oil possesses anti-inflammatory activity inhibiting NO production. It also inhibits intracellular DCFH oxidation induced by tert-butylhydroperoxide. Anti-inflammatory activity of essential oil appears driven mainly by  $\alpha$ -humulene while antioxidant activity is provided by  $\alpha$ -pinene and caryophyllene oxide. Essential oil from *T. vulgare* was active against both *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with camphor and caryophyllene oxide responsible for antibacterial activity. Finally, *T. vulgare* essential oil was slightly cytotoxic against the human healthy cell line WS1 while  $\alpha$ -humulene and caryophyllene oxide were moderately cytotoxic against A-549, DLD-1, and WS1. *Conclusion:* We report, for the first time, links between the specific compounds found in *T. vulgare* essential oil and anti-inflammatory, antioxidant,

antibacterial, and cytotoxic activities. *T. vulgare* essential oil possesses interesting biological properties.

*Keywords:* *Tanacetum vulgare*; essential oil; GC; anti-inflammation; antioxidant; antibacterial; cytotoxicity

## 1. INTRODUCTION

*Tanacetum vulgare* L. is a perennial herb of the Asteraceae family. This plant grows widely in Europe and Asia. Introduced into North America in the 18th century, it is well adapted to northern climates [1]. Traditionally, *T. vulgare* has been used as an anthelmintic, tonic, emmenagogue, antihypertensive, carminative, antispasmodic, antidiabetic, diuretic, and an anti-inflammatory compound [2,3]. Most alcohol extracts of *T. vulgare* are reported to have biological effects including anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties. Indeed, studies on rats and mice [4,5] have found *T. vulgare* extracts to have anti-inflammatory properties. Flavonoids present in the plant could be, in part, responsible for these biological effects [5,6]. Shinella et al. demonstrated that parthenolide was the main in vivo anti-inflammatory substance in *T. vulgare* [5]. Methanol extracts from *T. vulgare* showed antioxidant activity, probably due to the presence of phenolic compounds [7]. The antibacterial properties of ethanolic extracts have also been reported in studies using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [8,9].

Regional variability of the chemical composition of *T. vulgare* essential oils is well-known and many essential oil chemotypes have been reported in the literature [10–21]. For example, *T. vulgare* essential oil chemotypes from Hungary and Argentina are mainly composed of  $\beta$ -thujone (72.4% and 91.65%, respectively) [15,20]. However, *T. vulgare* essential oil chemotypes from Finland and Lithuania [10,12] had, respectively, artemisia ketone (55.08% to 81.36%) and 1,8-cineole (3.6% to 39.7%) as the main constituents. Kumar et al. [22] have thoroughly reviewed this

chemotype variability of *Tanacetum*. Despite the many regional chemotypes, many studies of the biological effects of *T. vulgare* essential oils did not analyze the complete chemical composition of the oils nor its constituents in relation to their biological properties.

In our study, the essential oil of *T. vulgare*, collected from an area in northern Quebec (Saguenay-Lac-St-Jean, Chicoutimi, QC, Canada), was extracted by steam distillation and analyzed using GC-FID (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). We assessed the essential oils and its constituents for anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

### 2.1. Chemicals

We used standard compounds for GC analyses and biological testing from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (1,8-cineole, bornyl acetate,  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\rho$ -cymene, camphene, camphor, caryophyllene oxide, limonene, terpinene-4-ol, terpinolene), Fluka (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) ( $\alpha$ -humulene), and Takasago (Takasago International Corporation, Tokyo, Japan) ( $\beta$ -caryophyllene).

## 2.2. *Plant Material and Extraction of Essential Oil*

The aerial portions of *T. vulgare* were collected in July 2014 in Chicoutimi, Quebec, Canada. Voucher specimen no. QFA0610840 has been filed at the Louis-Marie herbarium of Laval University, Quebec, Qc, Canada. Essential oil was obtained from freshly harvested aerial parts by industrial steam distillation over a 3-h period (Groupe BoréaRessources, Ferland-Boileau, Qc, Canada). The essential oil extraction yields depended on the total amount of the raw material. The extracted essential oil was then stored in the dark at a temperature of 4 °C.

## 2.3. *GC-MS Analysis*

All chromatographic analyses were run on an Agilent 6890N GC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a non-polar DB-5 column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a polar SolGel-Wax column (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) as well as two FID detectors (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The oils were injected in an undiluted (0.1 µL injection volume, split 1:235) and undried state. The temperature program was 40 °C for 2 min, 2 °C·min<sup>-1</sup> up to 210 °C, and then 210 °C for 13 min. Samples were also injected on an Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to an Agilent 5975C InertXL EI/CI mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipped with a DB-5MS column

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the same temperature program as above and a split of 1:1000. Compounds were identified from their retention indexes as calculated from even-numbered C8 to C36 alkane standards and/or from MS databases (NIST08), HPCH 2205, and custom libraries built from pure compounds (Laboratoire LASEVE, UQAC, Qc, Canada). Quantification was derived from the FID detector response on the DB-5 column without any correction factor. All standards were co-injected to validate the identification.

#### 2.4. Cell Culture

Human skin fibroblasts WS1 (ATCC CRL-1502), human lung carcinoma A-549 (ATCC CCL-185), human colon adenocarcinoma DLD-1 (ATCC CCL-221), and murine macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The human keratinocytes *HaCaT* cell line was obtained from Dr. Mammoud Rouhabia (Laval University, Québec, Qc, Canada). Cells were grown in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Minimum Essential Medium supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 1 × solution of sodium pyruvate, 1 × vitamins, 1 × non-essential amino acids, 100 IU of penicillin and 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin (Cellgro<sup>®</sup>, Mediatech, Manassas, VA, USA).

### 2.5. Measurement of Anti-Inflammatory Activity

We evaluated the inhibition NO production by *T. vulgare* essential oil and compounds as described by Legault et al. [23]. Control L-NAME was used as positive control. Murine macrophage RAW 264.7 cells were incubated with essential oil or dissolved compounds in DMSO and then stimulated with 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS and incubated at 37 °C. After 24 h, we collected the cell-free supernatants and immediately determined the NO concentration using the Griess reaction. We read the absorbance at 540 nm using an automated Varioskan Ascent plate reader, and quantified the presence of nitrite by comparing with a NaNO<sub>2</sub> standard curve.

### 2.6. Evaluation of Antioxidant Activity Using Cell-Based Assays

Antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by Girard-Lalancette et al. [24]. To assess antioxidant activity, we incubated the human skin fibroblasts WS1 for 1 h with a growing concentration of essential oil or dissolved compounds in DMSO. We then added 100 µL of 200 µM tert-butylhydroperoxide and immediately measured fluorescence as well as again after 90 min later. Measurements were performed on an automated plate reader (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, Milford, MA, USA) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Antioxidant activity was expressed as the concentration of extract inhibiting 50% (IC<sub>50</sub>) of DCFH oxidation.

## 2.7. Evaluation of Antibacterial Activity

We tested the antibacterial activities of *T. vulgare* essential oil and compounds against gram-negative *Escherichia coli* (ATCC bacteria 25922) and gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC bacteria 25923) using the antibacterial hydrophobic assay as described by Côté et al. [25]. This new method was developed and used in this work as classical methods including disc diffusion and microdilution assays are sometimes inefficient for testing a matrix or compounds of a hydrophobic nature. Briefly, after microorganisms passed 16–18 h at 37 °C in a nutrient broth base (Difco), we transferred 20 µL methanol containing growing concentrations of essential oil and compounds (3.1 to 200 µg·mL<sup>-1</sup>) onto nutrient agar of 96-well plates. We then added bacterial strains having a concentration of  $5 \times 10^3$  colony forming units (CFU) per mL of nutrient broth. Bacterial suspension without treatment was used as negative control and bacterial suspension plus solvent was tested in parallel to demonstrate the absence of solvent toxicity. The blank consisted of culture medium only and was subtracted from all subsequent measurements of every other well. The 96-well plates were then incubated at 37 °C for 5 h to foster bacterial growth. We then added 100 µL of resazurin sodium salt solution having a concentration of 50 µg·mL<sup>-1</sup> (Sigma R-2127, St-Louis, MO, USA) to each well. Fluorescence was read on an automated Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) after two hours for *S. aureus* and three hours for *E.*



*coli*. The IC<sub>50</sub> was determined as the lowest concentration resulting in 50% inhibition of bacterial growth.

### 2.8. Cytotoxic Assays

We plated in 96-well microplates—each containing a 100 µL culture medium—exponentially growing cells of human skin fibroblasts WS1, human *HaCaT* keratinocytes, human lung carcinoma A-549, and human colon adenocarcinoma DLD-1 at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well (Costar, Corning Inc., Lowell, MA, USA). The cells were allowed to adhere for 16 h before treatment. We then treated cells with *T. vulgare* essential oil or dissolved compounds in DMSO. The final concentration of DMSO in the culture medium was 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. After 48 h, we assessed the cytotoxicity using the resazurin reduction test [26]. Fluorescence was measured on an automated Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Cytotoxicity was expressed as the concentration that inhibited cell growth by 50% (IC<sub>50</sub>).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The essential oil of *T. vulgare* obtained by steam distillation method was yellow with a distinct odor. The extraction yield obtained after 3 h was 0.23% (w/w). The refraction index was 1.4797, and the density measured using pycnometer was

0.92396 g·mL<sup>-1</sup>. Table 5.1 presents the chemical composition of the essential oil as determined by GC-FID analysis. The oil was mainly comprised of oxygenated monoterpenes such as camphor (30.48%), borneol (14.80%), and 1,8-cineole (10.80%). The essential oil also contained camphene (7.29%), bornyl acetate (5.53%), and  $\alpha$ -pinene (4.43%). Our results confirm the findings of Collin et al. [17] for *T. vulgare* essential oil from northern Quebec.

We evaluated the biological properties of *T. vulgare* essential oil, including anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic effects, *in vitro* using cellular models. Our results for anti-inflammatory activity (Table 5.2), showed that the *T. vulgare* essential oil inhibited NO production (induced by LPS) with an IC<sub>50</sub> of 72  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Evaluation of the anti-inflammatory properties of the main compounds present in the oil showed that the most active compound was  $\alpha$ -humulene with an IC<sub>50</sub> of 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Table 5.2). Fernandes et al. [27] reported that  $\alpha$ -humulene reduced rat paw edema that had been induced by carrageenan. It also inhibited COX-2 and iNOS expression. Moreover, the authors concluded that  $\alpha$ -humulene might represent an important compound for the management and/or treatment of inflammatory diseases [27]. Other compounds, including  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -pinene, and  $\beta$ -pinene were also effective with an IC<sub>50</sub> ranging from 30 to 46  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  while caryophyllene oxide also inhibited NO production induced by LPS with an IC<sub>50</sub> of 183  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . In a previous study,  $\alpha$ -pinene was shown to inhibit NF- $\kappa$ B and JNK

activation as well as the expression of iNOS [28]. The anti-inflammatory properties of  $\beta$ -pinene and  $\alpha$ -terpinene have also been reported [29,30] as has caryophyllene oxide *in vivo* on mice models [31].

The essential oil of *T. vulgare* demonstrated antioxidant activity by significantly inhibiting the oxidation of DCFH induced by tert-butylhydroperoxide with an  $IC_{50}$  of  $51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Table 5.2). Using *in vitro* methods including DPPH, ABTS, and FRAP assays, Shaparov et al. [32] also reported a moderate level of antioxidant activity of *T. vulgare* essential oil. Unfortunately, the chemical composition of the oil was not analyzed and the compounds responsible for the activity were not identified. The antioxidant activity of essential oils is often attributed to terpenoids such as carvacrol, thymol, and eugenol [33]. However, our results for *T. vulgare* essential oil showed two compounds,  $\alpha$ -pinene and caryophyllene oxide, to be particularly effective having a respective  $IC_{50}$  of 3.4 and  $6.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A moderate level of antioxidant activity for  $\alpha$ -pinene, based on a DPPH assay, had been previously reported by Dai et al. [34]. However, to the best of our knowledge, this is the first time the antioxidant activity of caryophyllene oxide has been reported.

Numerous *Tanacetum* species produce essential oils that are known to have antibacterial activity including *T. balsamita*, *T. polycephalum*, *T. parthenium*, *T. longifolium*, and *T. cilicicum* [35–37]. Antibacterial activity of *T. vulgare* from

Roumania [9] and Slovakia [38] were also reported against gram-positive bacterial strains using the disc diffusion method. Moreover, *T. vulgare* essential oil from Tajikistan was found to be weakly effective against *E. coli* and MRSA [32]. In our study, we used a new antibiotic assay developed to test hydrophobic compounds as described in the Material and Methods section [25]. The results, presented in Table 5.2, show that *T. vulgare* essential oil was effective against *S. aureus* and *E. coli* with an  $IC_{50}$  of  $59 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $241 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. We also tested the antibacterial activity of the main constituents of *T. vulgare* essential oil against *E. coli* and *S. aureus*. Camphor was active against both bacterial strains having an  $IC_{50}$  ranging from 22 to  $26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Moreover, caryophyllene oxide and  $\gamma$ -terpinene were also active against *S. aureus* having a respective  $IC_{50}$  of  $10.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The antibacterial activity of camphor, caryophyllene oxide, and  $\gamma$ -terpinene has been previously reported in the literature [39,40] although the results are sometimes contradictory. For example, Kotan et al. [41] found camphor to be ineffective as an antibacterial compound. Our use of a new method that is better suited to hydrophobic matrices and compounds [25] may explain the differences in the study outcomes.

We assessed the cytotoxic activity of *T. vulgare* essential oil and its main compounds against human lung carcinoma A-549, colon adenocarcinoma DLD-1, human keratinocytes *HaCaT*, and healthy WS1 cell lines. *T. vulgare* essential oil was slightly cytotoxic against A-549 and WS1 with an  $IC_{50}$  higher than  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Table 5.2). Essential oil was also slightly cytotoxic against human keratinocytes

*HaCaT* with an  $IC_{50}$  of  $199 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Interestingly, DLD-1 (colon adenocarcinoma) was more sensitive to *T. vulgare* essential oil than other cell lines, having an  $IC_{50}$  of  $105 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . To the best of our knowledge, no studies have previously reported the cytotoxicity of *T. vulgare* essential oil against cancer cell lines. The major constituents of camphor, borneol, and 1,8-cineole, were all inactive with an  $IC_{50} > 200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . However, some minor compounds in the oil, including  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene, camphene, caryophyllene oxide, and limonene possessed a moderate cytotoxicity against all cell lines, including the tested cancer cell lines, with an  $IC_{50}$  ranging from 28 to  $112 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The cytotoxicity of these compounds against various cancer cell lines has also been previously reported [42–46].

#### 4. CONCLUSIONS

Analysis of the chemical composition of *T. vulgare* essential oil from northern Quebec, Qc, Canada, demonstrated that it was mainly comprised of oxygenated monoterpene such as camphor, borneol, and 1,8-cineole. The essential oil inhibited NO production (stimulated by LPS and induced by RAW 264.7). The compound  $\alpha$ -humulene was, in part, responsible for this anti-inflammatory effect. The antioxidant activity of the essential oil was, in part, due to  $\alpha$ -pinene and caryophyllene oxide. Caryophyllene oxide (as well as camphor) was also responsible for antibiotic activity. Finally, *T. vulgare* essential oil inhibited the growth of colorectal cancer cells. In conclusion, *T. vulgare* essential oil possesses interesting biological properties. This study reports, for the first time, the links between the compounds found in *T. vulgare* essential oil and anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities. Additional investigations of *T. vulgare* should be carried out for its potential use for cosmetic or pharmaceutical purposes.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

The authors are grateful to Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for their help with biological assays and Laboratoire PhytoChemia for advice regarding gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) system. We also thank Mammoud Rouhabia (Laval University) for providing *HaCaT* cells used in this study. This work was supported by funds from the *Fonds de Recherche Nature et Technologies*.

**CONFLICTS OF INTEREST:**

The authors declare no conflict of interest.

**CONTRIBUTION DES AUTEURS**

H. Côté a conçu et effectué les expérimentations, analysé les résultats et écrit le manuscrit de cet article. M.-A. Boucher a également contribué aux expérimentations, à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit. A. Pichette a analysé les données et révisé le présent manuscrit, et finalement J. Legault a conçu les expérimentations, analysé les données et contribué à la rédaction du manuscrit.

Table 5.1: Chemical composition of *T. vulgare* essential oil from northern Quebec, Canada

RI DB-5 <sup>1</sup>	RI S-Wax <sup>2</sup>	Identified Compounds	Relative CONCENTRATION (%)
903	991	Tricyclene	0.11
911	1010	$\alpha$ -Thujene	0.58
917	1006	$\alpha$ -Pinene	4.43
933	1035	Camphene	7.29
962	1085	Sabinene	2.02
965	1069	$\beta$ -Pinene	2.51
982	1160	dehydro-1,8-Cineole	0.23
1011	1148	$\alpha$ -Terpinene	0.09
1019	1242	$p$ -Cymene	1.20
1023	1172	Limonene	0.16 <sup>2</sup>
1025	1181	1,8-Cineole	10.80 <sup>2</sup>
1053	1222	$\gamma$ -Terpinene	0.29
1061	1443	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.11
1082	1254	Terpinolene	0.09
1096	1405	Filifolone	0.15
1100	1531	Linalol	0.38
1102	1386	$\alpha$ -Thujone	0.08
1109	1405	$\beta$ -Thujone	3.66
1117	1468	Chrysanthenone	3.76
1132	1614	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.64
1136	1471	Camphor	30.48
1153	1522	Pinocarvone	0.27
1160	1664	Borneol	14.80
1171	1570	Terpinen-4-ol	0.81
1176	1601	Thuj-3-en-10-al	0.45
1185	1667	$\alpha$ -Terpineol	0.69
1187	1579	Myrtenal	0.11
1190	1752	Myrtenol	0.09
1216	1799	<i>trans</i> -Carveol	0.10
1257	1539	<i>cis</i> -Chrysanthenyl acetate	0.10
1282	1545	Bornyl acetate	5.53
1352	2113	Eugenol	0.16
1370	1648	Isobornyl propionate	0.75
1391	1880	<i>cis</i> -Jasmone	0.08
1411	1556	$\beta$ -Caryophyllene	0.09
1446	1629	$\alpha$ -Humulene	0.21
1475	1667	Germacrene D	1.13
1482	1674	$\beta$ -Selinene	0.12



1491	1690	Bicyclogermacrene	0.16
1496	1698	$\alpha$ -Muurolene	<-Muuro
1505	1701	$\beta$ -Bisabolene	0.09
1499	1735	Germacrene A	0.09
1503	1721	$\delta$ -Amorphene	0.17
1509	1719	$\gamma$ -Cadinene (1513)	0.15
1519	1742	$\beta$ -Sesquiphellandrene	0.17
1522	1728	$\delta$ -Cadinene	0.63
1536	1865	$\alpha$ -Calacorene	0.19
1573	1922	Caryophyllene oxide	1.13
1593	1976	Ledol	0.65
1597	1970	Rosifoliol	0.07
1622	2015	1- <i>epi</i> -Cubenol	0.05
1624	2124	$\gamma$ -Eudesmol	0.11
1631	2138	$\tau$ -Muurolol	0.66
1635	2131	$\tau$ -Cadinol	0.19
1641	2171	$\beta$ -Eudesmol	<-Eudes
1647	2178	$\alpha$ -Cadinol	0.05
1663	2044	Valeranone	0.07
1713	1880	Pentadecanal	<entade
Total			99.23

<sup>1</sup> RI: Retention indices were obtained with a DB-5 column; <sup>2</sup> RI: Retention indices were obtained with a SolGel-Wax column.

Table 5.2: Anti-inflammation, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of *T. vulgare* essential oil and its main constituents

Compounds	Anti- Inflammation IC <sub>50</sub> (μg·mL <sup>-1</sup> )	Antioxidant IC <sub>50</sub> (μg·mL <sup>-1</sup> )	Antibacterial IC <sub>50</sub> (μg·mL <sup>-1</sup> )		Cytotoxicity (μg·mL <sup>-1</sup> )		IC <sub>50</sub> WS1
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	A549	DLD1	
Essential oil	72 ± 9	51 ± 11	241 ± 13	59 ± 5	232 ± 51	105 ± 18	292 ± 17
1,8-Cineole	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
α-Humulene	15 ± 2	>200	>200	>200	28 ± 1	43 ± 3	24 ± 3
α-Pinene	30 ± 4	3.4 ± 0.2	nd	nd	35 ± 6	58 ± 18	57 ± 4
α-Terpinene	46 ± 4	>200	>200	>200	63 ± 10	73 ± 7	53 ± 12
β-Caryophyllene	>200	>200	>200	>200	55 ± 5	97 ± 6	59 ± 7
β-Pinene	46 ± 9	>200	>200	>200	43 ± 4	49.4 ± 0.3	29 ± 14
γ-Terpinene	>200	>200	>200	50 ± 9	112 ± 15	>200	82 ± 15
p-Cymene	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Borneol	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Bornyl acetate	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Camphene	>200	>200	>200	>200	72 ± 2	75 ± 5	49 ± 1
Camphor	>200	>200	22 ± 1	26 ± 3	>200	>200	>200
Caryophyllene oxide	183 ± 15	6.2 ± 0.5	97 ± 2	10.4 ± 0.9	36 ± 2	43 ± 3	50 ± 4
Limonene	>200	>200	>200	>200	71 ± 6	31 ± 3	53 ± 12
Terpinen-4-ol	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Terpinolene	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

nd: not determined; L-NAME (1 mM), used as an anti-inflammatory positive control, produced an inhibition of NO production of 64.1%; Quercetin, used as an antioxidant positive control, had an IC<sub>50</sub> of 0.043 ± 0.002 μg·mL<sup>-1</sup>; Gentamycin and chloramphenicol were used as antibiotic positive controls. Gentamycin had an MIC<sub>90</sub> of 0.9 ± 0.2 μg·mL<sup>-1</sup> for *E. coli* and 0.0050 ± 0.00005 μg·mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*. Chloramphenicol had an MIC<sub>90</sub> of 0.9 ± 0.1 μg·mL<sup>-1</sup> for *E. coli* and 0.73 ± 0.03 μg·mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*; Etoposide, used as a cytotoxic positive control, had an IC<sub>50</sub> of 2.3 ± 0.2 μM, 2.8 ± 0.4 μM and 19 ± 3 μM for A-549, DLD-1, and WS1, respectively; All the experiments were carried out in triplicate and presented results are representative of at least three different experiments.

