

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI**

**DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION D'UNE BANQUE DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANTS À LA MÉTHICILINE (SARM)  
ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE  
DE *PINUS BANKSIANA* LAMB**

**PAR  
MARIE-ÈVE OUELLETTE  
B. SC. BIOTECHNOLOGIE APPLIQUÉE**

**MEMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES-BIOLOGIE**

**JUILLET 2012**

*« L'avancement des sciences dépend de notre capacité à transmettre nos  
connaissances » anonyme*

## RÉSUMÉ

Une mauvaise utilisation des antibiotiques a mené à l'apparition de bactéries résistantes, notamment les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline (SARM). Présentement, la plupart des SARM sont sensibles au linézolide ainsi qu'à la vancomycine. Cependant, les scientifiques craignent l'émergence de SARM résistants à ces antibiotiques. Il est donc important de développer de nouvelles classes d'antibiotiques ayant de nouvelles cibles, afin de contrer la résistance bactérienne. Près de 68 % des antibiotiques utilisés par les cliniciens sont d'origine naturelle ou leurs dérivés. La forêt boréale québécoise abrite près de 3 000 plantes qui sont une source potentielle de nouveaux médicaments. Parmi elles, le pin gris (*Pinus banksiana*), utilisé par les Amérindiens pour soigner les plaies profondes.

Le principal objectif de ce projet visait à identifier de nouveaux composés ayant des propriétés antibiotiques pour traiter les bactéries résistantes (SARM) à partir de biomasse de la forêt boréale. Pour ce faire, nous devons caractériser une banque de SARM isolés cliniquement, évaluer l'activité antibiotique d'extraits de bourgeon de *Pinus banksiana* et identifier les molécules responsables de l'activité antibiotique. Les souches bactériennes (SARM) ont été prélevées à partir de patients du Centre hospitalier de Chicoutimi entre 2007 et 2008. Trente-cinq souches ont été identifiées et caractérisées à l'aide d'antibiogramme (disque et microdilution). La plupart des SARM cliniquement isolés étaient résistants à plusieurs antibiotiques. En effet, les résultats des antibiogrammes effectués sur les 35 souches de SARM ont révélé que 77 % des SARM étaient résistants à la pénicilline, amoxicilline/acide clavulanique, ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine, clindamycine, érythromycine et céfoxitine. En opposition, 88,5 % de SARM ont démontré une sensibilité au linézolide, au TMP-SMX, à la rifampicine et à la gentamicine. Pour ce qui est de la vancomycine, 65,7 % des SARM y étaient sensibles, alors que 34,3 % se sont retrouvés dans la zone intermédiaire.

Les bourgeons du pin gris ont été récoltés, séchés et extraits à partir de solvants de polarité croissante : hexane, dichlorométhane et méthanol. La séparation bioguidée grâce aux antibiogrammes a permis la sélection de molécules actives qui ont été identifiées par GC/MS. Au total, trois extraits ont été testés pour leur activité antibiotique. Seul l'extrait à l'hexane a été fractionné sur colonne chromatographique. Sept fractions ont été obtenues et testées sur *Staphylococcus aureus*. Les fractions 2 ( $IC_{50} : 25 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ) et 3 ( $IC_{50} : 13 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ ) ont été trouvées actives. Neuf acides résiniques ont été identifiés par GC/MS à partir de la fraction 2 : l'acide abiétique, déhydroabiétique, abiét-8-énique, palustrique, pimarique, isopimarique, lévopimarique, sandaracopimarique et le néoabiétole. Tous les acides résiniques isolés du pin gris se sont avérés actifs contre les SARM, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) variant entre 13 et 32  $\mu\text{M}$ .

## REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je voudrais remercier mon directeur, Pr Jean Legault, de m'avoir offert l'opportunité de faire des études supérieures dans un domaine qui me passionne, pour m'avoir fait confiance dans l'orientation de mon projet et surtout, pour m'avoir permis de développer une expertise dans la valorisation des résidus de la forêt boréale, dans le développement de nouveaux médicaments. Grâce à cette opportunité, j'ai pu découvrir une région accueillante et une université remplie de projets intéressants.