**REFERENCES**

1. Mitich, W.L. Tansy. *Weed Technol.* **1992**, *6*, 242–244.
2. Lahlou, S.; Tangi, K.C.; Lyoussi, B.; Morel, N. Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: In vitro pharmacological study. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 98–102.
3. Duke, J.A. *Handbook of Medicinal Herbs*, 2nd ed.; CRC Press: New York, NY, USA, 1985; p. 896.
4. Mordujovich-Buschiazzo, P.; Rosella, M.; Schinella, G. Anti-inflammatory activity of *Tanacetum vulgare*. *Fitoterapia* **1996**, *67*, 319–322.
5. Schinella, G.R.; Giner, R.M.; Recio, M.C.; Buschiazzo, P.M.; Ríos, J.L.; Mañez, S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 1069–1074.
6. Williams, C.A.; Harborne, J.B.; Geiger, H.; Houlst, J.R. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 417–423.
7. Stojković, M.B.; Mitić, S.S.; Pavlović, J.L.; Stojanović, B.T.; Paunović, D.D. Antioxidant potential of *Tanacetum vulgare* L. extracts. *Biol. Nyssana* **2014**, *5*, 47–51.
8. Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2002**, *97*, 1027–1031.
9. Mureşan, M.L. Antimicrobial effects of the ethanolic extracts and essential oils of *Tanacetum vulgare* L. from Romania. *Food Technol.* **2015**, *19*, 75–80.

10. Keskitalo, M.; Pehu, E.; Simon, J. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 267–285.
11. Mockute, D.; Judzentiene, A. Composition of the essential oils of *Tanacetum vulgare* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania). *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 550–553.
12. Nano, G.M.; Bicchi, C.; Frattini, C.; Gallino, M. Wild piedmontese plants—a rare chemotype of *Tanacetum vulgare* L., abundant in Piedmont (Italy). *Planta Med.* **1979**, *35*, 270–274.
13. Judzentiene, A.; Mockute, D. The inflorescence and leaf essential oils of *Tanacetum vulgare* L. var. *vulgare* growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 487–498.
14. Mockute, D.; Judzentiene, A. The myrtenol chemotype of essential oil of *Tanacetum vulgare* L. var. *vulgare* (tansy) growing wild in the Vilnius region. *Chemija* **2003**, *14*, 103–107.
15. Rohloff, J.; Mordal, R.; Dragland, S. Chemotypical variation of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) from 40 different locations in Norway. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1742–1748.
16. Nemeth, É.Z.; Héthelyi, É.; Bernath, J. Comparison studies on *Tanacetum vulgare* L. chemotypes. *J. Herbs. Spices Med. Plants.* **1994**, *2*, 85–92.
17. Collin, G.J.; Deslauriers, H.; Pageau, N.; Gagnon, M. Essential oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian origin. *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *5*, 629–638.
18. Schearer, W.R. Components of oil of Tansy (*Tanacetum vulgare*) that repel Colorado potato beetles (*Leptinotarsa Decemlineata*). *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*,

964–969.

19. Ekundayo, O. Essential oils II . Terpene composition of the leaf oil of *Tanacetum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* **1979**, *92*, 215–219.
20. Gallino, M. Essential oil from *Tanacetum vulgare* growing spontaneously in “Tierra del Fuego” (Argentina). *Planta Med.* **1988**, *54*, 182.
21. Hendriks, H.; Elst, D.J.D.; Putten, F.M.S.; Bos, R. The essential oil of Dutch Tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *J. Essent. Oil Res.* **2011**, *2*, 155–162.
22. Kumar, V.; Sharma, Y. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tanacetum longifolium*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2016**, *5*, 836–841.
23. Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Grenon, C.; Dussault, C.; Pichette, A. Antioxidant activity, inhibition of nitric oxide overproduction, and in vitro antiproliferative effect of maple sap and syrup from *Acer saccharum*. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 460–468.
24. Girard-Lalancette, K.; Pichette, A.; Legault, J. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chem.* **2009**, *115*, 720–726.
25. Coté, H.; Boucher, M.; Pichette, A.; Roger, B.; Legault, J. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *194*, 684–689.
26. Brien, J.O.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426.

27. Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.M.; Ferreirab, J.; Camposc, M.M.; Pianowskid, L.F.; Calixtoa, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *569*, 228–236.
28. Rufino, A.T.; Ribeiro, M.; Judas, F.; Salgueiro, L.; Lopes, M.C.; Cavaleiro, C.; Mendes, A.F. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- $\alpha$ -pinene: Structural and enantiomeric selectivity. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 264–269.
29. De Cássia da Silveira E Sá, R.; Andrade, L.N.; De Sousa, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* **2013**, *18*, 1227–1254.
30. Schepetkin, I.A.; Kushnarenko, S.V.; Özek, G.; Kirpotina L.N.; Utegenova, G.A.; Kotukhov, Y.A.; Danilova, A.N.; Özek, T.; Başer, K.H.; Quinn, M.T. Inhibition of human neutrophil responses by essential oil of *Artemisia kotuchovii* and its constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *63*, 4999–5007.
31. Chavan, M.J.; Wakte, P.S.; Shinde, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 149–151.
32. Sharopov, F.; Braun, M.S.; Gulmurodov, I.; Khalifaev, D.; Isupov, S.; Wink, M. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods* **2015**, *4*, 645–653.
33. Amorati, R.; Foti, M.C.; Valgimigli, L. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10835–10847.
34. Dai, J.; Zhu, L.; Yang, L.; Qiu, J. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. *Excli J.* **2013**, *12*, 479–490.

35. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
36. Malekpoor, F.; Pirbalouti, A.G.; Salimi, A.; Shabani, L.; Sharifi, M.; Hamed, B. Antimicrobial and antioxidant activities and total phenolic content of *Tanacetum polycephalum* Schutz. Bip. as a folkloric herb in South western Iran. *Indian J. Tradit. Knowl.* **2015**, *14*, 370–375.
37. Ulukanli, Z.; Demirci, S.; Yilmaztekin, M. Essential oil constituents of *Tanacetum cilicicum*: Antimicrobial and phytotoxic activities. *J. Food Qual.* **2017**,
38. Mikulášová, M.; Vaverková, Š. Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. *Nov. Biotechnol.* **2009**, *9*, 161–166.
39. Gupta, N.; Saxena, G. Antimicrobial activity of constituents identified in essential oils from *Mentha* and *Cinnamomum* through GC-MS. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2010**, *1*, 715–702.
40. Hsouna, A.B.; Halima, N.B.; Abdelkafi, S.; Hamdi, N. Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: Chemical composition and antimicrobial activities. *J. Oleo Sci.* **2013**, *980*, 973–980.
41. Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch. C.* **2007**, *62*, 507–513.
42. Fidy, K.; Fiedorowicz, A.; Strzadala, L.; Szumny, A.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.* **2016**, *5*, 3007–3017.

43. Girola, N.; Figueiredo, C.R.; Farias, C.F.; Azevedo, R.A.; Ferreira, A.K.; Teixeira, S.F.; Capello, T.M.; Martins, E.G.; Matsuo, A.L.; Travassos, L.R.; et al. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *467*, 928–934.
44. Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* **2003**, *69*, 402–407.
45. Park, K.; Nam, D.; Yun, H.; Lee, S.G.; Jang, H.J.; Sethi, G.; Cho, S.K.; Ahn, K.S.  $\beta$ -caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Lett.* **2011**, *312*, 178–188.
46. Sobral, M.V.; Xavier, A.L.; Lima, T.C.; de Sousa, D.P. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Sci. World J.* **2014**,



CHAPITRE VI.

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *MONARDA DIDYMA* L. ESSENTIAL OIL  
AND ITS EFFECT AS A DIET SUPPLEMENT IN MICE AND BROILER  
CHICKEN

**Working paper**

Title : The biological activity of *Monarda didyma* L. essential oil and its effect as a diet supplement in mice and broiler chicken

Authors : Héloïse Côté, André Pichette and Jean Legault\*

Affiliations :

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7G 4B7, Canada.

\*Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011 ext 2334. Fax: +1 418 545 5012.

E-mail address: [Jean.Legault@uqac.ca](mailto:Jean.Legault@uqac.ca)

Keywords: *Monarda didyma*, antibacterial activity, essential oil, broiler, mouse

L'article sera soumis prochainement à la revue *Poultry Science*.

## RÉSUMÉ

Depuis le milieu du 19<sup>e</sup> siècle, de faibles doses d'antibiotiques sont ajoutées de manière systématique dans la nourriture des animaux d'élevage en Amérique du Nord. Cet usage, bien que profitable pour les éleveurs, favorise l'apparition de bactéries multi-résistantes. Il est impératif de trouver des alternatives à l'utilisation des antibiotiques dans ce domaine, et l'utilisation d'extraits de plantes possédant des propriétés antibactériennes pourrait être une solution. Les plantes provenant de la famille des Lamiaceae possèdent des huiles essentielles aux propriétés antibactériennes particulièrement intéressantes. Au Canada, une plante typique de la famille des Lamiaceae, la monarde didyma (*Monarda didyma* L.), est utilisée depuis des milliers d'années par les Amérindiens pour traiter les coliques, les flatulences, les rhumes et la grippe. Cette huile essentielle pourrait être une bonne candidate pour remplacer les antibiotiques chez les poulets d'élevage. Dans cette étude, l'activité antibactérienne, anti-inflammatoire et antioxydante de l'huile essentielle de *M. didyma* a été analysée. Également, les composés majoritaires ont été déterminés à l'aide d'un GC-MS et d'un GC-FID. L'activité des composés majoritaires a également été analysée afin de connaître la contribution de chacun d'eux dans la bioactivité de l'huile essentielle. Des tests *in vivo* chez les souris et chez les poulets d'élevage ont été effectués afin de déterminer l'effet de l'ajout d'extraits sur le gain de poids, la consommation de nourriture et la mortalité des individus. L'huile essentielle de *M. didyma* est principalement constituée de carvacrol,  $\gamma$ -terpinène, thymol et *p*-cymène. Les résultats ont démontré une bonne activité antibactérienne de l'huile essentielle contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*, principalement associé au thymol et au carvacrol, ainsi qu'une activité antioxydante et anti-inflammatoire intéressante. Chez les souris, la supplémentation de la diète en huile essentielle augmente significativement le gain de poids tout en diminuant la consommation de nourriture. Chez les poulets, l'huile essentielle de *M. didyma* augmente significativement le poids de 2,64 % comparativement aux poulets témoins.

supplémentés d'antibiotiques. Également, la mortalité n'est pas significativement différente entre les deux groupes. Ces résultats confirment que l'ajout d'huile essentielle de *M. didyma* dans l'alimentation des poulets pourrait être une alternative intéressante aux antibiotiques. Par contre, des recherches supplémentaires doivent être effectuées afin de valider et d'optimiser le traitement.

**ABSTRACT**

The use of growth-promoting antibiotics in livestock faces increasing scrutiny and opposition due to concerns of increased antibiotic-resistant bacteria. Alternative solutions are being sought, and essential oils offer potential for replacing synthetic antibiotics, as they have shown positive effects on animal growth and health. Plants of Lamiaceae are known for their antibacterial and antioxidant properties in traditional medicine and may provide an alternative to synthetic antibiotics in animal nutrition. In this study, we extracted essential oil from *Monarda didyma*, a member of the Lamiaceae family. We examined the chemical composition of the essential oil and then evaluated the antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *M. didyma* essential oil and its main compounds *in vitro*. We then evaluated the effectiveness of *M. didyma* essential oil in regard to growth performance, feed efficiency, and mortality in both mice and broilers. Carvacrol (49.03%) was the dominant compound in the essential oil extracts, followed by  $\gamma$ -terpinene (16.90%), *p*-cymene (7.60%), and thymol (6.17%). *M. didyma* essential oil demonstrated antibacterial properties versus *Escherichia coli* (IC<sub>90</sub> = 66  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Staphylococcus aureus* (IC<sub>90</sub> = 33  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), and *Clostridium perfringens* (IC<sub>90</sub> = 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The essential oil also showed marked anti-inflammatory (IC<sub>50</sub> = 35  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and antioxidant activities (IC<sub>50</sub> = 4.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 0.52  $\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Supplementing the diet of mice with essential oil at a concentration of 0.1% significantly increased body weight (+5.4%) and feed efficiency (+18.85%). In broilers, *M. didyma* essential oil significantly improved body weight gain (2.64%).

Mortality rates were similar for both the test and control broilers. Our results suggest that adding *M. didyma* essential oil to the diet of broilers offers a potential substitute to antibiotic growth promoters.

## 1. INTRODUCTION

Antibiotics growth promoters (AGP) have long been used in animal nutrition to reduce mortality and increase the feed conversion ratio and body weight gain, especially for broilers and swine (Weber et al., 1952; Feighner and Dashkevich, 1987; Dibner and Richards, 2005; Graham et al., 2007; Srivastava, 2010). The AGP given for animal nutrition and agents used for treatment against bacterial infection in humans often belong to the same classes of antibiotics; this heightens the risk of bacteria developing a resistance to antibiotics (Diarra and Malouin, 2014). The enhanced resistance and the issues surrounding the excessive use of in-feed AGP have led researchers to search out more natural alternatives. In Europe, AGP has been prohibited for use in animal nutrition since 2006 (Dibner and Richards, 2005).

In Canada, poultry production involves more than 2600 regulated chicken producers who have access to several AGP approved as feed additives for poultry (Diarra and Malouin, 2014). The use of AGP in Canada is still permitted; however since 2014, producers have been forced to remove those antibiotics considered as the most important for human health. This important restriction is part of a strategy involving the responsible use of antibiotics by producers and the search for new alternatives. A

similar strategy for controlling antibiotic resistance is used in the United States, although there are some differences in regard to their classification of antibiotics to the Canadian and World Health Organization (WHO) classifications.

The drive for alternatives to standard AGP involves finding compounds that ensure poultry health and decrease bacterial resistance while maintaining producer profitability. As natural and multi-active agents, plant extracts and plant-derived products offer an interesting potential as substitutes to synthetic antibiotics and inorganic chemicals (Edris, 2007). Both the food industry and animal producers have increased their interest in the use of essential oils (EO - volatile plant compounds), primarily for their antimicrobial, coccidiostatic, antihelmintic, antioxidative, and anti-inflammatory properties (Nakatani, 2000; Craig, 1999; Burt, 2004; Diaz-Sanchez *et al.*, 2015). The positive effects of EO in the digestive tract of animals include the stabilizing of gut microflora; this benefit could lead to further practices that improve intestinal health, digestion, and growth performance of livestock (Diarra and Malouin, 2014).

Some EOs have already been investigated in animal nutrition studies (William and Losa 2001; Lee 2002, Brenes and Roura 2010; Hashemi and Davoodi 2011; Khattak *et al.* 2014; Zeng *et al.* 2015). Plants from Lamiaceae family are particularly promising (Hernández *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Cross *et al.*, 2007; Khattak *et al.*, 2014); for example, Denli *et al.* (2004) added thyme essential oil to the diet of quail resulting in significantly higher body weight gain and better-feed efficiency relative to a control group. In Canada, a member of the Lamiaceae, *Monarda didyma*

L., has been used for millennia by indigenous people in North America to treat colic, flatulence, colds, and flu. This plant is also used in infusions for intestinal and stomach problems (Hamel and Chiltoskey, 1975) and is particularly useful for treating digestive disorders (Fraternale et al., 2006).

At present, there are no studies of the bioactivity of *M. didyma* EO. Nonetheless, compounds such as thymol and carvacrol—often present in the EO of *Monarda* species (Fraternale et al., 2006) have marked antibacterial and anti-inflammatory activities (Ben Arfa et al., 2006; Nostro et al., 2007; Xu et al., 2008). Moreover, Ertas et al. (2005) showed that thymol and carvacrol help stimulate digestion by affecting pathogenic microorganisms in the gut of broilers, thereby increasing their food conversion rate and weight. The protection and reinforcement of the intestinal microbiome in broilers is critical for maintaining the overall health and optimal absorption of nutrients in these animals (Danzeisen et al., 2011).

In this study, we use steam distillation to extract *M. didyma* EO, and we run GC-MS and GC-FID to analyze the composition of the EO. We assess the antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *M. didyma* EO *in vitro* and compare our results with the positive control *Thymus vulgaris* (Denli et al., 2004). We identify the main compounds responsible for the biological activities and then evaluate the effects of *M. didyma* EO on the growth performance, feed intake, and feed efficiency of mice and broilers.



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals

Standard compounds used for GC analyses and biological testing were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); the compounds included thymol, carvacrol,  $\gamma$ -terpinene,  $\rho$ -cymene,  $\alpha$ -terpinene, myrcene, and limonene.

### 2.2. Plant Material and Extraction of Essential Oil

*Monarda didyma* L. EO had been extracted by steam distillation for three hours from freshly harvested aerial parts (refractive index = 1.4977; density = 0.939 g·mL<sup>-1</sup>). We also purchased *Thymus vulgaris* L. EO (refractive index = 1.4797; density = 0.923 g·mL<sup>-1</sup>) from Aliksir (Grondines, Québec, Canada). The EO yield from extraction depended on the total amount of the raw material. The EO was then stored in the dark at a temperature of 4°C until needed.

### 2.3. GC-MS Analysis

We ran all chromatographic analyses on an Agilent GC-MS composed of a 7890A GC system fitted with a split/splitless inlet and a GC sampler 80 coupled with an Agilent mass spectrometer 5975C MSD (EI mode 70 eV). Separations were performed on an apolar Agilent DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm; film

thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), and a polar Solgel-Wax column (30 m  $\times$  0.25 mm; film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) produced the separations using 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$  of helium as the carrier gas. Injections were performed in splitless mode. Inlet, transfer line, MS source, and MS quadrupole temperatures were set at 200°C, 300°C, 230°C, and 150°C, respectively. We identified compounds by their retention index and mass spectra using the Wiley 6n and NIST08 database and standard injection when available.

To prepare samples for GC/MS analyses, we diluted 5  $\mu\text{L}$  of EO in 500  $\mu\text{L}$  of hexane and injected 3  $\mu\text{L}$  of this preparation into the GC-MS. The optimal method that allows the identification of compounds present in essential oil begins with an oven at 40°C for 2 min, gradually raised to 210°C at 2°C/min for 33 min.

#### *2.4. In vitro activity of essential oil*

##### *2.4.1. Cell Culture*

We obtained healthy human cell lines WS1 (ATCC CRL-1502) and the murine macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71) from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ , in Dulbecco's minimum essential medium supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 1  $\times$  solution of sodium pyruvate, 1  $\times$  vitamins, 1  $\times$  non-essential amino acids, 100 IU of penicillin, and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

streptomycin (Cellgro<sup>®</sup>, Mediatech, Manassas, VA, USA).

#### 2.4.2. Bacterial strains

The *in vitro* antimicrobial activity of *M. didyma* EO was tested against gram-negative *Escherichia coli* (ATCC 25922), gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and gram-positive *Clostridium perfringens*. All three bacterial strains were provided by the Chicoutimi Hospital, Saguenay, Canada.

#### 2.4.3. Culture methods

Bacteria were stored at -80°C until use. For culturing the bacteria, all bacteria were placed in a nutrient broth base (Difco) for 16–18 h at 37°C; *C. perfringens* was grown in an anaerobic vial. We measured the cellular density of the inoculum via optical density measured at 600 nm for *E. coli* (Pal et al., 2007), 660 nm for *S. aureus* (Kaatz et al., 2000), and 450 nm for *C. perfringens* using a Multiskan™ GO Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The inoculum was re-diluted in the nutrient broth to obtain the required bacterial concentration.

#### 2.4.4. Measurement of Anti-Inflammatory Activity

We evaluated the inhibition of nitric oxide (NO) production by *M. didyma* EO and compounds following Legault et al. (2010). Control L-NAME was used as a positive control. We incubated the murine macrophage RAW 264.7 cells with EO or dissolved compounds in DMSO, then stimulated the cells using  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . After 24 h, we collected the cell-free supernatant and immediately determined the NO concentration using the Griess reaction. The absorbance was read at 540 nm using an automated Varioskan Ascent plate reader, and we quantified the presence of nitrite by comparing with a  $\text{NaNO}_2$  standard curve.

#### 2.4.5. Evaluation of Antioxidant Activity Using Cell-Based Assays

We evaluated the antioxidant activity using the DCFH-DA assay as described by Girard-Lalancette et al. (2009). We incubated human skin fibroblasts WS1 for 1 h with a growing concentration of EO or dissolved compounds in DMSO. We then added  $100 \mu\text{L}$  of  $200 \mu\text{M}$  tert-butylhydroperoxide and immediately measured fluorescence and again after 90 min. Measurements were made on an automated plate reader (Fluoroskan Ascent FL, LabSystems, Milford, MA, USA) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Antioxidant activity was expressed as the concentration of extract inhibiting 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) of DCFH oxidation.

#### 2.4.6. Evaluation of Antioxidant Activity Using ORAC

We followed the method described by Ou et al. (2001) with some modifications. Briefly, the ORAC assay was carried out in black 384-well microplates (Nunc) on a Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems) equipped with an automated injector. We used four concentrations of Trolox (the control standard) (1.56, 3.13, 6.25, and 12.5  $\mu\text{M}$ ) in quadruplicate, and we prepared a gradient of 16 concentrations of the samples (compounds dissolved in DMSO or pure EO) without replication. The experiment was conducted at 37.5°C and in a pH 7.4 phosphate buffer with a blank sample run in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence ( $\lambda$  ex.: 485 nm/em.: 530 nm) of fluorescein every minute after the addition of 375 mM of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), for a total of 60 min. The final values were calculated using the net area under the curves of the sample concentrations for which a decrease of at least 95% of fluorescence was observed at 60 min. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ( $\mu\text{mol TE}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### 2.4.7. Evaluation of Antibacterial Activity

We tested the antibacterial activity of *M. didyma* EO and compounds using the antibacterial hydrophobic assay as described by Côté et al. (2016). Briefly, after

microorganisms passed 16–18 h at 37°C in a nutrient broth base (Difco), we transferred 20 µL methanol containing growing concentrations of EO and compounds (3.1 to 200 µg·mL<sup>-1</sup>) onto nutrient agar in 96-well plates. We then added bacterial strains having a concentration of  $5 \times 10^3$  colony forming units (CFU) per mL of nutrient broth. Bacterial suspension without treatment was used as negative control, and bacterial suspension plus solvent were tested in parallel to demonstrate the absence of solvent toxicity. The blank consisted of a culture medium only and was subtracted from all subsequent measurements of each well. The 96-well plates were then incubated at 37°C for 5 h to foster bacterial growth. We then added 100 µL of resazurin sodium salt solution having a concentration of 50 µg·mL<sup>-1</sup> (Sigma R-2127, St-Louis, MO, USA) to each well. Fluorescence was read on an automated Fluoroskan Ascent FL<sup>TM</sup> plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) after 2 h for *S. aureus* and 3 h for *E. coli* and *C. perfringens*. The MIC<sub>90</sub> was determined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of bacterial growth.

### 2.5. Experimental design in mice

Mice were fed with mouse diet specifically designed to support the growth and maintenance of animals (LabDiet 5015; 20% protein, 25% fat, 55% carbohydrate). We prepared the treatments by adding concentrations of *M. didyma* and *T. vulgaris* (used as positive control) EO at 0.2% and 0.1%, respectively, to the original control diet. The food containing EO was prepared every week to ensure its freshness and

quality. Our experiment was assessed for its ethical acceptability and was approved by the APC (Animal Protection Committee of UQAC - Université du Québec à Chicoutimi). Mice were housed in cages in an environmentally controlled room having 12 h of darkness followed by a period of 12 h of light during the entire run of the experiment. Each cage was provided with a single feed and water system to provide ad libitum access. Fifty (50) mice (five-week-old Charles-River males) were placed in cages; each cage contained five randomly selected mice (two replicates). Each cage was assigned to one of five dietary treatments (four EO treatments and one negative control), giving a total of ten (10) experimental cages. The study was completed after 80 days of treatment. We measured body weight (BW) twice a week and determined average feed intake (FI) on a weekly basis. For each week, we calculated the feed conversion efficiency (FE) per cage based on the average BW and FI per mouse.

#### *2.6. Experimental design in broiler*

We divided male broilers ( $n = 8216$ ) into four treatment groups: two control ( $n = 2054$  each) and two treatment ( $n = 2054$  each). The broilers were installed in an insulated room with facilities to control temperature, light, and humidity according to industry standards. Broilers were fed with Nutrinor standard diet for poultry. The feeding program consisted of a starter (1–10 d), growth (11–20 d), and finisher (21–

35 d) diet given to broiler ad libitum. The treatment group received 0.5% *M. didyma* EO in starter diet, 0.1% EO in the growth diet, and 0.05% EO in the finisher diet. We weighed broilers daily using an automatic balance installed in the hen house. We recorded mortality daily and determined total feed intake at the end of the experiment.

### 2.7. Statistical analysis

We ran analysis of variance (ANOVA) on all our collected data using the statistical analysis system, Sigma STAT. If appropriate, we performed multiple comparison procedures with the Holm-Sidak method. Statements of statistical significance are based on  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

*M. didyma* EO, isolated by steam distillation, comprised mainly of monoterpenes, which represented approximately 98% of the total, and some sesquiterpenes (1.24%). *M. didyma* EO contained a high level of carvacrol (49.03%). The other main compounds were  $\gamma$ -terpinene (16.90%),  $p$ -cymene (7.60%), thymol (6.17%), carvacrol methyl ether (4.18%), 1-octen-3-ol (3.07%),  $\alpha$ -terpinene (2.79%), myrcene (2.33%),  $\alpha$ -thujene (1.39%), and limonene (1.03%) (Table 6.1). In total, we identified



23 compounds; all compounds had already been described in the scientific literature (Adams 2007).

These compound concentrations showed some differences with previous work on EO extracts from *M. didyma*. In contrast to our observation of highest levels for carvacrol, Ricci et al. (2017), analyzing EO from *M. didyma* cultivated in central Italy, found thymol (59.3%) to be the most dominant compound, followed by p-cymene (10.3%), terpinolene (9.2%), d-3-carene (4.4%), myrcene (3.7%), and camphene (3.4%). Scora (1967), using *M. didyma* EO from California, found  $\gamma$ -terpinene (27.36%) as the most important compound, followed by  $\delta$ -limonene (12.93%), 1,8 cineole (12.24%), bornyl acetate (7.74%), ketone (5.50%),  $\beta$ -myrcene (4.88 %), linalyl acetate (5.06%),  $\alpha$ -terpinol (4.20%), and  $\alpha$ -pinene (3.10%). Scora (1967) did not observe thymol or carvacrol in their EO samples; they conclude that the oil of the inflorescences held lower amounts of terpene components. Finally, Carron et al. (2007) analyzed several North American *Monarda* species. They found thymol and carvacrol to vary markedly between taxa, ranging from 8.5% thymol and 2.9% carvacrol in *M. didyma* (red bergamot variety) to 46.6% thymol and 19.2% carvacrol in *M. fistulosa* (Richters variety).

The high relative concentration of carvacrol and the presence of thymol suggested a promising antibacterial activity for *M. didyma* EO. Our observations of the antibacterial activity of *M. didyma* EO against *E. coli* ( $IC_{90} = 66 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and against *S. aureus* ( $IC_{90} = 33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) confirmed this antibacterial potential. The positive control *Thymus vulgaris* was also effective against *E. coli* ( $IC_{90} = 159$

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and *S. aureus* ( $\text{IC}_{90} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The antibacterial activity of *M. didyma* EO versus *E. coli* and *S. aureus* was provided mainly by carvacrol, which had respective  $\text{IC}_{90}$  values of  $59 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and thymol, which had respective  $\text{IC}_{90}$  values of  $91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $145 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . *M. didyma* EO was also active versus *C. perfringens*, producing a  $\text{IC}_{90}$  of  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; this antibacterial activity versus *C. perfringens* was provided mainly by carvacrol that had an  $\text{IC}_{90}$  of  $17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , as well as thymol, having an  $\text{IC}_{90}$  of  $51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and also limonene, which produced an  $\text{IC}_{90}$  of  $26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Table 6.2).

*M. didyma* EO also demonstrated anti-inflammatory activity. A concentration of  $35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  inhibited fifty percent ( $\text{IC}_{50}$ ) of NO induced by LPS in Raw 264.7 macrophages. Carvacrol ( $\text{IC}_{50} = 22.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and  $\rho$ -cymene ( $\text{IC}_{50} = 25.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) appeared to be responsible, in part, for this activity. Furthermore, a cell-based assay with an  $\text{IC}_{50}$  of  $4.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  highlighted the EO antioxidant activity (Table 6.3).

The antibacterial and antioxidant activities of other members of the Lamiaceae family have been observed, principally for *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* (Sivropoulou et al. 1996, Dorman and Deans 2000, Saini et al. 2003, Rota et al. 2008); however, the biological activities of *M. didyma* are less known. Fraternali et al. (2006) used a DPPH and lipid peroxidation test to demonstrate the elevated antioxidant activity of *M. didyma* EO. Numerous studies have highlighted the antibacterial and antioxidant activities of EO that possess high levels of phenolic compounds such as thymol, carvacrol, and eugenol (Burt 2004, Nostro et al. 2007, Xu et al. 2008). Thymol and carvacrol appear particularly effective against gram-

negative bacteria, in part because these compounds act on the outer membrane, such as by provoking the release of lipopolysaccharides, increasing the permeability of the cytoplasmic membrane to ATP, and depolarizing the cytoplasmic membrane (Xu et al., 2008). Antioxidant and anti-inflammatory effects of the EO can produce a positive effect in the gastrointestinal tract. These EO benefits on inflammatory processes are mediated by their effects on mucosal cytokine production and action, or EO may also be associated with the TLR4-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway (Ji et al., 2016). Bukovshà et al. (2007) demonstrated this positive effect *in vivo* using the EO of thyme and oregano. Similar to our study, Xu et al. (2008) also observed thymol and carvacrol activity against *E. coli*.

Given that *M. didyma* EO demonstrated *in vitro* activities, we assessed the effectiveness of different concentrations of EO in the diet of mice on BW gain, FI, and FE. We observed a significant difference between the treatment groups and the negative control group for BW ( $p < 0.001$ ), FI ( $p < 0.001$ ), and FE ( $p < 0.001$ ) (Table 6.4). Supplementing the mouse diet with EO increased mouse BW throughout the experiment. EO concentrations of 0.1% *M. didyma* and 0.1% *T. vulgaris* markedly increased mouse BW (respectively 5.4% and 9.4%), compared with the untreated mice (average of 5.58 g). EO dietary supplements decreased overall FI ( $p < 0.001$ ) for all EO concentrations, especially for *M. didyma* 0.2% (145.24 g) and *M. didyma* 0.1% (141.58 g), compared to untreated mice (164.83 g). Finally, *M. didyma* 0.1% and *M. didyma* 0.2% produced the highest FE ratios at 23.98 and 25.13, respectively.

Therefore, diets supplemented with *T. vulgaris* EO and *M. didyma* EO at levels of 0.2% and 0.1% improved mouse BW and FE compared to the negative control.

No studies have yet tested EO diet supplements in mice; however, Denli et al. (2004) observed *T. vulgaris* EO to produce a BW gain and improved FE for quail. Platel et al. (2001) concluded that adding various spices in food enhanced either enzyme activity related to digestion or increased the secretion of bile. Yang et al. (2018) observed that EO supplementation during the growth period increased significantly lipase, trypsin, and chymotrypsin activities. EO also increased the fecal digestibility of dry matter and the digestibility of ether extract, fiber, fat, ash, and protein (Hernández et al., 2004). We attribute the improvement of BW and FE in our study of mice to these processes.

When we added *M. didyma* EO to the diet of male broilers, we observed that during the growth period of 36 days, the treated broilers attained 2.65 kg with an average of 4.46 kg of food intake by the animals. Control broilers with standard antibiotics weighed 2.58 kg after an average feed intake of 4.51 kg. Broilers fed with the EO-supplemented diet therefore showed an increased BW of 2.64% compared to control animals fed using standard antibiotics (Table 6.5). We observed a significant difference for BW between the control and *M. didyma* EO broilers in the first 10 days (268.5 g and 279 g, respectively). During the growth and finisher phases, broilers fed with the EO diet were significantly heavier than the control broilers with antibiotics and followed the same growth curve.

Existing studies identify four different mechanisms that are important for EO action—sensorial, metabolic, antioxidant, and antibacterial activities (Brenes and Roura, 2010). Hashemipour et al. (2013) demonstrated that supplementing a broiler diet with 100 mg/kg and 200 mg/kg of thymol and carvacrol, respectively, produced no effect on feed intake, but significantly increased BW gain and improved the feed conversion ratio. Antibiotics in animals improve the BW by 5–6% and the FE by 3–4% with the most pronounced effects are observed in young animals (Diarra and Malouin, 2014). Khattak et al. (2014), supplementing the diets of broilers with a natural blend of EO (including thyme and oregano), observed no significant difference in growth performance during the starter period. Although higher mortality rates could be expected in the EO test group due to the lack of antibiotic use, Khattak et al. (2014) found no significant difference between the mortality of broilers having the EO-supplemented diet and that of the control broilers.

Our results confirmed the *in vitro* antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *M. didyma* EO. Diet supplemented with *M. didyma* EO significantly increased mouse BW and suggested good biological activity in broilers. EO has a good potential as an alternative to synthetic antibiotics as a part of animal nutrition. Future research must explore *M. didyma* EO *in vivo* antibacterial activity against *E. coli*, *C. perfringens*, and *Eimeria* sp. Nonetheless, the mode of action of *M. didyma* EO remains to be specified, and optimal dosages of *M. didyma* EO in the starter, growth, and finisher phases of broiler diet remain to be fixed.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for their help and suggestions with using the biological assay; Claire Fournier and Joanie Tremblay are thanked for their help with the mice experiments, and we thank Chantale Bélanger from Nutrinor for her help with the broiler assay. This work was supported by funds from the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (2012-VN-164529) and Nutrinor

**CONTRIBUTION DES AUTEURS**

Héloïse Côté et Jean Legault ont conçu et effectué les expérimentations, analysé les résultats et écrit le manuscrit de cet article. André Pichette a analysé les données et révisé le présent manuscrit.

Table 6.1: Composition of *Monarda didyma* essential oil

Identified compounds			<i>Monarda didyma</i> (%)
RI	Name	Identification <sup>1</sup>	
930	$\alpha$ -thujene	MS, RI	1.39
938	$\alpha$ -pinene	MS, RI	0.43
955	camphene	MS, RI	-
976	1-octen-3-ol	MS, RI	3.07
992	myrcene	MS, RI	2.33
1010	$\alpha$ -phellandrene	MS, RI	0.36
1016	$\delta$ -3-carene	MS, RI	0.16
1022	$\alpha$ -terpinene	MS, RI	2.79
1030	$\rho$ -cymene	MS, RI	7.60
1034	limonene	MS, RI	1.03
1064	$\gamma$ -terpinene	MS, RI	16.90
1072	cis-sabinene-hydrate	MS, RI	0.25
1094	linalool	MS, RI	0.15
1174	terpinen-4-ol	MS, RI	0.11
1185	$\alpha$ -terpineole	MS, RI	0.79
1232	thymol methyl ether	MS, RI	0.86
1248	Carvacrol methyl ether	MS, RI	4.18
1294	thymol	MS, RI	6.17
1306	carvacrol	MS, RI	49.03
1435	$\beta$ -caryophyllene	MS, RI	0.89
1488	germacrene D	MS, RI	0.12
1511	$\gamma$ -cadinene	MS, RI	0.23
1528	D-cadinene	MS, RI	-
	Total		98.84

<sup>1</sup>MS: Identification by GC-MS; RI: Validation by retention time in comparison with literature data; Std: Validation by injection of commercial standards..

Table 6.2: Antibacterial activity of *M. didyma* and *T. vulgaris* (as positive control) essential oils and its main compounds against selected bacterial strains

Compounds	Antibacterial activity		
	MIC <sub>90</sub> (µg·mL <sup>-1</sup> )		MIC <sub>90</sub> (µg·mL <sup>-1</sup> )
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>
<i>Thymus vulgaris</i> EO	159 ± 18	100 ± 4	ND
<i>Monarda didyma</i> EO	66 ± 3	33 ± 4	20 ± 4
Thymol	91 ± 4	145 ± 4	51 ± 2
Carvacrol	59 ± 14	54 ± 4	17 ± 6
α-terpinene	>200	>200	ND
γ-terpinene	>200	>200	ND
p-cymene	>200	>200	ND
Limonene	>200	>200	26 ± 3
Myrcene	>200	>200	ND

ND: Not determined

Data are representative of three different experiments.

Mean ± standard deviation,  $n = 3$

MIC<sub>90</sub> is defined as the lowest concentration inhibiting 90% of bacterial growth



Table 6.3: Antioxidant and anti-inflammatory activity of *M. didyma* and *T. vulgaris* (as positive control) essential oils and its main compounds

Compounds	Antioxidant		Anti-inflammatory
	Cell-based assay	ORAC	IC <sub>50</sub> (μg·mL <sup>-1</sup> )
	IC <sub>50</sub> (μg·mL <sup>-1</sup> )	μmol Trolox·mg <sup>-1</sup>	
<i>Thymus vulgaris</i> EO	11 ± 9	0.40 ± 0.18	64 ± 6
<i>Monarda didyma</i> EO	4.6 ± 0.3	0.52 ± 0.01	35 ± 4
Thymol	>200	1.34 ± 0.03	>200
Carvacrol	54 ± 9	2.3 ± 0.3	22.6 ± 0.2
α-terpinene	3.4 ± 0.2	0.17 ± 0.05	>200
γ-terpinene	ND	ND	>200
p-cymene	>200	0.02 ± 0.01	25.5 ± 0.9
Limonene	6.2 ± 0.5	0.08 ± 0.02	22 ± 7
Myrcene	92 ± 4	0.04 ± 0.01	>200
Trolox	ND	9 ± 1	ND

ND: Not determined

Data are representative of three different experiments.

Mean ± standard deviation,  $n = 3$

MIC<sub>50</sub> is defined as the lowest concentration inhibiting 50% of bacterial growth

Table 6.4: Comparison of mean body weight gain (g), feed intake (g), and feed efficiency of the mouse treatments.

Treatments	Body weight gain (g) (BW)	Feed intake(g) (FI)	Feed efficiency (FI/BW)
	0–80 days	0–80 days	0–80 days
Control	5.58 <sup>a</sup>	164.83 <sup>a</sup>	29.55 <sup>a</sup>
<i>T. vulgaris</i> 0.2%	5.56 <sup>b</sup>	154.96 <sup>b</sup>	27.87 <sup>b</sup>
<i>T. vulgaris</i> 0.1%	6.16 <sup>b</sup>	163.39 <sup>c</sup>	26.54 <sup>c</sup>
<i>M. didyma</i> 0.2%	5.78 <sup>c</sup>	145.24 <sup>c</sup>	25.13 <sup>c</sup>
<i>M. didyma</i> 0.1%	5.90 <sup>c</sup>	141.58 <sup>c</sup>	23.98 <sup>c</sup>

Values with different letters (a–f) differ significantly (two-way analysis of variance,  $p < 0.05$ ).

Table 6.5: Comparison of mean body weight gain (g), feed intake (g), and feed efficiency of the broiler treatments.

Treatments	Body weight gain (g) (BW)		Feed intake (g) (FI)		Feed efficiency (FI/BW)	
	0–10 days	0–36 days	0–10 days	0–36 days	0–10 days	0–36 days
Antibiotics suppl.	268.5 <sup>a</sup>	2578 <sup>a</sup>	384.71 <sup>¥</sup>	4514.25 <sup>¥</sup>	1.43 <sup>¥</sup>	1.75 <sup>¥</sup>
<i>M. didyma</i> suppl.	279 <sup>b</sup>	2652 <sup>b</sup>	360.36 <sup>¥</sup>	4455.81 <sup>¥</sup>	1.29 <sup>¥</sup>	1.68 <sup>¥</sup>

<sup>¥</sup>Values are available only at the end of the experiment

Values in the same column with different letters (a–b) differ significantly (two-way analysis of variance,  $p < 0.05$ ).

**REFERENCES**

- Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Fourth edition. Allured Publishing Corporation.
- Ben Arfa, A., S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard, and P. Chalier. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43:149–154.
- Brenes, A., and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* 158:1–14.
- Bukovská, A., S. Čikoš, S. Juhás, G. Il'ková, P. Reháč and J. Koppel. 2007. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators of Inflammation* 23296: 1-9.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223–253.
- Carron, C.-A., L. Jaunin, and A.-F. Grogg. 2007. La monarde fistuleuse, source naturelle de geraniol, d'acide rosmarinique et de flavonoides. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture* 39:229–235.
- Coté, H., M.-A. Boucher, A. Pichette, B. Roger and J. Legault. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Journal of Ethnopharmacology* 194: 684-689.
- Craig, W. J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70:491S–499S.
- Cross, D. E., R. M. McDevitt, K. Hillman, and T. Acamovic. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut

- microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science* 48:496–506.
- Danzeisen, J. L., H. B. Kim, R. E. Isaacson, Z. J. Tu, and T. J. Johnson. 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PloS One* 6:e27949.
- Denli, M., F. Okan, and A. N. Uluocak. 2004. Effect of dietary supplementation of herb essential oils on the growth performance, carcass and intestinal characteristics of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *South African Journal of Animal Science* 34:174–179.
- Diarra, M. S., and F. Malouin. 2014. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in Microbiology* 282: 1-15.
- Diaz-Sanchez, S., D. D’Souza, D. Biswas, and I. Hanning. 2015. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poultry Science* 94:1419–1430.
- Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84:634–643.
- Dorman, H. J., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308–316.
- Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents : a review. *Phytotherapy Research* 21: 308-323.
- Ertas, O. N., T. Güler, M. Çiftçi, B. Dalkilic, and Ü. G. Simsek. 2005. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. *International Journal of Poultry Science* 4:879–884.
- Feighner, S. D., and M. P. Dashkevicz. 1987. Subtherapeutic levels of antibiotics in

poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 53:331-336.