Ensuite, je souhaite remercier Pr André Pichette de m'avoir ouvert les portes de LASÈVE. Grâce à cette ouverture, j'ai pu suivre le processus de la cueillette, de l'isolation, de la purification et de la caractérisation de molécules issues des forêts du monde.

Dans un autre temps, je désire souligner l'implication du Laboratoire de pharmacognosie-homéopathie de l'Université Aix-Marseille II. Ce stage m'a permis d'améliorer mes connaissances dans le domaine de la pharmacognosie. Merci à Pr Évelyne Ollivier d'avoir partagé son expertise et son expérience avec moi. Même dans les moments difficiles, avec votre sourire, votre entregent et votre passion pour la science, vous avez été une inspiration pour moi.

Un merci tout spécial à Dr Doria Grimard, qui a permis le développement d'une collaboration entre l'UQAC et le CSSSC. Grâce à vous, j'ai pu obtenir les souches essentielles à mon projet. Sans votre soutien, ce projet n'aurait pu exister.

Dans un troisième temps, je tiens à remercier ceux qui ont été les bras et les mains de ce projet. Merci aux chimistes qui ont cordialement accepté de me confier leurs précieuses molécules (Patricia George, François Simard, Jonathan Nadeau). Un merci spécial à Jaune, tu as été le chêne sur lequel j'ai pu m'appuyer. Merci à mes coéquipiers de laboratoire d'avoir été disponibles et de m'avoir supportée dans les moments de surcharge (Catherine Dussault, Line Bouchard). Un merci particulier à Karl Lalancette pour les conseils de logistique et de statistique. Merci aussi à Pr Robert Loiselle pour m'avoir permis de réaliser mon rêve, enseigner. Finalement, merci à mes parents d'avoir été mes mentors. Et à mon mari d'être ce qu'il est. Sans vous, je ne serais pas où je suis aujourd'hui.

## TABLE DES MATIÈRES

1.	INTRODUCTION .....	1
1.1	Caractéristique générale de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.2	Cause et conséquence de l'infection par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.3	Mécanismes de la résistance bactérienne .....	4
1.4	Incidence et résistance aux antibiotiques.....	5
1.5	Caractéristiques des SARM.....	5
1.6	Problématique .....	6
1.7	Objectifs du projet de recherche .....	7
2.	REVUE DE LITTÉRATURE SUR <i>PINUS BANKSIANA LAMB</i> (PIN GRIS).....	8
2.1	Description et distribution .....	9
3.	ARTICLE 1.....	13
3.1	Résumé .....	14
3.2	Abstract.....	16
3.3	Introduction.....	17
3.4	Material and Methods .....	19
3.4.1	Plant material .....	19
3.4.2	Chemicals.....	19
3.4.3	Extraction and antibacterial-bioguided screening of extracts and fractions. ....	19
3.4.4	Identification of resinic acids using GC/MS Analysis.....	19
3.4.5	Isolation and identification of methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strains. ....	20
3.4.6	Antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method.....	20
3.4.7	Antibacterial activity measurement using microdilution method.....	21
3.5	Results and Discussion .....	22
3.5.1	Extraction of buds from <i>P. banksiana</i> , fractionation and evaluation of antibacterial activity against <i>S. aureus</i> and <i>E.coli</i> . ....	22
3.5.2	Chemical composition of bioactive fraction from hexane extract. ....	22
3.5.3	Isolation and characterisation of clinical isolates MRSA. ....	23

3.5.4 Evaluation of antibacterial activity of resin acids against MSSA and MRSA.....	24
3.5.5 Acknowledgments.....	34
3.5.6 References.....	35
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	38
5. RÉFÉRENCES .....	41