Fraternale, D., L. Giamperi, A. Bucchini, D. Ricci, F. Epifano, G. Burini, and M. Curini. 2006. Chemical composition, antifungal and *in vitro* antioxidant properties of *Monarda didyma* L. essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 18:581–585.

Girard-Lalancette, K., A. Pichette, and J. Legault. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry* 115:720–726.

Graham, J. P., J. J. Boland, and E. Silbergeld. 2007. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Public Health Reports* 122:79–87.

Hamel, P. B., and M. U. Chiltoskey. 1975. Cherokee plants and their uses - A 400 year history. Herald Publishing Co., Sylva, N.C. 72 p.

Hashemi, S. R., and H. Davoodi. 2011. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications* 35:169–180.

Hashemipour, H., H. Kermanshahi, A. Golian, and V. Khaksar. 2013. Effects of carboxy methyl cellulose and thymol + carvacrol on performance, digesta viscosity and some blood metabolites of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98:1–8.

Hernández, F., J. Madrid, V. García, J. Orengo, and M. D. Megías. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science* 83:169–174.

Ji, K. L., X. Q. Gan, Y. K. Xu, X. F. Li, J. Guo, M. M. Dahab, P. Zhang. 2016. Protective effect of the essential oil of *Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* against dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation in mice. *Phytomedicine* 23:883-890.

Kaatz, G. W., S. M. Seo, L. O. Brien, T. J. Foster, and M. Wahiduzzaman. 2000. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1404–1406.

Khattak, F., A. Ronchi, P. Castelli, and N. Sparks. 2014. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. *Poultry Science* 93:132–137.

Lee, K.-W. 2002. Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science* 3: 738-752.

Legault, J., K. Girard-Lalancette, C. Grenon, C. Dussault, A. Pichette. 2010. Antioxidant activity, inhibition of nitric oxide overproduction, and *in vitro* antiproliferative effect of maple sap and syrup from *Acer saccharum*. *Journal of medicinal food* 13: 460-468.

Nakatani, N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *BioFactors* 13:141–146.

Nostro, A., A. S. Roccaro, G. Bisignano, A. Marino, M. A. Cannatelli, F. C. Pizzimenti, P. L. Cioni, F. Procopio, and A. R. Blanco. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 56:519–523.

Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior. 2001. Development and validation of

an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4619–4626.

Pal, S., Y. K. Tak, and J. M. Song. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1712–1720.

Platel, K., M. Sc, K. Srinivasan, and D. Ph. 2001. Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats. *Nutrition Research* 21:1309–1314.

Ricci, D., F. Epifano, and D. Fraternali. 2017. The essential oil of *Monarda didyma* L. (Lamiaceae) exerts phytotoxic activity *in vitro* against various weed seeds. *Molecules* 22:1–10.

Rota, M. C., A. Herrera, R. M. Martínez, J. a. Sotomayor, and M. J. Jordán. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19:681–687.

Saini, R., S. Davis, and W. Dudley-Cash. 2003. Oregano essential oil reduces necrotic enteritis in broilers. Fifty-Second Western Poultry Disease Conference. Pages 95–98

Scora, R. 1967. Study of the essential leaf oils of the genus *Monarda* (Labiatae). *American Journal of Botany* 54:446–452.

Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, C. Nikolapu, S. Kokkini, T. Lanaras, and M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:1202–1205.

Srivastava, M. K. 2010. Antibiotic growth-promoters in food animals. *Pharma Times* 42:17–21.



Weber, E. M., H. G. Luther, and W. M. Reynolds. 1952. Antibiotics as animal-growth stimulants. *Bulletin of the World Health Organization* 6:149–161.

William, P., and R. Losa. 2001. The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. *World Poultry* 17:14–15.

Xu, J., F. Zhou, B.-P. Ji, R.-S. Pei, and N. Xu. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47:174–179.

Yang, X., H. Xin, C. Yang and X. Yang. 2018. Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive functions and immunity of broiler chickens. *Animal Nutrition* 4: 388-393.

Zeng, Z., S. Zhang, H. Wang, and X. Piao. 2015. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6:1-10.

Zhang, K. Y., F. Yan, C. A. Keen, and P. W. Waldroup. 2005. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 4:612–619.

CHAPITRE VII.

BALSACONE C, A NEW ANTIBIOTIC TARGETING BACTERIAL CELL  
MEMBRANES, INHIBITS CLINICAL ISOLATES OF METHICILLIN-  
RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) WITHOUT INDUCING  
RESISTANCE

**Accepted research paper**

Title : Balsacone C, a new antibiotic targeting bacterial cell membranes, inhibits clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) without inducing resistance

Running title: Novel antibiotic balsacone C inhibits MRSA

Authors : Héloïse Coté<sup>a</sup>, André Pichette<sup>a</sup>, François Simard<sup>a</sup>, Marie-Eve Ouellette<sup>a</sup>, Lionel Ripoll<sup>a</sup>, Mouadh Mihoub<sup>a</sup>, Doria Grimard<sup>b</sup> and Jean Legault<sup>a#</sup>

Affiliations :

<sup>a</sup>Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales, Département des sciences fondamentales. Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada.

<sup>b</sup>Laboratoire de Microbiologie, Complexe Hospitalier de la Sagamie, Chicoutimi, Québec, Canada.

# Corresponding author: Jean Legault, Jean.Legault@uqac.ca

**Keywords:** *Populus balsamifera*, buds, balsacone, antibiotic, *Staphylococcus aureus*, MRSA

Accepted for publication in : *Frontiers in Microbiology*

## Résumé

Les bourgeons de peuplier baumier (*Populus balsamifera* L.) étaient autrefois utilisés par différentes populations Amérindiennes pour appliquer sur les blessures, les coupures, les plaies, les engelures et les piqûres, suggérant ainsi une action antibactérienne. Une précédente étude menée au laboratoire LASEVE avait démontré les propriétés antibactériennes de l'exsudat des bourgeons de *Populus balsamifera* contre *Staphylococcus aureus*, et permis d'isoler un composé en grande partie responsable de cette activité, la balsacone C (BC). Dans le présent article, la caractérisation des propriétés antibactériennes de la BC a été réalisée sur des bactéries sensibles et résistantes, et la cible du mécanisme d'action a été déterminée. Dans un premier temps une banque de 35 souches de SARM provenant de l'hôpital de Chicoutimi a été caractérisée. Par la suite, l'activité antibactérienne de la BC a été testée contre les SARM et contre dix (10) autres bactéries gram positif et négatif. Les résultats confirment que la BC est active contre les bactéries gram positifs et les SARM et inactive contre la majorité des bactéries gram négatif. L'induction de la résistance à la BC a été réalisée sur une période de 30 jours, mais aucune résistance n'a été obtenue.

Le mécanisme d'action du composé a également été déterminé. Deux fluorochromes ont été utilisés pour vérifier l'intégrité des membranes bactériennes. Un bris dans l'intégrité des membranes a été observé suite à une exposition de 3h à la BC. De plus, à l'aide d'un microscope électronique à balayage, une altération de la structure externe (bordure irrégulière, invaginations à la surface) ont été observées chez *S. aureus* et les SARM. Finalement, la perméabilisation de la membrane a été confirmée par le relargage dans le milieu d'acides nucléiques et de protéines.

En conclusion, les résultats présentés dans cette étude (microscopie à fluorescence, microscopie à balayage et relargage des constituants intra-cellulaire) indiquent que la BC agit principalement en altérant la membrane cellulaire, permettant ainsi la libération de constituants intracellulaires conduisant à la mort cellulaire.

**ABSTRACT**

New options are urgently needed for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Balsacone C is a new dihydrochalcone extracted from *Populus balsamifera* that has been reported previously as being active against *Staphylococcus aureus*. Here, we evaluate the antibacterial activity of balsacone C against MRSA. Thirty-four (34) MRSA isolates were obtained from hospitalized patients; these isolates were then characterized for their resistance. Most of these MRSA (>85%) were resistant to penicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, clindamycin, erythromycin, and ceftiofloxacin as well as being sensitive to linezolid, trimethoprim/sulfamethoxazole, rifampicin, and gentamicin. When tested against all MRSA isolates and various gram-positive bacteria, the antibacterial activity of balsacone C produced a MIC of 3–11.6 mg/mL. We observed no resistant isolates of MRSA (against balsacone C) even after 30 passages. Microscopy fluorescence showed that bacteria cell membrane integrity was compromised by low concentrations of balsacone C. Scanning electron microscopy confirmed balsacone C–provoked changes in the bacterial cell membrane and we find a dose-dependent release of DNA and proteins. This loss of cellular integrity leads to cell death and suggests a low potential for the development of spontaneous resistance.

## 1. INTRODUCTION

Infectious diseases are now the second leading global cause of death in the world. Across the globe, bacterial infections kill 700 000 people annually (WHO, 2016), and by 2050, deaths attributable to antibiotic-resistant infections may even exceed cancer-related deaths (Bagnoli et al., 2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections remain a primary cause of infection-related mortality and represent a major global health care problem. This antibiotic-resistant bacteria was first identified within a health care setting around 1960, and it emerged in the community in the early 1990s (Vestergaard et al., 2019). Methicillin resistance in *S. aureus* is due to the acquisition of the mobile genetic element SCCmec (mecA or mecC). This gene codes for a penicillin-binding protein (PBP) that makes the strain resistant to all beta-lactam antibiotics (Bagnoli et al., 2017). Since *S. aureus* has a notorious ability to acquire or develop resistance to antibiotics, it is considered to be a global pandemic threat (Sergelidis et al., 2017; CDC, 2013). The rapidly increasing limitations of vancomycin and teicoplanin as primary therapies for severe and life-threatening infections have also raised concerns (Gardete and Tomasz, 2014). Within the past 20 years, MRSA has developed reduced susceptibility to vancomycin (VISA), and complete resistance has emerged (VRSA) (Bal et al., 2017). Moreover, MRSA resistance to linezolid and daptomycin has also been documented (McGuinness et al., 2017). Novel antibiotics are required urgently to combat this life-threatening pathogen (Assis et al., 2017; Laxminarayan et al., 2014; Subramani et al., 2017).

Over the last 30 years, the gap has widened between the emergence of antibiotic-resistant strains and the development of new antibiotics. Because of this disparity, there is heightened interest in finding new bioactive compounds derived from plants (Subramani et al., 2017). The widespread use of antibiotics derived from fungal or bacterial origin since the 1950s has limited interest in the study of plant compounds as potential antimicrobial agents. Nevertheless, most plants in natural settings respond to fungal and bacterial pathogens by activating low molecular weight antimicrobial compounds (Taylor, 2013). Subramani et al. (2017) list 15 plant-derived compounds and 40 plant extracts that demonstrate antibacterial activities against various multidrug-resistant pathogens, including MRSA.

Several plant species in the Canadian boreal forest show promise as sources of new antibiotics. A new class of potential antibiotics has been recovered recently from buds of *Populus balsamifera* L. (Lavoie et al., 2013). *P. balsamifera* (Salicaceae) is a hardwood tree having a widespread distribution in eastern North America. Buds from this species were used frequently by First Nation populations as treatment for a range of health problems, from the common cold to diabetes (Moerman, 1998). The use of *P. balsamifera* buds within different types of preparations that were applied to wounds, cuts, frostbite, and insect bites suggests that these buds may possess antibacterial properties.

In a previous study, we showed that *P. balsamifera* buds extract had antibacterial activity against a single strain of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*



(MSSA). We also isolated for the first time the Balsacone A, B and C and elucidated their structures. The Balsacone C (BC) ( $C_{24}H_{22}O_5$ ) is a new dihydrochalcone extract from *P. balsamifera* buds and was found to be one of the most potent compounds (Lavoie et al., 2013). In the present study, we characterize a suite of clinical MRSA isolates obtained from patients hospitalized at the Chicoutimi Hospital, Saguenay, Quebec, Canada. We then evaluate the antibacterial activity of BC (Supplementary Fig. 7.1) against MRSA and various gram-positive and gram-negative bacterial strains. In addition, we assess the propensity of MRSA to develop resistance to BC. Finally, in this work, we investigate the action mechanism responsible for the antibacterial activity of BC and assess its cytotoxicity on human normal cells.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Cell Culture

We obtained human skin fibroblasts WS1 (ATCC CRL-1502) from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Minimum Essential Medium supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 1 × solution of sodium pyruvate, 1 × vitamins, 1 × non-essential amino acids, 100 IU of penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Cellgro®, Mediatech, Manassas, VA, USA).

### 2.2 Isolation and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates

Thirty-four (34) isolates of MRSA and one (1) MSSA were obtained from nares (n = 31), throat (n = 3) and groin pus (n = 1) from patients hospitalized at the Chicoutimi Hospital. We identified *S. aureus* using a Slidex Staph-Kit (bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.). Quality control was performed with MRSA isolates ATCC 43300 and *S. aureus* strain ATCC 25923. We determined the *S. aureus* profile using an API Staph test strip having a saline bacterial suspension having a 0.5 McFarland standard (bioMerieux, Durham, NC). API Staph strips were left for 24 h before the results

were read. For all isolates, we ran a latex agglutination (Slidex) test to detect methicillin resistance in *Staphylococci*—based on the production of low-affinity PBP2a, which is encoded by the *mecA* or *mecC* gene (data not shown).

### *2.3 Antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method*

We produced an antibiogram to confirm the identification of MRSA isolates using a disk diffusion test (Kirby-Bauer) as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (CLSI, 2019). The tested antibiotics included: penicillin (10 units), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), ciprofloxacin (5 µg), moxifloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg), clindamycin (15 µg), erythromycin (15 µg), cefoxitin (30 µg), linezolid (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), rifampicin (5 µg), gentamicin (10 µg) and vancomycin (30 µg). The cultures were first inoculated on a non-selective plate for 18–24 h. We collected each colony and then transferred the individual colonies to a 5-ml tryptic-soy broth. The inoculum density was standardized with BaSO<sub>4</sub> using 0.5 McFarland standard, and all isolates were incubated at 35 °C. We then inoculated the Muller-Hinton agar plates. After 15 min, we applied the disks having a fixed concentration of antibiotics to the plate surface. Plates were incubated at 35°C for 16–24 h. We measured the growth inhibition zone around each disk, and we related the diameter of the zone to the bacteria susceptibility. The results of the disk diffusion test are expressed as

susceptible, intermediate, or resistant. We used *S. aureus* ATCC 25923 as our quality control organism.

#### 2.4 Compound and bacterial strains

Simard et al. (2014) describe the isolation of BC. Purity (%) was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR (proton magnetic resonance spectroscopy used to determine the structure of a molecule). Antimicrobial activities of BC were tested against *Escherichia coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterobacter aerogenes* (C3032834), *Enterobacter cloacea* (B9040334), *Salmonella typhimurium* (C6162763), *Burkholderia cepacia* (C6101997), *Klebsiella pneumonia* (B8302928), *Staphylococcus epidermidis* (B9030482), *Enterococcus faecalis* (ERV), and *Listeria monocytogenes* (B8222880). All bacterial strains were provided by the Chicoutimi Hospital, Saguenay, Canada. *Streptococcus uberis* (CL) was provided by Collège Laflèche, Trois-Rivières, Canada.

#### 2.5 Antibacterial activity measurements using the microdilution method

We tested the antibacterial activities of BC using the microdilution method of Banfi et al. (2003). Briefly, 50 µL of growing bacteria were plated in 96-well plates (Costar, Corning Inc.) in nutrient broth (Difco). Increasing concentrations of BC (diluted in

methanol) were then added. The final concentration of methanol in the culture medium was maintained at 0.1% (v/v) to avoid solvent toxicity. The negative control was a bacterial suspension without treatment, and the blank consisted of a culture medium only. We tested the bacterial suspension plus solvent to demonstrate the absence of solvent toxicity. Concentration of  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL was used. Microplates were incubated for 24 h at 37°C, and the absorbance was then measured at 540 nm using an automated Varioskan Ascent plate reader. Results are expressed as the concentration at which 100% of bacterial growth is inhibited (MIC).

#### *2.6 Induction of resistance against BC and rifampicin*

To induce the emergence of drug resistance, we used the broth-dilution procedure of Dalhoff et al. (2005). Briefly, approximately  $3.5 \times 10^5$  CFU was added to 10 ml nutrient broth. Bacteria were grown overnight in nutrient broth containing different concentrations of the compounds (1 mg/L to 10 mg/L for BC and 0.004 mg/L to 2 mg/L for rifampicin). For each passage (passage refers to transferring bacteria from a previous culture to a fresh growth medium), we transferred an aliquot (1:20) from the tube containing the highest drug concentration with visible bacterial growth to a second set of serial antibiotic dilutions. After incubating the broths overnight, we repeated the dilution procedure for a total period of 10 passages for rifampicin and 30 passages for BC. After completion of the passages, we subcultured the bacteria having the highest MIC onto a drug-free nutrient broth. We tested these latter samples

for antibiotic susceptibility with microdilution assay. Results are expressed as the concentration inhibiting 50% of bacterial growth ( $IC_{50}$ )

### *2.7 Membrane integrity*

To evaluate the integrity of cell membranes, we used the BacLight Live/Dead bacterial viability kit (L-7012; Molecular Probes). Briefly, we added approximately  $2 \times 10^7$  CFU/ml to tubes containing 10 ml of nutrient broth. Untreated and treated samples having BC ( $IC_{50}$ : 1.5 mg/L and MIC: 3 mg/L) were grown for 24 h at 37°C and then were centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. The supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 2 ml NaCl (0.85%). We added 1 ml of the sample to 20 ml NaCl (0.85%), incubated the suspension for 1 h at room temperature, and then centrifuged the mixture at  $10,000 \times g$  for 10 min (repeated twice). We removed the supernatant and resuspended the pellet in 10 ml NaCl. We added 3  $\mu$ L of Syto9 and 3  $\mu$ L of propidium iodide (PI) to each sample. Samples were then incubated at room temperature for 15 min. We analyzed the integrity of the bacterial membranes using a fluorescence microscope (Reichert) equipped with a halogen lamp, Neoplan 100 $\times$ /1.25 oil objective and a 1713 filter cube (fluorescein; 490/510/520 nm) at 1,000 $\times$  magnification. In the assays, the fluorescent green nucleic acid stain Syto9 passes in living and dead bacterial cells, whereas PI cannot penetrate intact

membranes. When the cellular membrane is damaged, PI can penetrate bacteria and cause the cells to appear red (31).

### *2.8 Scanning electron microscopy (SEM)*

Previous work has shown that membrane damage can be confirmed by combining fluorescence microscopy and SEM imagery (De Sousa et al, 2012; Nostro et al., 2017). We prepared the samples for scanning electron microscopy (SEM) following De Sousa et al. (2012) with some modifications. Briefly, untreated and treated samples having BC (1.5 mg/L and 3 mg/L) were grown 3 h at 37°C. We removed the samples from the cultures, washed them with PBS and then fixed the samples in phosphate buffers (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde for 2 h at room temperature. The fixed cells were collected via centrifugation at 2,000 × g and washed three times with phosphate buffers. The fixed bacteria were dehydrated with ethanol (30% to 95%). We mounted the dried specimens on aluminum stubs using a conductive carbon cement; the specimens were allowed to dry and were then coated with a gold film. We observed the samples with an SEM at 20 kV and 25,000× magnification.

### *2.9 Release of bacterial intracellular constituents*

Intracellular material released from the cells was quantified as described in Virto et al. (2005) with some modifications. Briefly, we added approximately  $8 \times 10^7$  CFU/ml to tubes containing 10 ml nutrient broth. Untreated and treated samples having BC (1.5 mg/L and 3 mg/L) were grown 3 h at 37°C and were then centrifuged at  $2,000 \times g$  for 10 min. We transferred the supernatant in a cuvette and measured the UV absorbance using a spectrophotometer (Multiskan™ GO Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific)—nucleic acids have an absorption peak at 260 nm, proteins at 280 nm. We compared our results with those of untreated control samples.

### *2.10 Acridine orange/ethidium bromide staining*

We evaluated the integrity of WS1 cell membranes using a double staining assay with acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB) as described in Ribble et al. (2005). AO (15 mg) and EB (50 mg) were dissolved in 1 ml of 95% ethanol and then added to 49 ml of PBS, gently mixed, aliquoted, and stocked at  $-20$  °C. Before use, we diluted the stock solution 1/10 in PBS (pH 7.4). We plated growing WS1 cells ( $1 \times 10^4$  cells) onto a 96-well plate and incubated them for 18 h. After treating the cells with 1.5 and 3 mg/L of BC, we re-incubated them for 14 h. The cells were then



washed with PBS and incubated for 5 min with the dual fluorescent staining solution (AO/EB). For our observations, we used Cytation3 (Cell Imaging Multi-Mode Reader) at excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively.

### *2.11 Calcein-AM cell cytotoxicity assay*

We tested the toxicity of BC against the human healthy cell line WS1 as described in Yang et al. (2002). In brief, we plated WS1 cells ( $1 \times 10^4$  cells) onto a 96-well plate and incubated the plates for 18 h. After the incubation period, we treated the cells with 1.5 and 3 mg/L of BC and 0.82 mg/L of doxorubicin. After 24 h of incubation, we removed the media and washed the cells with PBS. We then added 100  $\mu$ L of calcein-AM (0.25 mg/L) and incubated the cells for 20 min. WS1 cells were washed twice in PBS, and we observed the cells using Cytation3 (Cell Imaging Multi-Mode Reader) at excitation and emission wavelengths of 490 nm and 520 nm, respectively. First, we evaluated the effect of BC on WS1 membranes using double labeling with OA and EB (Mihoub et al., 2018). Human healthy cells were incubated in the presence or absence of BC at  $IC_{50}$  (1.5 mg/L) and MIC (3 mg/L) concentrations. Beta-hederin, a cytolytic triterpenoid, was used as positive control.

### 2.12 Statistical analysis

For all analyses, we ran two-way ANOVAs all followed by a post-test Holm-Sidak method using SigmaStat® software (Systat Software Inc, California, USA). Differences were deemed as statistically significant when  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

All 35 bacterial clinical isolates were indeed *S. aureus*. Moreover, API Staph identified two different *S. aureus* biotypes including the biotype 6736153 and the biotype 6736113 at a probability of 97.8% and 86.7%, respectively (Supplementary Table 7.1). Our control *S. aureus* ATCC 25923 was identified as the biotype 6736153. A latex agglutination test for the PBP2a protein encoding by *mecA* genes also confirmed that thirty-four (34) bacterial isolated were MRSA (data not shown). An antibiogram of *S. aureus* and all isolates was performed with various classes of antibiotics—they include beta-lactam (penicillin, amoxicillin/clavulanic acid), fluoroquinolone (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin), lincosamide (clindamycin), macrolide (erythromycin), cephalosporin (cefoxitin), oxazolidone (linezolid), sulfonamide (trimethoprim/sulfamethoxazole), rifamycin (rifampicin), aminoglycoside (gentamicin) and glycopeptide (vancomycin). The results indicated that *S. aureus* (ATCC 25923) was sensitive to all antibiotics tested except

levofloxacin (Supplementary Tables 7.2 and 7.3). Moreover, with the exception of isolate 08-U-0189, all MRSA were resistant to penicillin, erythromycin and ceftiofur. Consequently, isolate 08-U-0189 is considered as a MSSA. On the other hand, all isolates were 91.4% resistant to ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin and clindamycin and 88.5% resistant to amoxicillin/clavulanic acid (Supplementary Table 7.2). These antibiogram profiles were similar to the typical phenotype of endemic MRSA isolates as experienced by Chao et al (2013) in China. Interestingly, three MRSA were sensitive to all fluoroquinolone antibiotics (08-U-0194, 08-U-0204, and 08-U-0209). Moreover, 3% of MRSA were resistant to TMP/SMX and rifampicin, 6% to gentamicin and 34 % had intermediate resistance to vancomycin, however the MIC should be determined to confirm the presence of a VISA (Supplementary Table 7.3). All MRSA were sensitive to linezolid. The most resistant isolate of MRSA (08-U-0214), showed resistance to beta-lactam (penicillin, amoxicillin/clavulanic acid, methicillin), fluoroquinolone (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin), lincosamide (clindamycin), macrolide (erythromycin), cephalosporin (ceftiofur), rifamycin (rifampicin), aminoglycoside (gentamicin) and intermediate to glycopeptide (vancomycin).

The antibacterial activity of BC, was evaluated using a microdilution assay against *S. aureus* (ATCC 25923) and the 35 MRSA and MSSA isolates. BC was active against all bacteria tested producing a MIC of 3–11.7 mg/L (Table 7.1). Furthermore, the most resistant MRSA (08-U-0214) was also sensitive to BC and had a MIC of 3.9 mg/L. Most of the new antibiotic candidates reported in the literature possess a

MIC in the same range of BC. For example, Adnani et al. (2017) describe keyicin, a new bis-nitroglycosylated anthracycline, that has an action mechanism different from that of other anthracyclines. Keyicin was active against gram-positive *Bacillus subtilis* with a MIC of 7.97 mg/L and against MRSA with a MIC of 2.01 mg/L. Zhang et al. (2017) obtained MICs of 1,39 – 5,57 mg/L for two compounds from the Aurachin family that had antimicrobial activity against *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Bacillus subtilis*. They obtained a MIC of 44,57 mg/L against MRSA, whereas rifampicin and ampicillin had respective MICs of 3,29 mg/L and 22.36 mg/L.

We tested BC activity against four gram-positive (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes*) and six gram-negative bacteria (*Burkholderia cepacia*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacea*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Salmonella typhimurium*). BC inhibited the bacterial growth of all gram-positive bacteria with a MIC of 10.1–32 mg/L (Table 7.2). In contrast, BC was inactive against the gram-negative taxa with a MIC >100 mg/L. The exception was for *B. cepacia* with a MIC of 32 mg/L. *B. cepacia* is naturally resistant to some antibiotic classes including polymyxins, aminoglycosides, trimethoprim, chloramphenicol, quinolones, and beta-lactams (De Sousa et al., 2011). The intrinsic multidrug resistance of this bacteria occurs due to the presence of various enzymes and efflux pumps that remove antibiotics from the cell, changes in the cell membrane that reduce its permeability, and limited contact of the antibiotic with the bacterial cell (De Souza., 2008). Rushton et al. (2013)

suggested membrane charge/ionization influences antibiotic binding and resistance. Interestingly, these resistance mechanisms of *B. cepacia* are not efficient against BC suggesting an alternative action mechanism is at work. Firstly, we investigated the BC action mechanism using a model of resistance induction described by Dalhoff et al. (2005). Using rifampicin as a positive control, the resistance of one MSSA (08-U-0189) and three MRSA (08-U-0193; 08-U-0203; 08-U-0222) isolates was achieved easily (Fig. 7.1). Indeed, the IC<sub>50</sub> of rifampicin for all tested isolates was initially lower than 0.012 mg/L, while after ten passages of MRSA in the presence of sub-MIC levels of rifampicin, the isolates were at least 30× more resistant with an IC<sub>50</sub> of  $0.41 \pm 0.07$  mg/L to  $1.00 \pm 0.02$  mg/L. Using the same approach, we attempted to induce BC resistance. The IC<sub>50</sub> of BC was first  $1.4 \pm 0.1$  mg/L to  $2.9 \pm 0.5$  mg/L, however, repeated passages (30) of MRSA in the presence of sub-MIC levels of BC failed to produce resistant bacteria with an IC<sub>50</sub> of  $3 \pm 0.3$  mg/L to  $3.9 \pm 0.4$  mg/L after induction.

The rapid bactericidal action of BC suggests that the possible action mechanism might occur via altering the integrity of bacterial cell membranes, as suggested by Ling et al. (2015) with their study on a new antibiotic, the texobactin. The effect of BC on the membrane integrity, assessed using the dead/live BacLight bacterial viability assay (Grégori et al., 2001; Stiefel et al., 2015), found untreated *S. aureus* (control) to have no membrane damage (Fig. 7.2A). *S. aureus* treated with 1.5 mg/L BC (IC<sub>50</sub>) generated a mix of green fluorescent (intact membrane) and red fluorescent (damaged membrane) bacteria (Fig. 7.2B), and all bacteria had damaged membranes

at 3 mg/L (MIC) (Fig. 7.2C). We obtained similar results with MRSA (Fig. 7.2D,F). Therefore, BC alters bacterial cell membranes.

Structural changes in the membrane, such as an altered fluidity, should lead to a slight modification in the cell surface structure (Alakomi et al., 2006). Scanning electronic microscope (SEM) images of samples having a 3-h exposure to BC at a MIC concentration (3 mg/L) determined if BC affected bacterial cell membrane structures and possibly membrane functions (Sipponen et al., 2009). We observed marked alterations of the cell structure surface of *S. aureus* (Fig. 7.3B) and MRSA (Fig. 7.3D). Cell surfaces became irregular, and we observed invagination and structural alterations. These SEM observations of *S. aureus* and MRSA cell surfaces confirm the susceptibility of these bacteria to BC.

Damage induced by antibacterial agents such as BC can provoke the release of intracellular components—these components include small ions, such as potassium and phosphates, and much larger molecules, including DNA, RNA, and proteins (Virto et al., 2005; Maillard, 2002; Johnston et al., 2003; Liu et al., 2004; Lee and Je, 2013; Ukuku et al., 2013; He et al., 2016; McKenzie et al., 2016; Sannasiddappa et al., 2017). To test whether BC provoked the release of DNA and proteins, we observed the UV-absorbance values at 260 nm and 280 nm. For treated samples of *S. aureus* and MRSA, absorbance values increased significantly in a dose-dependent manner when compared to untreated cells ( $P < 0.006$ ). Thus, BC appears to induce the disruption of the cellular membrane and cause the release of intracellular constituents such as DNA (Fig. 7.4A) and proteins (Fig. 7.4B). Furthermore, the BC

concentrations that induce cell membrane damages match the observed antibacterial activity.

Some antibiotics are known to target bacterial cell membranes. Epanand et al. (2016) reviewed compounds that interact with bacterial cell membranes. They mention that this approach for antibiotics is a complex field that is only beginning to be exploited. Antibiotics that target the bacterial membrane or precursors appear to have a high potential as they show a fast and extensive bactericidal effect, in particular against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) (Bambeke et al., 2008). Membrane-damaging antibiotics can interact directly with the bacterial membrane bilayer, thereby disrupting its function and its physical integrity, which leads to the loss of membrane permeability and the altering of membrane properties. For example, daptomycin induces membrane permeabilization, depolarization, and disruption of multiple cellular processes; telavancin and oritavancin inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to the D-Ala-D-Ala termini to cause membrane permeabilization and depolarization, whereas polymyxin and chlorhexidine cause a collapse of the membrane potential (Hurdle et al., 2011; Kuyyakanond and Quesnel, 1992). Although we observed that BC appears to target bacterial cell membranes, further research is needed to determine the specific target of BC within the bacterial cell.

BC was found previously weakly cytotoxic against human cells using viability assay (Lavoie et al., 2013). In the present work, the effect of BC on human cellular

membrane was assessed on healthy skin fibroblasts, WS1. Beta-hederin, a membrane cell permeabilizer, was used as positive control (Gauthier et al., 2009; Mihoub et al., 2018). In contrast to untreated cells (Fig. 7.5A), beta-hederin treated cells are permeable to ethidium bromide. This produces a red-orange fluorescence located at the nucleus (Fig. 7.5B), which indicates membrane alteration (Mihoub et al., 2018). The healthy human cells treated with 1.5 mg/L and 3 mg/L (MIC) of BC produced a green-orange fluorescence diffused throughout the cell without nucleus fluorescence. A similar pattern was observed in the untreated cells (Fig. 7.5C,D) and confirms that BC does not cause any membrane alteration at both concentrations tested. The viability of WS1 healthy cells, post-treatment with BC, was evaluated using calcein-AM. This hydrophobic probe permeates live cells easily and becomes strongly green fluorescent after cleavage of the acetoxymethyl ester by intracellular esterases. As expected, untreated cells had an intense green fluorescence (Fig. 7.6A). Cells treated with BC at 1.5 mg/L and 3 mg/L (Fig. 7.6C,D) also produced an intense green fluorescence, thereby confirming that BC is not cytotoxic for WS1 human cells. In contrast, the green fluorescence of cells treated with 0.82 mg/L of doxorubicin (Fig. 7.6B) was much weaker. These preliminary results suggest that BC could be used to treat bacterial infections without affecting healthy human cells.



#### **4. CONCLUSIONS**

New antibiotics are urgently warranted to combat resistant bacteria such as MRSA. Our results indicate that BC induces bacterial cell membrane damage. This damage leads to the loss of membrane integrity and the release of intracellular constituents, followed by cell death after relatively short incubation times. This promising new therapeutic candidate represents a ‘membrane active agent’ mainly used against gram-positive bacteria, such as MRSA. Induction experiments on MRSA and MSSA isolates did not lead to resistance. Future research will focus on improving the structure of balsacone in order to increase its activity and identify the specific target of BC. Moreover, *in vivo* tests on mice models should be performed to determine the best way of administration, the toxicity and the efficacy of BC.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

The authors thank Catherine Dussault, Line Poisson, Audrey Belanger, Karl Girard-Lalancette, and Sandra Bouchard for their technical assistance. This work was funded 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).

### **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

HC performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. FS, MO, MM and LR performed some of the experiments and revised the manuscript. AP and DG analyzed the data and revised the manuscript. JL conceived the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.

### **CONTRIBUTION TO THE FIELD**

In the past decade, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections have become a major public health problem. Research into new effective antibacterial compounds and targets is necessary for mitigating the problem of multidrug-resistant gram-positive pathogens, including MRSA. Bacterial cell membranes are complex regions that possess some potential targets for new antibiotics, which could present opportunities against resistant bacteria. Our research presents a novel compound for fighting against gram-positive resistant bacteria—principally MRSA—that also shows a low potential for developing resistant strains.

Table 7.1: Evaluation of antibacterial activity of balsacone C against *Staphylococcus aureus* and the clinical isolates of MRSA

Isolate number	Balsacone C MIC (mg/L)	Isolate number	Balsacone C MIC (mg/L)
ATCC 25923	3,4 ± 0,7	08-U-0202	6,4 ± 0,8
08-U-0185	12 ± 1	08-U-0203	5,1 ± 0,6
08-U-0186	4,1 ± 0,6	08-U-0204	4,7 ± 0,6
08-U-0187	8 ± 1	08-U-0205	3,4 ± 0,5
08-U-0188	4 ± 1	08-U-0206	4 ± 1
08-U-0189	6,7 ± 0,7	08-U-0207	3 ± 1
08-U-0190	6,9 ± 0,4	08-U-0208	7,8 ± 0,4
08-U-0191	6 ± 1	08-U-0209	4,9 ± 0,7
08-U-0192	11 ± 1	08-U-0213	11,6 ± 0,5
08-U-0193	7,4 ± 0,5	08-U-0214	3,9 ± 0,1
08-U-0194	5,6 ± 0,6	08-U-0215	4,4 ± 0,3
08-U-0195	8,6 ± 0,7	08-U-0216	9,4 ± 0,7
08-U-0196	4,2 ± 0,6	08-U-0217	4,6 ± 0,3
08-U-0197	3,4 ± 0,2	08-U-0218	5,4 ± 0,1
08-U-0198	3 ± 1	08-U-0219	3,6 ± 0,4
08-U-0199	7,6 ± 1,0	08-U-0220	3,3 ± 0,6
08-U-0200	10 ± 1	08-U-0221	4,9 ± 0,6
08-U-0201	3,3 ± 0,6	08-U-0222	3,5 ± 0,5

ATCC 25923 is *Staphylococcus aureus*.

Data are representative of three different experiments.

Main ± standard deviation,  $n = 3$ .

MIC is defined as the lowest concentration able to inhibit 100% of bacterial growth.

Table 7.2: Evaluation of antibacterial activity of balsacone C against different bacteria

Bacteria taxa	Strain	Gram	Antibacterial activity of balsacone C
			MIC (mg/L)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ERV	+	10.9 ± 0.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	B8222880	+	20 ± 3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	B9030482	+	27 ± 2
<i>Streptococcus uberis</i>	CL	+	10.1 ± 0.7
<i>Burkholderia cepacia</i>	C6101997	-	32 ± 2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	C3032834	-	>100
<i>Enterobacter cloacea</i>	B9040334	-	>100
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	>100
<i>Klebsiella pneumonia</i>	B8302928	-	>100
<i>Salmonella typhimurium</i>	C6162763	-	>100

Data are representative of three different experiments.

Main ± standard deviation,  $n = 3$ .

MIC is defined as the lowest concentration able to inhibit 100% of bacterial growth.

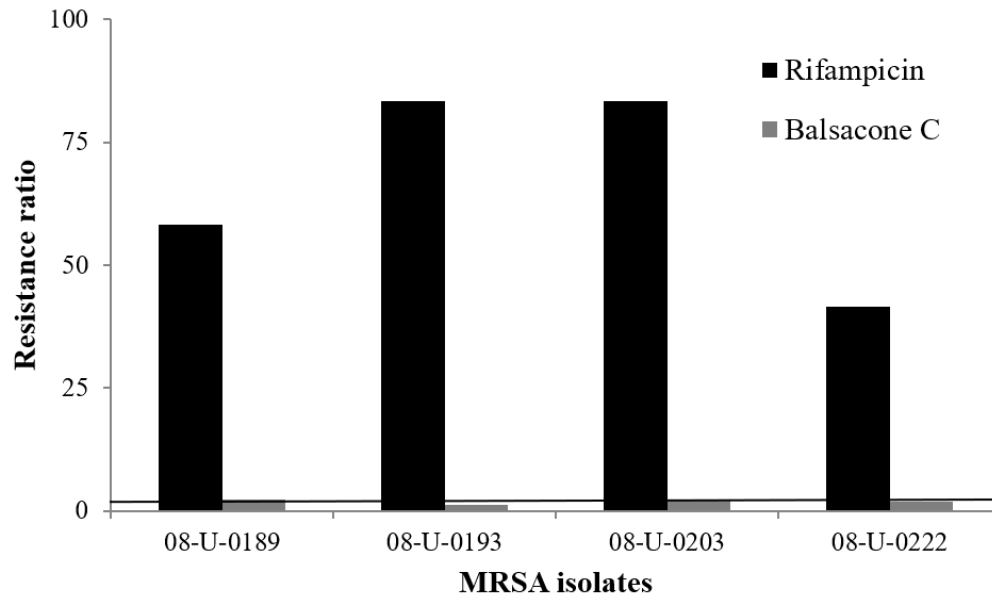


Figure 7.1: Induced bacterial resistance using rifampicin and balsacone C on four different MRSA isolates. Resistance ratio is  $IC_{50}$  of resistant isolate/ $IC_{50}$  of susceptible isolate ( $>30$  fold) after 10 passages for rifampicin and 30 passages for balsacone C. The solid line defines the limits of equal susceptibility (1 fold).

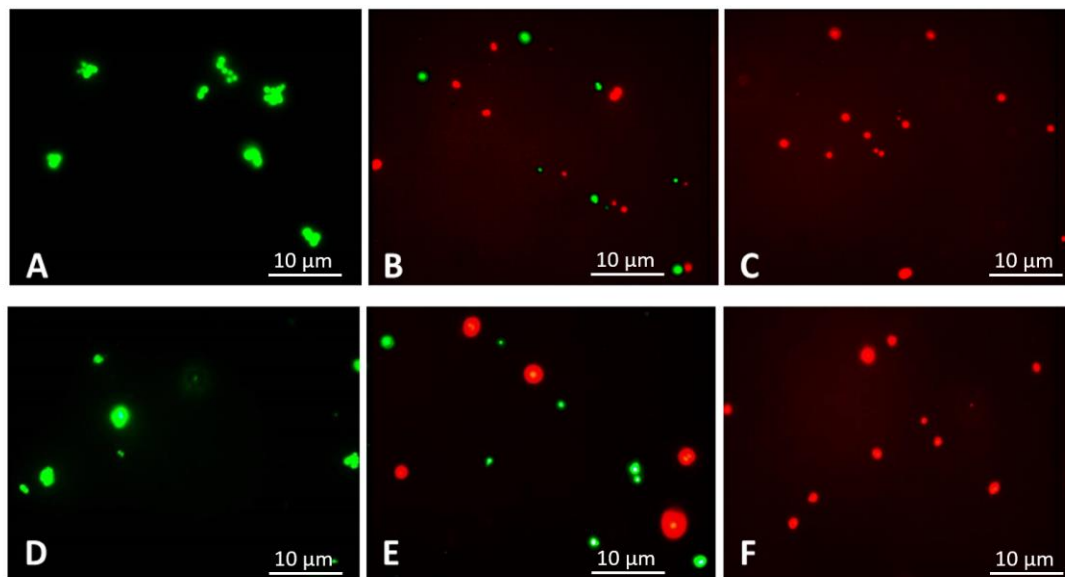


Figure 7.2: Fluorescence microscopic images, 1,000 $\times$  magnification. Following 3 h of treatment with balsacone C, *S. aureus* and MRSA (08-U-0214) were stained using a LIVE/DEAD BacLight Viability kit. Live cells are indicated by green fluorescence (Syto 9), whereas cells having damaged membranes are indicated by red fluorescence (PI). Untreated *S. aureus* (negative control) (A); *S. aureus* after treatment with 1.5 mg/L balsacone C (B); *S. aureus* after treatment with 3 mg/L BC (C); untreated MRSA (negative control) (D); MRSA after treatment with 1.5 mg/L balsacone C (E); MRSA after treatment with 3 mg/L balsacone C (F).