## TABLE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ASPC :	Agence de la santé publique du Canada
ATCC :	<i>American type culture collection</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
C-SARM :	Souche communautaire de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
CLSI :	<i>Clinical and Laboratorial Standards Institute</i>
PCSIN :	Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales
CSSSC :	Centre des services sociaux et santé de Chicoutimi
GISA :	<i>Glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus</i>
H-SARM :	Souche hospitalière de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
LPV :	Leucocidine de Panton-Valentine
MIC :	Concentration minimale inhibitrice
NTED :	<i>Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease</i>
REDD :	<i>Recalcitrant, Erythematous, Desquamating Disorder</i>
TSST-1 :	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Incidence totale de SARM pour 1 000 admissions hospitalières, par région <sup>3</sup> .....	2
Figure 2.1 <i>Pinus banksiana</i> L. – Distribution au Canada, branche, bourgeon et cône.....	9
Figure 3.1 Molecular structure of resinic acids isolated from bud of <i>P. banksiana</i> .....	26

**LISTE DES TABLEAUX**

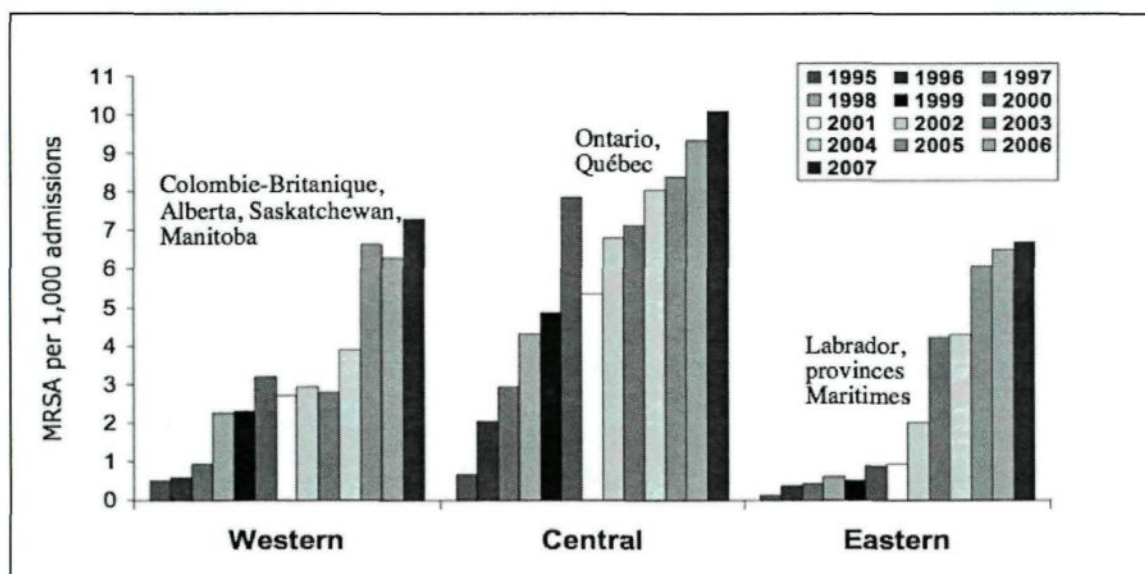
Tableau 2.1	Récapitulatif des molécules isolées à partir de <i>Pinus banksiana</i> répertoriées dans la littérature .....	11
Table 3.1	Extraction yield (dry) and antibacterial bioguided screening of extracts and fractions from buds of <i>Pinus banksiana</i> . .....	27
Table 3.2	Identification and source of clinical isolates <i>S. aureus</i> .....	28
Table 3.3	Antibiogram of clinical isolates MRSA using disk diffusion test with some classes of antibiotics including: $\beta$ -lactam (penicillin, amoxicillin/clavulanic acid), fluoroquinolone (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin), lincosamide (clindamycin), macrolide (erythromycin) and cephalosporin (cefoxitin) .....	29
Table 3.4	Antibiogram of clinical isolates MRSA using disk diffusion test with some classes of antibiotics including: oxazolidone (linezolid), sulfonamide (trimethoprim/sulfomethoxazole), rifamycin (rifampicin), aminoglycoside (gentamicin) and glycopeptide (vancomycin). .....	31
Table 3.5	Evaluation of antibacterial activity of resinic acids isolated from buds of <i>P. banksiana</i> against <i>S. aureus</i> and clinical isolates MRSA .....	33