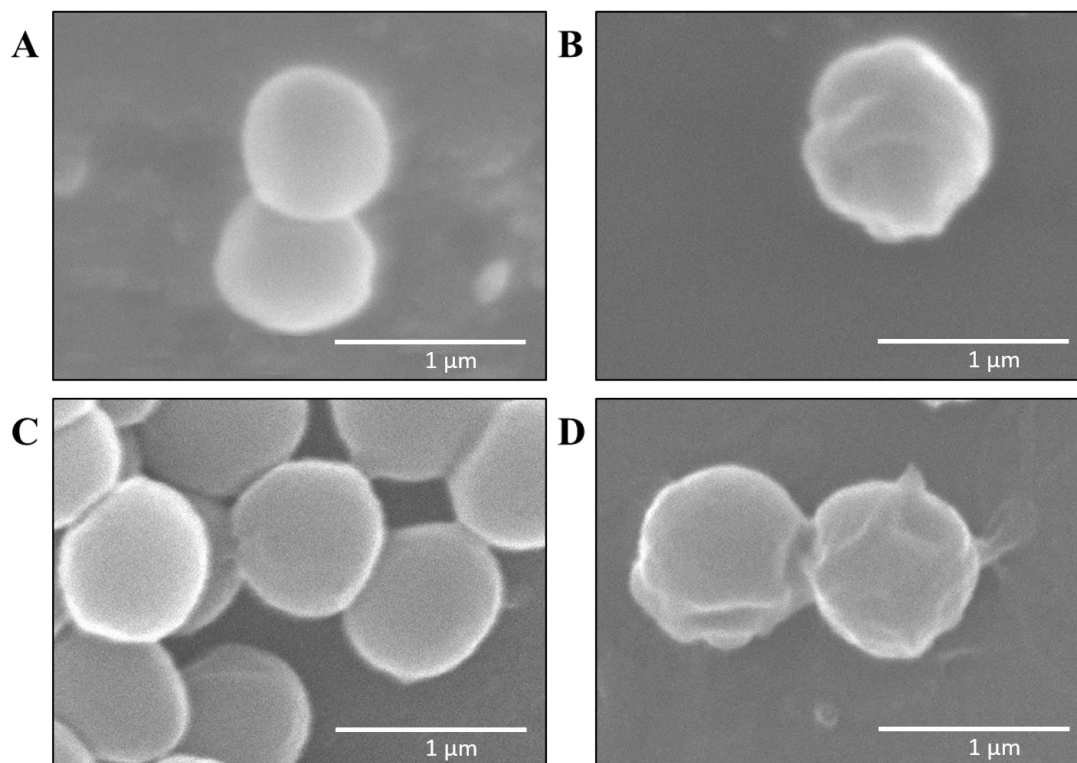


Figure 7.3: Scanning electron microscope (SEM) images of *S. aureus* and MRSA (08-U-0214), 25,000× magnification. Untreated *S. aureus* (negative control) (A); *S. aureus* after treatment with 3 mg/L balsacone C (B); untreated MRSA (negative control) (C); MRSA after treatment with 3 mg/L balsacone C (D).

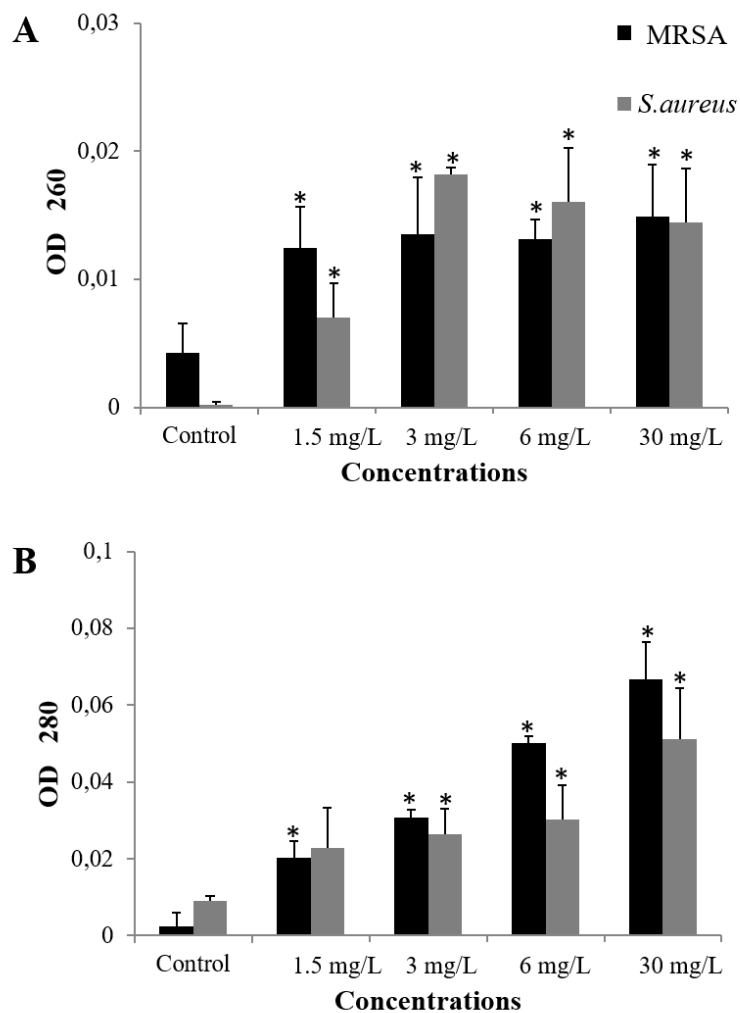


Figure 7.4 : Measurement of cellular leakage of nucleic acid (A) and protein (B) from *S. aureus* and MRSA (08-U-0214) after 3 h of exposure to balsacone C. Experiments were performed at a cell density of  $8 \times 10^7$  CFU/ml following exposure to 1.5 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L, and 30 mg/L balsacone C. Control represents the untreated cells. For all data  $n = 3$ . \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).



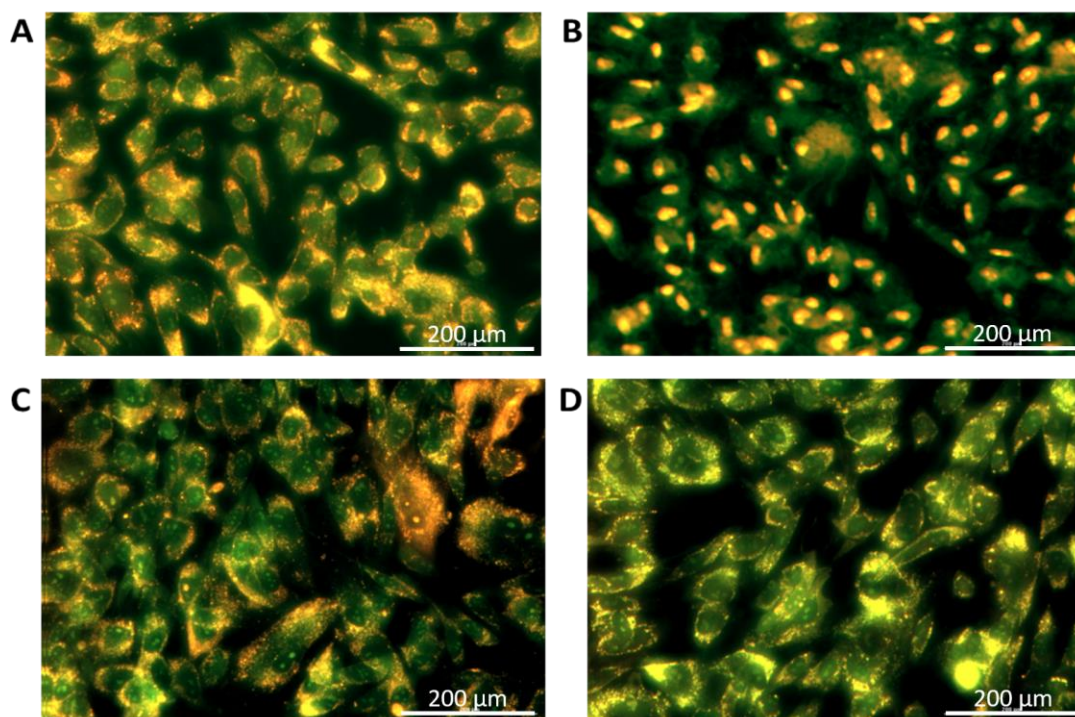


Figure 7.5: Cellular membrane integrity after treatments with balsacone C; images were captured by a Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader with a 20× objective. WS1 cells were stained with acridine orange/ethidium bromide to visualize intact membranes. Stained control cells (A); positive control beta-hederine 7.5 mg/L (B); cell treated with 1.5 mg/L balsacone C (C); cell treated with 3 mg/L balsacone C (D). Data are representative of three different experiments

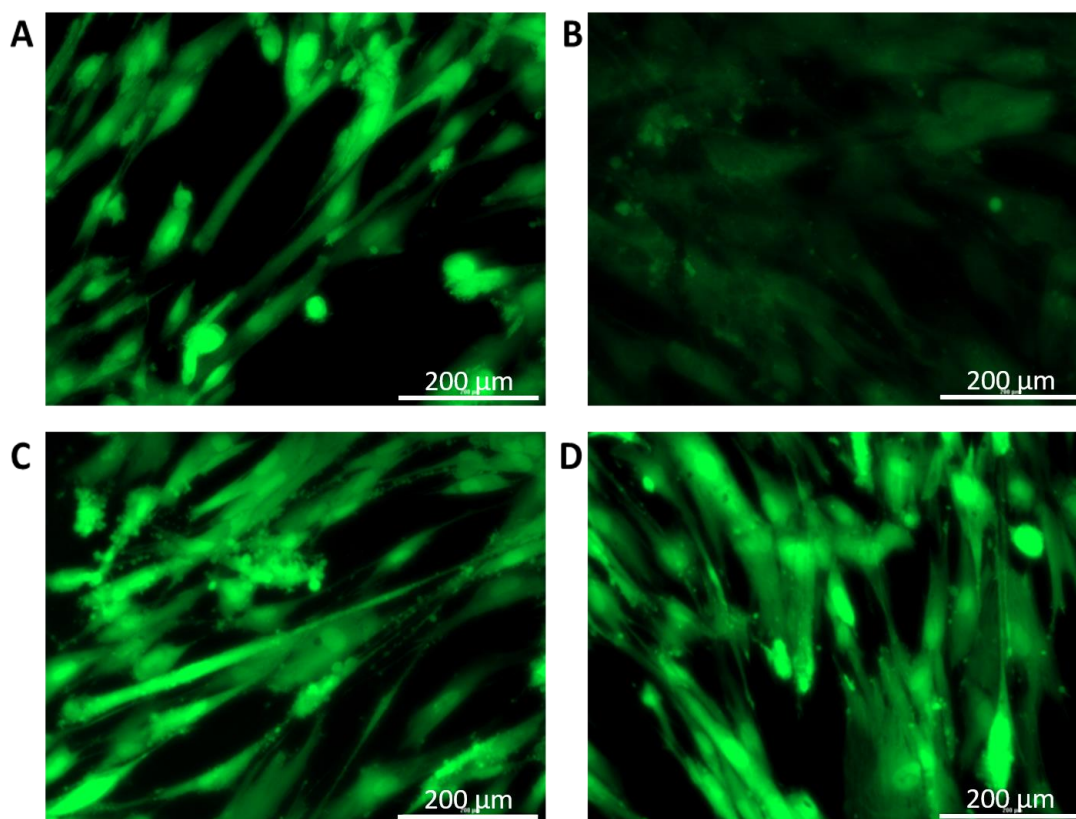


Figure 7.6: Cell viability after treatments with balsacone C; images were captured by a Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader with a 20× objective. WS1 cells were stained with calcein-am to visualize living (green) and dead cells. Stained control cells (A); positive control doxorubicine 0.55 mg/L (B); cell treated with 1.5 mg/L balsacone C (C); cell treated with 3 mg/L balsacone C (D). Data are representative of three different experiments.

Supplementary Table 7.1: Identification and sources of clinical isolates of *S. aureus*.

Isolate number	Date of sampling	Source/origin	Bacterial identity <sup>b</sup>	Strain profile <sup>c</sup>	Probability of identity <sup>c</sup> (%)
08-U-0185	2007-03-05	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0186	2007-03-05	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0187	2007-03-05	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0188	2007-03-05	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0189	2007-03-12	Throat	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0190	2007-03-12	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0191	2007-03-12	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0192	2007-03-12	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0193	2007-03-14	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0194	2007-03-19	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0195	2007-03-19	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0196	2007-03-19	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0197	2007-03-26	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0198	2007-03-28	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0199	2007-04-10	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0200	2007-04-11	Throat	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0201	2007-04-11	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0202	2007-04-16	Groin pus	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0203	2007-04-30	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0204	2007-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0205	2007-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0206	2007-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0207	2007-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0208	2007-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0209	2007-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0213	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0214	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0215	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0216	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0217	2008-05-09	Throat	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0218	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0219	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0220	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
08-U-0221	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8
08-U-0222	2008-05-09	Nares	<i>S. aureus</i>	6736113	86.7
ATCC 25923	(-) <sup>a</sup>	ATCC	<i>S. aureus</i>	6736153	97.8

<sup>a</sup>Unknown<sup>b</sup>Slidex Staph-Kit<sup>c</sup>API Staph test strip

Supplementary Table 7.2: Antibiogram of clinical isolates of MRSA using the disk diffusion test with various classes of antibiotics including beta-lactam (penicillin-PEN, amoxicillin/clavulanic acid-AMC), fluoroquinolone (ciprofloxacin-CIP, moxifloxacin-MXF, levofloxacin-LVX), lincosamide (clindamycin-CLI), macrolide (erythromycin-ERY) and cephalosporin (cefoxitin-FOX)

Isolate number	PEN <sup>a</sup>	AMC <sup>b</sup>	CIP <sup>c</sup>	MXF <sup>d</sup>	LVX <sup>e</sup>	CLI <sup>f</sup>	ERY <sup>g</sup>	FOX <sup>h</sup>
8-U-0185	Ø (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0186	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0187	Ø (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	10 (R)
08-U-0188	Ø (R)	12 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	10 (R)
08-U-0189	Ø (R)	29 (S)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	30 (S)
08-U-0190	Ø (R)	16 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	18 (S)	Ø (R)	12 (R)
08-U-0191	Ø (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0192	Ø (R)	13 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0193	Ø (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0194	13 (R)	16 (R)	25 (S)	29 (S)	28 (S)	Ø (R)	Ø (R)	14 (R)
08-U-0195	Ø (R)	18 (R)	Ø (R)	11 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0196	9 (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	16 (I)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0197	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	11 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0198	10 (R)	18 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0199	Ø (R)	16 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	12 (R)
08-U-0200	Ø (R)	15 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0201	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0202	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	10 (R)
08-U-0203	21 (R)	22 (S)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	17 (S)	Ø (R)	15 (R)
08-U-0204	10 (R)	15 (R)	26 (S)	30 (S)	26 (S)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0205	Ø (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0206	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	11 (R)
08-U-0207	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0208	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0209	14 (R)	19 (S)	26 (S)	30 (S)	29 (S)	Ø (R)	Ø (R)	14 (R)
08-U-0213	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0214	10 (R)	15 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	13 (R)
08-U-0215	Ø (R)	13 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0216	Ø (R)	11 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0217	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0218	10 (R)	16 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	13 (R)
08-U-0219	Ø (R)	17 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0220	Ø (R)	14 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0221	10 (R)	14 (R)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
08-U-0222	15 (R)	22 (S)	Ø (R)	10 (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	14 (R)
ATCC 25923	33 (S)	33 (S)	28 (S)	31 (S)	Ø (R)	26 (S)	28 (S)	27 (S)
MRSA resistant (%)	100	88.5	91.4	91.4	91.4	91.4	100	97.1

<sup>a-h</sup>The results present the diameter of inhibition growth around each disk (mm)

<sup>a</sup>Penicillin (10 units) : resistant (R) ≤ 28; susceptible (S) ≥ 29

<sup>b</sup>Amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg) : resistant (R) ≤ 19; susceptible (S) ≥ 20

<sup>c</sup>Ciprofloxacin (5 µg) : resistant (R) ≤ 15; intermediate (I) 16-20; susceptible (S) ≥ 21

<sup>d</sup>Moxifloxacin (5 µg) : resistant (R) ≤ 20; intermediate (I) 21-23; susceptible (S) ≥ 24

<sup>e</sup>Levofloxacin (5 µg) : resistant (R) ≤ 15; intermediate (I) 16-18; susceptible (S) ≥ 19

<sup>f</sup>Clindamycin (2 µg) : resistant (R) ≤ 14; intermediate (I) 15-16; susceptible (S) ≥ 17

<sup>g</sup>Erythromycin (15 µg) : resistant (R) ≤ 13; intermediate (I) 14-22; susceptible (S) ≥ 23

<sup>h</sup>Cefoxitin (30 µg) : resistant (R) ≤ 21; susceptible (S) ≥ 22

Supplementary Table 7.3: Antibiogram of clinical isolates of MRSA using disk diffusion tests with various classes of antibiotics including oxazolidone (linezolid-LZD), sulfonamide (trimethoprim/sulfomethoxazole-SXT), rifamycin (rifampicin-RIF), aminoglycoside (gentamicin-GEN) and glycopeptide (vancomycin-VAN)

Isolate number	LZD <sup>a</sup>	SXT <sup>b</sup>	RIF <sup>c</sup>	GEN <sup>d</sup>	VAN <sup>e</sup>
08-U-0185	30 (S)	34 (S)	33 (S)	22 (S)	20 (S)
08-U-0186	26 (S)	32 (S)	30 (S)	19 (S)	19 (S)
08-U-0187	31 (S)	32 (S)	30 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0188	28 (S)	30 (S)	28 (S)	20 (S)	17 (I)
08-U-0189	28 (S)	33 (S)	31 (S)	20 (S)	20 (S)
08-U-0190	26 (S)	32 (S)	31 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0191	27 (S)	35 (S)	33 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0192	28 (S)	32 (S)	31 (S)	20 (S)	17 (I)
08-U-0193	28 (S)	32 (S)	32 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0194	27 (S)	31 (S)	31 (S)	10 (R)	19 (S)
08-U-0195	28 (S)	33 (S)	28 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0196	28 (S)	33 (S)	32 (S)	20 (S)	18 (I)
08-U-0197	28 (S)	33 (S)	32 (S)	20 (S)	17 (I)
08-U-0198	28 (S)	33 (S)	32 (S)	21 (S)	18 (I)
08-U-0199	27 (S)	33 (S)	29 (S)	20 (S)	19 (S)
08-U-0200	29 (S)	33 (S)	31 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0201	28 (S)	32 (S)	28 (S)	19 (S)	18 (I)
08-U-0202	28 (S)	33 (S)	32 (S)	20 (S)	19 (S)
08-U-0203	27 (S)	33 (S)	31 (S)	21 (S)	18 (I)
08-U-0204	27 (S)	30 (S)	28 (S)	10 (R)	17 (I)
08-U-0205	30 (S)	34 (S)	31 (S)	20 (S)	19 (S)
08-U-0206	27 (S)	33 (S)	31 (S)	20 (S)	19 (S)
08-U-0207	27 (S)	33 (S)	32 (S)	20 (S)	19 (S)
08-U-0208	27 (S)	33 (S)	30 (S)	20 (S)	19 (S)
08-U-0209	27 (S)	31 (S)	28 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0213	27 (S)	33 (S)	31 (S)	21 (S)	18 (I)
08-U-0214	27 (S)	31 (S)	Ø (R)	Ø (R)	18 (I)
08-U-0215	27 (S)	Ø (R)	31 (S)	20 (S)	20 (S)
08-U-0216	27 (S)	31 (S)	28 (S)	25 (S)	19 (S)
08-U-0217	26 (S)	33 (S)	30 (S)	21 (S)	19 (S)
08-U-0218	26 (S)	33 (S)	23 (S)	20 (S)	18 (I)
08-U-0219	27 (S)	31 (S)	23 (S)	20 (S)	18 (I)
08-U-0220	28 (S)	33 (S)	31 (S)	18 (S)	19 (S)
08-U-0221	27 (S)	31 (S)	28 (S)	25 (S)	20 (S)
08-U-0222	28 (S)	32 (S)	30 (S)	24 (S)	19 (S)
ATCC 25923	28 (S)	32 (S)	32 (S)	23 (S)	19 (S)
MRSA resistant (%)	0	2.9	2.9	8.6	0

<sup>a-e</sup>The results present the diameter of inhibition growth around each disk (mm)

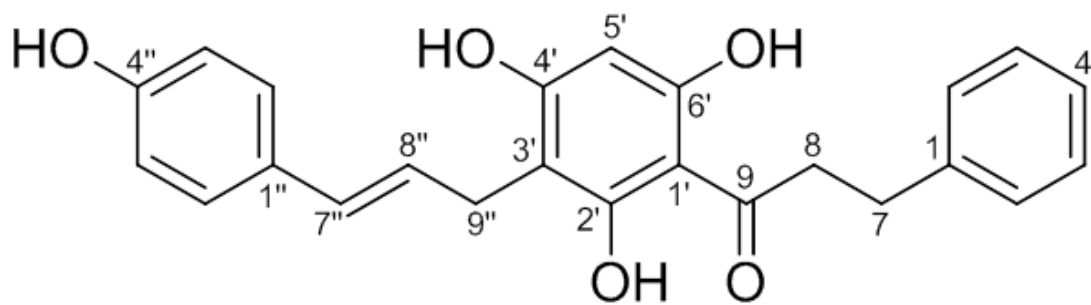
<sup>a</sup>Linezolid (30 µg) : susceptible (S) ≥ 21

<sup>b</sup>Trimethoprim/sulfomethoxazole (1.25/23.75 µg) : resistant (R) ≤ 10; intermediate (I) 11-15; susceptible (S) ≥ 16

<sup>c</sup>Rifampicin (5 µg) : resistant (R) ≤ 16; intermediate (I) 17-19; susceptible (S) ≥ 20

<sup>d</sup>Gentamicin (10 µg) : resistant (R) ≤ 12; intermediate (I) 13-14; susceptible (S) ≥ 15

<sup>e</sup>Vancomycin (30 µg) : resistant (R) ≤ 15; intermediate (I) 16-18; susceptible (S) ≥ 19



**Supplementary Figure 7.1: Molecular structure of balsacone C**

**REFERENCES**

Adnani, N., Chevrette, M.G., Adibhatla, S.N., Zhang, F., Yu, Q., Braun, D.R., et al. (2017). Coculture of marine invertebrate-associated bacteria and interdisciplinary technologies enable biosynthesis and discovery of a new antibiotic, keyicin, ACS Chem. Biol. 12:3093–3102.

Alakomi, H.-L., Paananen, A., Suihko, M.-L., Helander, I.M., Saarela, M. (2006). Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration, Appl. Environ. Microbiol. 72:4695–4703.

Assis, L.M., Nedeljkovic, M., Dessen, A. (2017). New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, Drug Resist. Updat. 31:1–14.

Bagnoli, F., Rappuoli, R., Grandi, G. (2017). *Staphylococcus aureus* microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis. Current topics in microbiology and immunology. Volume 549, 543 p.

Bal, A.M., µ, M.Z., Garau, J., Gottlieb, T., Mazzei, T., Scaglione, F., et al. (2017). Future trends in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: An in-depth review of newer antibiotics active against an enduring pathogen, J. Glob. Antimicrob. Resist. 10:295–303.

Bambeke, F.V., Mingeot-Leclercq, M.P., Struelens, M.J., Tulkens, P.M. (2008). The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics, Cell Press. 124–134.

Banfi, E., Scialino, G., Monti-Bragadin, C. (2003). Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility, J. Antimicrob. Chemother. 52:796–800.

Butler, M.S., and Buss, A.D. (2006). Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics?, *Biochem. Pharmacol.* 71:919–929.

CDC. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. 114 p.

Chao, G., Zhang, X., Zhang, X., Huang, Y., Xu, L., Zhou, L. et al. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from different sources in China. *Foodborne Pathog Dis.* 10: 214-221

Clinical Laboratory Standard Institute. (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29<sup>th</sup> edition. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI document M100: 281 p.

Dalhoff, A., Schubert, S., Ullmann, U. (2005). Effect of pH on the in vitro activity of and propensity for emergence of resistance to fluoroquinolones, macrolides, and a ketolide, *Infection.* 33:36–43.

De Sousa, P.J., De Araujo Torres, R., De Azeredo, G.A., Figueiredo, R.C.B., Da Silva Vasconcelos, M.A., De Souza, E.L. (2012). Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth, *Int. J. Food Microbiol.* 158:9–13.

De Soyza, A., Silipo, A., Lanzetta, R., Govan, J.R., Molinaro, A. (2008). Chemical and biological features of *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharides, *Innate Immun.* 44:127–144.

Epand, R.M., Walker, C., Epand, R.F., Magarvey, N.A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta.* 1858:980–987.



Gardete, S., Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Invest.* 124:2836–2840.

Gauthier, C., Legault, J., Girard-Lalancette, K., Mshvildadze, V., Pichette, A. (2009). Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins, *Bioorg. Med. Chem.* 17:2002–2008

Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., et al. (2001). Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4662–4670.

Grüner, B.M., Han, S.-R., Meyer, H.-G., Wulf, U., Bhakdi, S., Siegel, E.K. (2007). Characterization of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain, *J. Clin. Microbiol.* 45:2684–2685.

He, M., Zhou, Y., Xiao, H., Lu, P. (2016). Amphiphilic cationic copolymers with ciprofloxacin: preparation and antimicrobial activities, *New J. Chem.* 40:1354–1364.

Hurdle, J.G., O'Neill, A.J., Chopra, I., Lee, R.E. (2011). Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections, *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 62–75.

Johnston, M.D., Hanlon, G.W., Denyer, S.P., Lambert, R.J.W. (2003). Membrane damage to bacteria caused by single and combined biocides, *J. Appl. Microbiol.* 94:1015–1023.

Kuyyakanond, T., Quesnel, L.B. (1992). The mechanism of action of chlorhexidine, *FEMS Microbiol. Lett.* 100:211–216.

Lavoie, S., Legault, J., Simard, F., Chiasson, É., Pichette, A. (2013). New

antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*, *Tetrahedron Lett.* 54:1631–1633.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N. et al. (2014). Antibiotic resistance — the need for global solutions, *Lancet Infect. Dis. Comm.* 13:1057–1098.

Lee, D.-S. , Je, J.-Y. (2013). Gallic acid-grafted-chitosan inhibits foodborne pathogens by a membrane damage mechanism, *J. Agric. Food Chem.* 61:6574–6579.

Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., et al. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance, *Nature.* 517:455–9.

Liu, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage, *Int. J. Food Microbiol.* 95:147–155.

Maillard, J. (2002). Bacterial target sites for biocide action, *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 92:16–27.

McGuinness, W.A., Malachowa, N., Deleo, F.R. (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Yale J. Biol. Med.* 90:269–281.

McKenzie, K., Maclean, M., Grant, M.H., Ramakrishnan, P., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Maclean, M. (2016). The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling, *Microbiology.* 162:1680–1688.

Mihoub, M., Pichette, A., Sylla, B., Gauthier, C., Legault, J. (2018). Bidesmosidic betulin saponin bearing L-rhamnopyranoside moieties induces apoptosis and inhibition of lung cancer cells growth *in vitro* and *in vivo*, *PLoS One.* 13:1–19.

Moerman, D. (1998). Native american ethnobotany, Timber Press.

Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R., Cellini, L., Di Giulio, M., Pizzimenti, F. et al. (2017). *In vitro* activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact, J. Med. Microbiol. 58:791–797.

Ribble, D., Goldstein, N.B., Norris, D.A., Shellman, Y.G. (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates, BMC Biotechnol. 7:1–7.

Rushton, L., Sass, A., Baldwin, A., Dowson, C.G., Donoghue, D., Mahenthiralingam, E. (2013). Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria, Antimicrob. Agents Chemother. 57:2972–2980.

Sannasiddappa, T.H., Lund, P.A., Clarke, S.R. (2017). *In Vitro* antibacterial activity of unconjugated and conjugated bile salts on *Staphylococcus aureus*, Front. Microbiol. 8:1–11.

Sergelidis, D., Angelidis, A.S. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a controversial food-borne pathogen, Appl. Microbiol. 64:409–418.

Simard, F., Legault, J., Lavoie, S., Pichette, A. (2014). Balsacones D-I, dihydrocinnamoyl flavans from *Populus balsamifera* buds, Phytochemistry. 100:141–149.

Sipponen, A., Peltola, R., Jokinen, J.J., Laitinen, K. (2009). Effects of Norway spruce (*Picea abies*) resin on cell wall and cell membrane of *Staphylococcus aureus*, Ultrastruct. Pathol. 33 128–135.

Sousa, A., Ramos, C.G., Leitao, J.H. (2011). *Burkholderia cepacia* complex : emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence, Int. J. Microbiol. 1–9.

Subramani, R., Narayanasamy, M., Feussner, K.-D. (2017). Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens, 3 Biotech. 7: 172.

Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide, BMC Microbiol. 15:1–9.

Taylor, P.W. (2013). Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents, Int. J. Antimicrob. Agents. 42:195–201.

Ukuku, D.O., Yamamoto, K., Bari, L., Mukhopadhaya, S., Juneja, V., Kawamoto, S. (2013). Membrane damage and viability loss of *E. coli* O157 : H7 and *Salmonella* spp in apple juice treated with high hydrostatic pressure and thermal death time disks, Food Process. Technol. 4:1–6.

Vestergaard, M., Frees, D., Ingmer, H. (2019). Antibiotic resistance and the MRSA problem. Microbiol. Spectrum 7(2): GPP3-0057-2018

Virto, R., Man, P., Condon, S., Raso, J. (2005). Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate, Appl. Environ. Microbiol. 71:5022–5028.

WHO. (2016). United Nations meeting on antimicrobial resistance. Bull. World Health Organ. 94: 633-708.

Yang, A., Cardona, D.L., Barile, F.A. (2002). *In vitro* cytotoxicity testing with fluorescence-based assays in cultured human lung and dermal cells, Cell Biol. Toxicol. 18:97–108

Zhang, M., Yang, C.L., Xiao, Y.S., Zhang, B., Deng, X.Z., Yang, L. et al. (2017). Aurachin SS, a new antibiotic from *Streptomyces* sp., J. Antibiot. 70:853–855.

## CHAPITRE VIII.

### CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES FUTURES

## CONCLUSIONS

L'énorme défi posé par la résistance des bactéries aux antibiotiques serait bien servi par la découverte et le développement d'une nouvelle vague de médicaments et de produits antibactériens. L'augmentation de la résistance bactérienne amène une réelle problématique au niveau mondial. L'article publié par Peter W. Taylor en 2013 nous rappelle que les produits naturels ont été le pilier de la découverte de médicaments anti-infectieux depuis les premiers jours de l'ère des antibiotiques, mais que l'extraction de ces ressources naturelles a été presque abandonnée par les principaux acteurs pharmaceutiques en faveur de la chimie de synthèse. Selon Newman et Cragg (2007), les produits naturels et les médicaments basés sur la synthèse de produits naturels et leurs dérivés représentaient plus de 75% des 97 nouvelles substances chimiques antibactériennes introduites entre 1981 et 2006. Ces résultats mettent en évidence l'importance des produits naturels comme base de nouveaux médicaments pour les maladies infectieuses bactériennes. L'émergence rapide de bactéries multi-résistantes pousse les chercheurs à explorer davantage les composés antibactériens dérivés des plantes pour trouver de nouveaux médicaments thérapeutiques potentiels (Subramani *et al.*, 2017). Ces nouveaux antibactériens naturels pourraient être utilisés seuls, ou en combinaison à la chimiothérapie antibactérienne conventionnelle.

Ce projet de thèse a permis de sélectionner et de valoriser des extraits et composés de plantes issues de la forêt boréale possédant des activités antibactériennes et les résultats ouvrent de nombreuses voies de développement très prometteuses pour de nouvelles vagues de produits. Cette recherche vise d'un côté à diminuer le niveau de résistance chez les bactéries provenant du milieu communautaire et d'autre part à trouver de nouveaux composés antibiotiques susceptibles d'être efficaces contre les bactéries multi-résistantes. Deux types de produits se sont révélés particulièrement prometteurs : les huiles essentielles et les résines. Parmi tous les candidats investigués

provenant de la forêt boréale, les huiles essentielles de tanaïse vulgaire (*Tanacetum vulgare* L.), tussilage farfara (*Tussilago farfara* L.) et monarde didyma (*Monarda didyma* L.) (voir chapitre IV à VI), ainsi que la résine de sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.) (chapitre III) et l'exsudat des bourgeons (résine) de peuplier baumier (*Populus balsamifera* L.) (chapitre VII) ont été sélectionnées pour des analyses plus poussées.

Les huiles essentielles et les résines sont des produits hydrophobes, et plusieurs auteurs ont souligné la nécessité de mettre au point un test fiable et reproductible adapté à ce type de composés (Mann and Markham, 1998; Hood *et al.*, 2003; Othman *et al.*, 2011). Dans le cadre de cette recherche, un test permettant de déterminer les propriétés antibactériennes des composés et matrices hydrophobes a été mis au point (Antibacterial Hydrophobic Assay (AHA), chapitre 3). Ce test en milieu solide, en plaques 96 puits, a été développé afin d'analyser les propriétés antibactériennes spécifiques aux huiles essentielles et résines. Le test AHA permet la diffusion des composés et un contact uniforme des bactéries avec les composés à l'étude. Pour valider la méthode, les essais ont été effectués avec 8 antibiotiques bien connus et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les tests standards (microdilution et diffusion sur disque de gélose). Les résultats obtenus sont similaires, ce qui confirme la validité et l'efficacité de la nouvelle méthode. La procédure détaillée a été publiée dans *Journal of Ethnopharmacology* (Coté *et al.*, 2016) et est disponible au chapitre III.

Des tests de bioactivité ont été effectués sur les différents extraits (huiles essentielles et résines). Également, l'analyse chimique a été effectuée à l'aide d'un GC-MS et d'un GC-FID. Les composés majoritaires de chaque extrait ont été déterminés ainsi

que leur pourcentage relatif. Par la suite, les composés majoritaires ont été testés *in vitro* afin de déterminer ceux responsables des activités biologiques répertoriées.

Dans un premier article, la résine entière de sapin baumier (*Abies balsamea*) (également utilisée pour le développement du test AHA) a été étudiée pour la première fois. Elle s'est révélée être principalement composée de néo-abienol,  $\beta$ -pinène,  $\beta$ -phellandrène et d'acides résiniques comme l'acide abiétique, néoabiétique et palustrique. L'activité antibactérienne retrouvée contre *Staphylococcus aureus* et deux souches de *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) est en grande partie dû à la présence des acides résiniques. La résine de sapin baumier est un produit qui, bien qu'encore peu étudié, pourrait se révéler très utile dans les domaines pharmaceutique et dermatologique. Pour des recherches futures, il pourrait être intéressant de tester la résine entière contre une vaste gamme de bactéries gram positif et gram négatif afin de bien caractériser le spectre d'activité. Cet extrait pourrait être un bon candidat pour lutter contre des bactéries multi-résistantes, notamment pour les infections au niveau de la peau. Des tests pourraient également être effectués afin de connaître les bienfaits de l'extrait pour la désinfection, la régénération et la cicatrisation des plaies. L'ajout de cet extrait dans des crèmes antibactériennes pourrait également être envisagé afin de limiter la contamination et la propagation des bactéries gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, etc) et ce, même en présence de résistances aux antibiotiques. La présence de synergies et le nombre élevé de composés actifs dans la résine entière pourraient limiter le risque de voir l'émergence de nouvelles bactéries résistantes.

Par la suite, le test adapté pour les composés hydrophobes (AHA) a permis de tester trois huiles essentielles qui pourraient être utilisées pour remplacer les antibiotiques en nutrition animale, et de sélectionner celle présentant les meilleurs résultats *in vitro*



pour des tests plus exhaustifs. Brièvement, l'huile essentielle de tanaïsie vulgaire (*Tanacetum vulgare*) est principalement constituée de monoterpènes et est riche en camphor, bornéol et 1,8-cinéole. L'activité antibactérienne retrouvée contre *S. aureus* et *E. coli* est principalement dû à la présence de camphor et de l'oxide de caryophyllene (composé minoritaire). L'huile essentielle de tussilage (*Tussilago farfara*) est principalement composé de 1-nonène (composé aliphatique) et de  $\alpha$ -phellandrène (monoterpène). L'activité antibactérienne retrouvée contre *S. aureus* est associé à par deux de ses composés minoritaires, le 1-decene et l'acide dodécanoïque. Finalement, l'huile essentielle de monarde didyma (*Monarda didyma*) est riche en carvacrol,  $\gamma$ -terpinène,  $\rho$ -cymène et thymol. L'activité antibactérienne retrouvée contre *S. aureus*, *E. coli* et *C. perfringens* est principalement due à la présence de carvacrol et de thymol, deux composés phénoliques dont l'activité antibactérienne est bien connue. Suite à l'analyse des résultats, bien que les trois huiles essentielles aient démontré des activités antibactériennes *in vitro* contre *S. aureus*, l'huile essentielle de *Monarda didyma* s'est révélée la plus prometteuse pour les tests *in vivo*. Les résultats des tests biologiques obtenus pour *T. vulgare* et *T. farfara* ont néanmoins été publiés (chapitres IV et V). Ces deux huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes contre *S. aureus*, des tests supplémentaires pourraient également être effectués contre d'autres bactéries gram positif. De plus, l'huile essentielle de *Tanacetum vulgare* possède une activité anti-inflammatoire intéressante. Par contre, les processus inflammatoires sont complexes et des tests supplémentaires pourraient être effectués, entre autres l'effet de l'huile essentielle sur les cytokines et autres médiateurs de l'inflammation.

L'huile essentielle de *M. didyma* sélectionnée a par la suite été testée *in vivo* chez les souris de laboratoire. Des résultats positifs et significatifs sur le gain de poids corporel ont été obtenus avec l'ajout d'huile essentielle dans la diète quotidienne des souris à des concentrations de 0,1 % et 0,2 % (chapitre VI). L'huile essentielle a

finalement été testée directement chez les poulets d'élevage. L'ajout d'huile essentielle de monarde dans la diète des poulets a permis d'augmenter significativement le gain de poids comparativement au groupe contrôle (le groupe contrôle recevait les antibiotiques standards). De plus, le pourcentage de mortalité n'était pas significativement différent entre les deux groupes à l'étude. Les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *M. didyma* semblent indiquer qu'elle pourrait être utilisée avec succès comme produits de substitution aux antibiotiques chez les poulets d'élevage. Non seulement l'huile essentielle possède des activités antibactériennes, mais également des activités anti-inflammatoires et antioxydantes, ce qui pourrait être très bénéfique pour la santé intestinale des poulets (microbiote). Il y a très peu d'études sur l'effet des huiles essentielles sur le microbiote intestinal. L'étude de Tiihonen *et al.* (2010) démontre que la supplémentation d'un mélange d'huiles essentielles comprenant du thymol et du cinnamaldéhyde exerce un effet positif sur le microbiote intestinal et une amélioration des performances de croissance chez les poulets d'élevage. Cependant, une étude récente (Betancourt *et al.*, 2019) n'a mis en évidence aucun impact de la supplémentation en huile essentielle d'origan colombien (*Lippia origanoides* Kunth) sur le microbiote intestinal des poulets. Les résultats semblent être fortement liés au type d'huile essentielle utilisé, et beaucoup de recherches sont encore nécessaires dans ce domaine.

Des tests supplémentaires seraient à prévoir pour une utilisation plus intensive de l'huile essentielle de *M. didyma* dans l'alimentation animale. Pour des recherches futures, des tests pourraient être effectués sur un plus grand nombre de réplica et d'unité expérimentale. Les poulets pourraient ainsi être infectés manuellement afin d'évaluer l'effet spécifique de l'huile essentielle sur chaque infection. Par exemple, différentes expérimentations pourraient être effectués séparément pour voir l'effet sur la colonisation de l'intestin par la bactérie *E. coli* et *C. perfringens*, puis l'effet sur les parasites d'*Eimeiria* sp. Il serait notamment important de connaître les processus d'absorption et de dégradation des huiles essentielles utilisées, et d'évaluer la

présence de résidus dans la viande. Ensuite, certains tests pourraient être conduits afin de déterminer si une alimentation supplémentée en huile essentielle permettrait une meilleure préservation de la viande dérivée de l'élevage et si elle en améliorerait le goût et l'odeur (tests de qualité et organoleptiques). Parallèlement, des tests de mise en culture de la monarde didyma au Saguenay-Lac-St-Jean pourraient être envisagés. Dans cette optique, plusieurs variétés de *Monarda didyma* seraient cultivées, et les variétés présentant la meilleure croissance en champs pourraient être testées en laboratoire. L'analyse de la composition des extraits et de leurs propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et antioxydantes permettraient de sélectionner la variété la mieux adaptée au projet. Ce volet pourrait permettre de développer un marché viable, accessible pour les fermes d'élevage et d'assurer un contrôle sur la qualité et l'efficacité de l'huile essentielle utilisée. La substitution des antibiotiques par une huile essentielle produite localement serait également une avancée considérable au niveau du développement durable. Produire un tel extrait nécessite moins de transformation que les antibiotiques et diminue de façon considérable le transport de la marchandise (installations disponibles à proximité). La monarde nécessite peu de soin, attire un grand nombre d'insectes et peut facilement être intégrée à d'autres types de cultures.

Finalement, certaines bactéries multi-résistantes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, Entérocoques résistant à la vancomycine, Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, etc.) causent d'importantes problématiques dans les hôpitaux. Récemment, le LASEVE a identifié un nouveau composé antibiotique provenant des bourgeons du peuplier baumier (*Populus balsamifera*) efficace contre *S. aureus*. L'activité antibactérienne retrouvée dans les bourgeons semble provenir en grande partie des balsacones (dérivé de dihydrochalcones). Au chapitre VII, la balsacone C a été testée contre plusieurs bactéries pathogènes gram positif et négatif ainsi que sur une banque de trente-cinq (35) SARM provenant de l'hôpital de Chicoutimi. Il a été

constaté que la balsacone C agissait rapidement contre toutes les différentes bactéries gram positif et également une bactérie gram négatif. De plus, un test d'induction de la résistance a été effectué avec la balsacone C et les résultats démontrent qu'elle possède un faible risque d'apparition spontanée de résistances, et ce même après 30 jours d'exposition à des doses sub-létales. La prochaine étape consistait par conséquent à déterminer le mécanisme d'action du composé. La membrane cellulaire bactérienne est le premier point de contact entre l'antibiotique et la bactérie, en plus de posséder un haut potentiel pour la découverte de nouveaux antibiotiques. Grâce à l'utilisation de composés fluorescents (iodure de propidium et Syto 9), un bris dans l'intégrité des membranes bactériennes a été observé. Cette action sur la membrane des bactéries a été confirmée grâce au microscope électronique à balayage (MEB) et à la mesure du relargage des acides nucléiques et des protéines dans le milieu. La balsacone C semble très prometteuse pour traiter les bactéries multi-résistantes. Il semble que la balsacone C cible la membrane bactérienne et est rapidement bactéricide. Par contre, de nombreuses recherches restent encore à venir en vue d'une utilisation comme antibiotique pour lutter contre les SARM dans le système médical, notamment : i) déterminer la cible précise du composé sur la membrane des bactéries (synthèse des peptidoglycanes, potentiel membranaire, etc.), ii) effectuer des tests de toxicités *in vitro* et *in vivo*, iii) déterminer la voie d'administration la plus efficace, iv) effectuer des tests d'efficacité et de traitement *in vivo* chez les souris, v) déterminer les doses à utiliser *in vivo*, vi) mettre sur pied une méthode de synthèse efficace et rapide de la balsacone C, vii) faire les essais cliniques nécessaires en vue d'une utilisation chez l'humain. Il serait également intéressant de vérifier l'activité sur les biofilms de *S. aureus* et de SARM et de tester la possible synergie de la balsacone C avec d'autres antibiotiques bien connus. Des tests d'induction et de transfert de résistances sur de plus longues périodes pourraient être effectués afin d'avoir une meilleure idée de la probabilité des risques d'apparition de résistances.