## **1. INTRODUCTION**

La résistance des bactéries aux antibiotiques est sur le point de devenir un problème de santé publique majeur. L'utilisation massive des antibiotiques ainsi que leur mauvaise utilisation au début des années 80 ont contribué de façon significative à une amplification majeure et rapide du phénomène de résistance. Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est l'une des principales causes d'infection résistante en milieu hospitalier. Notons, par exemple, l'augmentation des cas de SARM qui étaient de moins de 3 % au début des années 80 et qui sont passés à 40 % dans plusieurs hôpitaux aux États-Unis et en Europe<sup>1-2</sup>. L'Agence de la santé publique du Canada (ASPC), responsable du Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PCSIN), rapporte une augmentation de 14 % de l'incidence des SARM dans les centres hospitaliers canadiens entre 2006-2007<sup>3</sup>. De plus, selon les chercheurs du PCSIN, la prévalence du SARM était 17 fois plus élevée en 2007 qu'en 1995 dans les hôpitaux du Canada (figure 1.1). Durant la même période, le nombre d'infections au SARM associées à des souches plus virulentes a aussi augmenté dans la communauté, jusqu'à devenir trois fois plus élevé en 2007 que 13 ans plus tôt<sup>3</sup>.

**Figure 1.1 Incidence totale de SARM pour 1 000 admissions hospitalières, par région<sup>3</sup>**



## 1.1 Caractéristique générale de *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif qui s'associent en amas ou par deux. On distingue près de 44 espèces différentes, classées par leurs génomes<sup>4</sup>. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), plus communément appelé staphylocoque doré, se différencie des autres staphylocoques par la présence d'une activité coagulase<sup>4</sup>. Cette enzyme induit la coagulation du plasma sanguin, favorisant ainsi l'infection. *S. aureus* est un germe très présent dans les infections communautaires et nosocomiales<sup>4</sup>. Chez l'humain, le site de colonisation préférentiel est la muqueuse nasale et la gorge<sup>5</sup>. En effet, près de 30 % des adultes sont porteurs de façon permanente et 50 % le sont de façon intermittente<sup>6</sup>. C'est à partir des sites de portage que *S. aureus* colonise les régions cutanées, plus particulièrement les zones souvent humides telles que les aisselles, le périnée et les mains<sup>6</sup>. La majorité de la transmission des bactéries s'effectue par contact direct. Cependant, il arrive parfois que l'infection se produise par un contact indirect, soit par l'entremise d'un vêtement ou de matériel médical.

## 1.2 Cause et conséquence de l'infection par *Staphylococcus aureus*

Une grande partie de la problématique associée aux infections par *S. aureus* est la production de toxines. Plusieurs pathologies sont d'ailleurs associées à l'infection, dont le syndrome du choc toxique, qui est provoqué par la diffusion de la toxine TSST-1 (*Toxic shock syndrome toxin*) dans l'organisme ou d'entérotoxine<sup>7</sup>. La forme clinique de ce syndrome est associée à une fièvre supérieure à 39 °C, une hypertension artérielle et une érythrodermie scarlatiniforme généralisée qui se termineront après 7 à 14 jours par une desquamation intensive. Dans 10 % des cas, le choc toxique provoque la mort du patient<sup>7</sup>. Mise à part cette forme classique, d'autres formes cliniques sont décrites, incluant : la scarlatine staphylococcique, le NTED (*Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease*) et le REDD syndrome (*Recalcitrant erythematous desquamating disorder*)<sup>7</sup>. Finalement, à cela s'ajoutent les intoxications alimentaires (produits laitiers, viande, etc.) causées par l'ingestion d'une toxine entérique produite par *S. aureus*<sup>7</sup>. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures), des crampes abdominales très douloureuses, des diarrhées, des vomissements et une absence de fièvre. Selon l'Agence de la santé publique du Canada, 15 % à 30 % des intoxications alimentaires seraient dues à *S. aureus*. Il existe aussi des