Pour conclure, l'objectif général initialement fixé qui était de caractériser des extraits et composés issues de plantes de la forêt boréale possédant de bonnes activités antibactériennes a été atteint. Nos travaux ont également contribué au développement d'une nouvelle méthode permettant de déterminer les propriétés antibactériennes des composés hydrophobes (AHA). Ce projet de thèse a permis d'enrichir nos connaissances sur la composition chimique et la bioactivité de cinq produits et composés provenant de plantes du Saguenay-Lac-Saint-Jean, Québec, Canada. Les retombées de ce projet pourraient être importantes pour : 1) diminuer l'utilisation des antibiotiques en nutrition animale; 2) diminuer l'incidence des bactéries résistantes aux antibiotiques provenant de l'élevage animal, et 3) développer de nouveaux antibiotiques permettant le traitement des patients qui font face à des infections résistantes. Par contre, ce n'est qu'un premier pas dans la bonne direction et beaucoup d'études seront encore nécessaires pour développer le plein potentiel de ces produits et composés. Par ailleurs, de nombreuses avenues de recherche sont soulevées dans cette thèse. Nous pouvons néanmoins confirmer que la forêt boréale est une source potentielle d'une vaste gamme de produits antibactériens. Encore très peu de plantes, champignons et micro-organismes présents dans cet écosystème particulier ont été étudiés en détail et de nombreuses découvertes restent à venir!

## BIBLIOGRAPHIE

- Aarestrup, F. M. 2003. Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 152 p.
- Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, H. D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, and F. Bager. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2054–2059.
- Aboukhalid, K., C. Al. Faiz, A. Douaik, M. Bakha, K. Kursal, M. Agacka-Moldoch. 2017. Influence of environmental factors on essential oil variability in *Origanum compactum* Benth. growing wild in Morocco. *Chemistry & biodiversity* 14: e1700158
- Agriculture and Agri-Food Canada. The canadian chicken industry 2006. Animal Industry Division, Poultry Section, Ontario, Canada. 2006. 46 p.
- Assis, L. M., M. Nedeljkovic, and A. Dessen. 2017. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Resistance Updates* 31:1–14.
- Bagnoli, F., R. Rappuoli, and G. Grandi. 2017. *Staphylococcus aureus* microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis. *Current topics in Microbiology and Immunology*. Volume 549: 543 p.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 46:446–75.
- Bal, A. M., M. Z. David, J. Garau, T. Gottlieb, T. Mazzei, F. Scaglione, P. Tattevin,

- and I. M. Gould. 2017. Future trends in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: An in-depth review of newer antibiotics active against an enduring pathogen. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 10:295–303.
- Bambeke, F. Van, and P. Tulkens. 2010. *Pharmacologie et Pharmacothérapie*. Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire. Université catholique de Louvain, Bruxelles. 212 p.
- Becker, D., M. Selbach, C. Rollenhagen, M. Ballmaier, T. F. Meyer, M. Mann, and D. Bumann. 2006. Robust Salmonella metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* 440:303–307.
- Betancourt, L., M. Hume, F. Rodríguez, D. Nisbet, M. U. Sohail, G. Afanador-Tellez. 2019. Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and Eimeria species on broiler production and cecal microbiota. *Poultry Science* 98:193.
- Beutler, B. 2002. LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment. *J. Endotoxin Res.* 8:329–335.
- Botsoglou, N. A., P. Florou-Paneri, E. Christaki, I. Giannenas, and A. B. Spais. 2004. Performance of rabbits and oxidative stability of muscle tissues as affected by dietary supplementation with Oregano essential oil. *Archives of Animal Nutrition* 58:209–218.
- Botsoglou, N., P. Florou-Paneri, E. Christaki, D. J. Fletouris, and A. B. Spais. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *British Poultry Science* 43:223–230.

- Bozkurt, M., I. Giannenas, K. Küçükyılmaz, E. Christaki, and P. Florou-Paneri. 2013. An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British poultry science* 54:713–27.
- Brenes, A., and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* 158:1–14.
- Bugg, T. D. H., and C. T. Walsh. 1992. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Natural Product Reports* 9:199–215.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology* 94:223–53.
- Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed : effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 16:175–188.
- Calo, J. R., P. G. Crandall, C. A. O’Bryan, and S. C. Ricke. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* 54:111–119.
- Camara, D. 2012. Etude de la voie de biosynthèse du folate : caractérisation biochimique et recherche d’inhibiteurs de la formation de l’acide para-aminobenzoïque. *Sciences agricoles. Université de Grenoble*. 182 p.
- Carson, C. F., and T. V. Riley. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *The Journal of Applied Bacteriology* 78:264–9.
- CDC. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. U.S. Department of Health and Human Services.



- Chand, S., I. Lusunzi, D. A. Veal, L. R. William, and P. Karuso. 1994. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. *The Journal of Antibiotics* 47:1295–1304.
- Chaudhary, A. S. 2016. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 6:552–556.
- Chellat, M. F., L. Raguz, and R. Riedl. 2016. Targeting antibiotic resistance. *Medicinal Chemistry* 55:2–30.
- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, and N. Hermans. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo 79:213–220.
- Coetzee, J., C. Corcoran, E. Prentice, M. Moodley, M. Mendelson, L. Poirel, P. Nordmann, and A. Brink. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients. *South African Medical Journal* 106:449–450.
- Coté, H., M. Boucher, A. Pichette, B. Roger, and J. Legault. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Journal of Ethnopharmacology* 194:684–689.
- Craig, W. J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70:491S–499S.
- CUPE. 2009. Health care associated infections: A backgrounder. The Canadian Union of Public Employees, Canada. 32 p.
- Dahiya, J. P., D. C. Wilkie, A. G. Van Kessel, and M. D. Drew. 2006. Potential

strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology* 129:60–88.

Dho-moulin, M., and J. M. Fairbrother. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research, BioMed Central* 30:299–316.

Diarra, M. S., and F. Malouin. 2014. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in Microbiology* 5:282.

Diarrassouba, F., M. Sory Diarra, S. Bach, P. Delaquis, J. Pritchard, E. Topp, and B. Skura. 2007. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *Journal of Food Protection* 70:1316–1327.

Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84:634–643.

Dodds, D. R. 2017. Antibiotic resistance; a current epilogue. *Biochemical Pharmacology* 134:139–146.

Drew, M. D., N. A. Syed, B. G. Goldade, B. Laarveld, and A. G. Van Kessel. 2004. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poultry Science* 83:414–420.

ECDC. 2014. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-Net). 130p.

Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents : a review. *Phytotherapy Research* 21:308–323.

Epand, R. M., C. Walker, R. F. Epand, and N. A. Magarvey. 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta*

1858:980–987.

Espeli, O., and K. J. Marians. 2004. Untangling intracellular DNA topology. *Molecular Microbiology* 52:925–931.

EUCAST. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection* 6:509–15.

EUCAST. 2013. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. *Clinical Microbiology and Infection* 3:1–18.

Evans, J. W., M. S. Plunkett, and M. J. Banfield. 2001. Effect of an essential oil blend on coccidiosis in broiler chicks. *Poultry Science* 80 (suppl.:258).

Fàbrega, A., S. Madurga, E. Giralt and J. Vila. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology* 2:40–61

Feklistov, A., V. Mekler, Q. Jiang, L.F. Westblade, H. Irschik, R. Jansen, A. Mustae, S.A. Darst and R.H. Ebricht. 2008. Rifamycins do not function by allosteric modulation of binding of Mg<sup>2+</sup> to the RNA polymerase active center. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14820-14825

Felten, A., B. Grandry, P. H. Lagrange, and I. Casin. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* 40:2766–71.

Florou-Paneri<sup>1</sup>, P., I. Giannenas, E. Christaki, A. Govaris, and N. Botsoglou. 2006. Performance of chickens and oxidative stability of the produced meat as affected by feed supplementation with oregano, vitamin C, vitamin E and their

- combinations. *Archiv. für Geflügelkunde* 70:232–240.
- Floss, H. G., and T.-W. Yu. 2005. Rifamycin-Mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews* 105:621–632.
- Franz, C., K. H. C. Baser, and W. Windisch. 2009. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. *Flavour and Fragrance Journal* 25:327–340.
- Frieri, M., K. Kumar, and A. Boutin. 2016. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*:1–10.
- Furtula, V., E. G. Farrell, F. Diarrassouba, H. Rempel, J. Pritchard, and M. S. Diarra. 2003. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. *Poultry Science* 89:180–188.
- Ganewatta, M.S. and C. Tang. 2015. Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial. *Polymer* 63:1-29
- Garrett, R. A. 2000. *The Ribosome: structure, function, antibiotics, and cellular interactions*. ASM Press, Washington, D.C., 536 p.
- Gassner, B., and A. Wuethrich. 1994. Pharmacokinetic and toxicological aspects of the medication of beef-type calves with an oral formulation of chloramphenicol palmitate. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 17:279–283.
- Giannenas, I., P. Florou-Paneri, N. Botsoglou, E. Christaki, and A. B. Spais. 2005. Effect of supplementing feed with oregano and/or  $\alpha$ -tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat. *Journal of Animal and Feed Sciences* 14:521–535.

- Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N. A. Botsoglou, and A. B. Spais. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition* 57:99–106.
- Gleckman, R., N. Blagg and D.W. Joubert. 1981. Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy* 1:14-20
- Gupta, N., and G. Saxena. 2010. Antimicrobial activity of constituents identified in essential oils from *Mentha* and *Cinnamomum* through GC-MS. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 1:715–702.
- Gussem, M. D. E. 2006. Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. *European Symposium on Poultry Nutrition*:253–261.
- Hafez, H. M. 2008. Poultry coccidiosis: prevention and control approaches. *Archiv. für Geflügelkunde* 72:2–7.
- Hammer, K. A., C. F. Carson, and T. V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86:985–990.
- Hatheway, C. L. 1990. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* 3:66–98.
- Holmberg, S. D., M. D. Michael, T. Osterholm, K. A. Senger, and M. L. Cohen. 1984. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *New England Journal of Medicine* 311:617–622.
- Hood, J. R., J. M. Wilkinson, H. M. A. Cavanagh, J. R. Hood, J. M. Wilkinson, H. M. A. Cavanagh, J. R. Hood, J. M. Wilkinson, and H. M. A. Cavanagh. 2003.

- Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research* 15:428–433.
- Immerseel, F. Van, J. De Buck, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, F. Van Immerseel, J. De Buck, F. Pasmans, F. Van Immerseel, J. De Buck, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. *Clostridium perfringens* in poultry : an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology* 33:537–549.
- Janssen, A. M., J. J. Scheffer, and A. B. Svendsen. 1987. Antimicrobial activities of essential oils. A 1976-1986 literature review on possible applications. *Pharmaceutisch Weekblad. Scientific edition* 9:193–197.
- Keyburn, A. L., T. L. Bannam, R. J. Moore, and J. I. Rood. 2010. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* 2:1913–1927.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, and J. J. Collins. 2010. How antibiotics kill bacteria : from targets to networks. *Nature Publishing Group* 8:423–435.
- Kohlert, C., I. Rensen, R. Maerz, G. Schindler, E. U. Graefe, and M. Veit. 2000. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta Medica* 66:495–505.
- Kong, C., H. Neoh, and S. Nathan. 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins : a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins* 8:1–21.
- Lal, K., E. Bromley, R. Oakes, J. H. Prieto, J. Sanya, D. Kurian, L. Hunt, J. R. Yates, J. M. Wastling, R. E. Sinden, and F. M. Tomley. 2010. Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second- generation merozoite. *Proteomics* 9:4566–4576.
- Lavoie, S., J. Legault, F. Simard, É. Chiasson, and A. Pichette. 2013. New

antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*.  
Tetrahedron Letters 54:1631–1633.

Laxminarayan, R., A. Duse, C. Wattal, A. K. M. Zaidi, H. F. L. Wertheim, N. Sumpradit, E. Vlieghe, G. L. Hara, I. M. Gould, H. Goossens, C. Greko, A. D. So, M. Bigdeli, G. Tomson, W. Woodhouse, E. Ombaka, A. Q. Peralta, F. N. Qamar, F. Mir, S. Kariuki, Z. qar A. Bhutta, A. Coates, R. Bergstrom, G. D. Wright, E. D. Brown, and O. Cars. 2014. Antibiotic resistance — the need for global solutions. The Lancet Infectious Diseases Commission 13:1057–1098.

Legault, J., and A. Pichette. 2007. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. The Journal of Pharmacy and Pharmacology 59:1643–1647.

Li, Y., F. Qin, S. M. Wang, R. X. Guo, Y. F. Zhang, Y. C. Gu, Q. W. Shi . 2013. Chemical studies on *Taxus canadensis*. Chemistry and Biodiversity 0:1729-1753

Lillehoj, H. S., and E. P. Lillehoj. 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. Avian Disease:408–425.

Loewen, K., Y. Schreiber, M. Kirlew, N. Bocking, and L. Kelly. 2017. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Le Médecin de famille canadien 63:512–520.

Lovland, A., M. Kaldhusdal, A. Lovland, and M. Kaldhusdal. 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens* -associated hepatitis. Avian Pathology 30:73–81.

Luzzatto, L., D. Apirion and D. Schlessinger. 1968. Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 60:873-880

- Mahady, G. B. 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design* 11:2405–2427.
- Mann, C. M., and J. L. Markham. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84:538–544.
- Marcincak, S., R. Cabadaj, P. Popelka, and L. Šoltýsová. 2008. Antioxidative effect of oregano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat. *Slovenian Veterinary Research* 45:61–66.
- Marshall, B. M., and S. B. Levy. 2011. Food animals and antimicrobials : impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 24:718–733.
- Martens, E., and A. L. Demain. 2017. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics* 70:520–526.
- Matterson, L. D., E. P. Singsen, L. Decker, and A. Kozeff. 1951. A comparison of several antibiotics as growth stimulants in practical chick-starting rations. *Agric. Exp. Sta. Bull.* 275: 20 p.
- Mcguinness, W. A., N. Malachowa, and F. R. Deleo. 2017. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale Journal of Biology and Medicine* 90:269–281.
- Mitsch, P., B. Kohler, C. Gabler, R. Losa, and K. Zitterl-Eglseer. 2002. CRINA poultry reduces colonisation and proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestine and faeces of broiler chickens. Eleventh European Poultry Conference, Bremen, Germany. Pages 6–10.
- Mitsch, P., K. Zitterl-Eglseer, B. Kohler, C. Gabler, R. Losa, and I. Zimpernik. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens.



Poultry Science 83:669–675.

Mncwangi, N., W. Chen, I. Vermaak, A. M. Viljoen, and N. Gericke. 2012. Devil's claw — A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology* 143:755–771.

Mohsenzadeh, F., A. Chehregani, and H. Amiri. 2011. Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of *Tanacetum parthenium* in different developmental stages. *Pharmaceutical Biology* 49:920–6.

Morris, J. A., A. Khettry, and E. W. Seitz. 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56:595–603.

Munita, J. M., and C. A. Arias. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* 4:1–37.

Nakatani, N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *BioFactors* 13:141–6.

National Research Council. 1999. The use of drugs in food animals: benefits and risks. In: *Food-animal production practices and drugs use*. Washington, DC: National Academy Press. Page 27-68.

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

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289:920 – 930.

Nzila, A. 2006. The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*

57:1043–1054.

Othman, M., H. San, C. Wiart, T. Jin, K. Hon, and K. Nee. 2011. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 84:161–166.

Ouattara, B., R. E. Simard, R. a Holley, G. J. Piette, and A. Bégin. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37:155–62.

Parish, W. E. 1961. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *Journal of Comparative Pathology* 71:377–393.

Park, J. T., and T. Uehara. 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 72:211–227.

Di Pasqua, R., G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini, and G. Mauriello. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:4863–4870.

Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:28–52.

Phillips, M. A., and R. B. Croteau. 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* 4:184–190.

Quiroz-Castañeda, E. R., and E. D. Dantán-González. 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *BioMed Research*

International:1–11.

Rautio, M., A. Sipponen, R. Peltola, J. Lohi, J. J. Jokinen, A. Papp, P. Carlson, and P. Sipponen. 2007. Antibacterial effects of home-made resin salve from Norway spruce (*Picea abies*). *APMIS* 115:335–340.

Remmal, A., S. Achahbar, L. Bouddine, N. Chami, and F. Chami. 2011. *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Veterinary Parasitology* 182:121–6.

Russo, M., G. C. Galletti, P. Bocchini, and A. Carnacini. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 8561:3741–3746.

Saini, R., S. Davis, and W. Dudley-Cash. 2003. Oregano essential oil reduces necrotic enteritis in broilers. Pages 95–98 *Fifty-Second Western Poultry Disease Conference*.

Scagel, R. F., R. J. Bandoni, G. E. Rouse, W. B. Schofield, J. R. Stein, and T. M. C. Taylor. 1965. An evolutionary survey of the plant kingdom. *The Bryologist* 69:260 p.

Schmid, M. B. 2006. Do targets limit antibiotic discovery ? *Nature Publishing Group* 24:419–420.

Senatore, F. 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in campania (Southern Italy). *Journal of Food Chemistry*:1327–1332.

Sharopov, F., M. S. Braun, I. Gulmurodov, D. Khalifaev, S. Isupov, and M. Wink.

2015. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods* 4:645–653.
- Shojadoost, B., A. R. Vince, and J. F. Prescott. 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research* 43:1–12.
- Si, W., X. Ni, J. Gong, H. Yu, R. Tsao, Y. Han, and J. R. Chambers. 2009. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. *Journal of Applied Microbiology* 106:213–220.
- Silva, J., W. Abebe, S. M. Sousa, V. G. Duarte, M. I. Machado, and F. J. Matos. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology* 89:277–283.
- Singh, S. B., and J. F. Barrett. 2006. Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*:1006–1015.
- Smith, D. L., J. Dushoff, and J. G. Morris. 2005. Agricultural antibiotics and human health. *PLoS medicine* 2:731–735.
- Smith, M. D., and P. L. Navilliat. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods* 28:21–24.
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, and L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26:118–22.
- Songer, J. G. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 9:216–234.

- De Sousa, P. J., R. De Araujo Torres, G. A. De Azeredo, R. C. B. Figueiredo, M. A. Da Silva Vasconcelos, and E. L. De Souza. 2012. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. *International Journal of Food Microbiology* 158:9–13.
- Spika, J. S., S. H. Waterman, and G. W. Soo Hoo. 1987. Chloramphenicol resistant *Salmonella newport* traced through hamburger to dairy farms. *New England Journal of Medicine*:565–570.
- St-Amand, J. A., S. J. . Otto, R. Cassis, and C. B. A. Christianson. 2013. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from poultry in Alberta. *Avian Pathology* 9457:379–386.
- Stewart, K. M., and D. Cole. 2005. The commercial harvest of Devil's Claw (*Harpagophytum* spp.) in southern Africa: the devil's in the details. *Journal of Ethnopharmacology* 100:225–236.
- Subramani, R., M. Narayanasamy, and K.-D. Feussner. 2017. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech* 7:1–15.
- Timbermont, L., F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2011. Necrotic enteritis in broilers : an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology* 40:341–347.
- Tiihonen, K., H. Kettunen, M. H. L. Bento, M. Saarinen, S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, H. Schulze and N. Rautonen. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *British Poultry Science* 51:381-392.

- Ultee, A., M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1561–1568.
- Valgas, C., S. M. De Souza, E. F. A. Smânia, and A. Smânia Jr. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:369–380.
- Vidanarachchi, J., H. Mikkelsen, I. Sims, P. Iji, and M. Choct. 2005. Phytobiotics: Alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feed. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15:131–144.
- Wichtl, M., and N. G. Bisset. 2000. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*. Third Edition. CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 708 p.
- Windisch, W., and A. Kroismayr. 2007. Natural phytobiotics for health of young piglets and poultry: mechanisms and application. *Poultry Science* 86:643.
- Windisch, W., K. Schedle, C. Plitzner, and A. Kroismayr. 2007. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science* 86:E140–E148.
- Witte, W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16:19–24.
- World Health Organization. 2000. Drug resistance threatens to reverse medical progress. Press Release.
- Xu, J., F. Zhou, B.-P. Ji, R.-S. Pei, and N. Xu. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47:174–179.

Zeng, Z., S. Zhang, H. Wang, and X. Piao. 2015. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6:7.

Zink, L. 2012. Synthèse de dérivés 5-nitroimidazoles a potentialités anti-infectieuses. Faculté de Pharmacie de Marseille. 351p.