pathologies associées à la leucocidine de Panton-Valentine (LPV)<sup>8</sup>. Environ 3 % des souches de *S. aureus* produisent cette toxine<sup>8</sup>. Le nom de cette toxine lui a été attribué à cause de sa capacité à détruire les leucocytes<sup>9</sup>. Ce type d'infection est fréquent dans les cas d'infections cutanées à staphylocoques primitives, comme les pneumonies nécrosantes<sup>10</sup> et les furonculoses chroniques<sup>10</sup>. Les pneumonies nécrosantes sont précédées d'un syndrome infectieux à l'allure virale suivi d'une détresse respiratoire aiguë avec hémoptysies. Ce type d'infection se traduit par un taux de mortalité très élevé (75 % des cas)<sup>10</sup>. *S. aureus* est pernicieuse; il est donc important de s'assurer du contrôle de l'efficacité des traitements ainsi que de l'hygiène en milieu hospitalier.

### 1.3 Mécanismes de la résistance bactérienne

Il existe deux principaux types de résistance aux antibiotiques : naturelle ou acquise. En effet, des antibiotiques sont reconnus pour ne pas avoir d'effet sur certaines souches bactériennes; elles sont naturellement résistantes. À titre d'exemple, les *klebsielles* présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines (ampicilline et amoxicilline) et aux carboxypénicillines (ticarcilline)<sup>11</sup>. D'autre part, la résistance dite acquise peut être chromosomique ou plasmidique. La résistance chromosomique apparaît après une mutation du bagage génétique. Généralement, elle n'est pas provoquée par l'utilisation d'un antibiotique. Elle est habituellement spontanée et relativement rare. Dans 90 % des cas, la résistance acquise est plasmidique. En effet, elle est transmise par transfert du bagage génétique de plasmides lors de la conjugaison. Fréquemment, la résistance est croisée, c'est-à-dire que la résistance à un antibiotique est également efficace pour d'autres<sup>11</sup>. La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être induite par différents mécanismes. Dans certains cas, les bactéries diminuent leur perméabilité membranaire. Par exemple, 10 % des *Pseudomonas aeruginosa* présentent une résistance isolée à l'imipénème<sup>11</sup>. L'antibiotique peut également être inactivé par une modification de sa structure chimique. Par exemple, les pénicillinases sont reconnues pour cliver le cycle  $\beta$ -lactame de la pénicilline, l'empêchant ainsi de se lier à son site d'action<sup>12</sup>. Finalement, elles peuvent tout simplement expulser l'antibiotique grâce à des pompes protéiques transmembranaires, avant même qu'il atteigne le site de fixation.<sup>12</sup>

#### 1.4 Incidence et résistance aux antibiotiques

Une des caractéristiques principales des staphylocoques est leur aptitude remarquable à acquérir des résistances aux antibiotiques. Dans les années 1950 et 1960, l'utilisation abusive et incorrecte de la pénicilline pour traiter les infections aux staphylocoques dorés, a favorisé le développement des souches résistantes<sup>13</sup>. En 1959, l'arrivée des pénicillines semi-synthétiques (mécicilline et oxacilline) a permis de stabiliser le problème de la résistance, et ce, pour quelques années. Par contre, en 1961, des souches résistantes à ces antibiotiques sont apparues<sup>13,14</sup>. Au Canada, la première émergence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est apparue au début des années 1980<sup>15</sup>. Par conséquent, de 1995 à 2003, le taux d'infections a augmenté dans les hôpitaux canadiens de façon considérable. Il est passé de 0,25 à 1,61 par 1 000 admissions<sup>3,16</sup>. En 2005, selon le Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales, on pouvait estimer plus de 5 000 infections aux SARM seulement au Québec<sup>16</sup>. De plus, le même programme rapporte une augmentation du taux d'infections de 14 % entre 2005 à 2007. Près de 95 % des souches de SARM dites hospitalières sont résistantes à la pénicilline G (aminopénicillines, carboxypénicillines et uréidopénicillines)<sup>17</sup>. Pour ce qui est des souches de SARM communautaires, elles sont toujours, pour la plupart, sensibles à la pénicilline M (mécicilline et oxacilline), même si quelques-unes s'avèrent résistantes. Ces deux antibiotiques sont encore utilisés pour traiter ces souches. De plus, elles sont sensibles à la clindamycine et au triméthoprim/sulfaméthoxazole<sup>3</sup>

#### 1.5 Caractéristiques des SARM

Pour considérer *S. aureus* comme étant un SARM, il doit posséder plusieurs caractéristiques. Premièrement, il doit être Gram positif et capable d'oxyder le mannitol. Deuxièmement, il doit posséder une activité catalase et coagulase. Finalement, la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'oxacilline doit être supérieure ou égale à 4 mg/L<sup>16,17</sup>. Cet antibiotique, de la famille des  $\beta$ -lactamines, agit sur l'enzyme PBP (*penicillin binding protein*) qui permet la biosynthèse du peptidoglycane retrouvé chez les bactéries Gram positif comme *S. aureus*. En agissant sur cette protéine, l'antibiotique inhibe la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne<sup>18</sup>. La résistance des SARM à cet antibiotique est principalement due au gène MecA. Ce dernier code pour la

transpeptidase PBP2A (*penicillin binding protein 2A*). Les  $\beta$ -lactamines (ex. : pénicilline M) ont une affinité plus faible pour cette protéine, ce qui permet à la bactérie de synthétiser le peptidoglycane, malgré la présence de l'antibiotique<sup>19</sup>. Il est possible de distinguer deux types de SARM selon l'origine de l'infection : les souches hospitalières (SARM-H) et les souches communautaires (SARM-C). Pour la souche SARM-H, l'origine est nosocomiale. Cette souche est la plupart du temps impliquée dans les cas de pneumonies, infections post-opératoires et infections urinaires<sup>20</sup>. Les souches causant ce type d'infection sont souvent multirésistantes. Pour ce qui est des souches communautaires, elles se transmettent à l'extérieur des centres hospitaliers, par exemple, dans les prisons, dans les garderies pour enfants, dans l'armée, par les personnes qui prennent de la drogue ou encore lors de la pratique de sports de contact<sup>20</sup>.

## 1.6 Problématique

L'utilisation des glycoprotéines comme la vancomycine semblait être une solution durable pour contrer la problématique de la multirésistance. En 1997, plusieurs souches de *S. aureus* ont démontré une résistance aux glycoprotéines (*Glycoprotein Intermediate S. Aureus* ou GISA)<sup>21</sup>. Aujourd'hui, deux souches de SARM possédant le gène Van ont été isolées aux États-Unis, leur conférant une résistance à la vancomycine. Bientôt, la vancomycine pourrait ne plus être efficace pour traiter les infections aux SARM. Depuis 20 ans, seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques (oxazolidinone et lipopeptide) ont été approuvées par la *Food and Drug Association* (FDA)<sup>22</sup>. Les infections dues à la résistance aux antibiotiques sont sur le point de devenir un problème de santé publique majeure<sup>23</sup>. La recherche visant la découverte de nouveaux antibiotiques agissant contre les bactéries résistantes est un enjeu crucial. Les produits d'origine naturelle sont une source importante de nouveaux médicaments. En effet, plus de 60 % des antibiotiques utilisés en clinique sont des produits d'origine naturelle ou leurs dérivés<sup>22</sup>. La forêt boréale québécoise abrite plus de 3 000 espèces de plantes dont la plupart sont vascularisées<sup>24</sup>. La plupart n'ont jamais fait l'objet d'études approfondies sur leur propriété antibiotique, et ce, même si plusieurs d'entre elles ont été utilisées à ces fins par les Amérindiens. Parmi ces espèces, le pin gris (*Pinus banksiana*), en particulier ses bourgeons, n'a jamais été étudié. Le prochain chapitre présente une brève revue de littérature sur le pin gris, sa composition chimique et les activités biologiques rapportées.

## 1.7 Objectifs du projet de recherche

Le principal objectif de ce projet de recherche était d'identifier de nouveaux antibiotiques pour traiter les bactéries résistantes (SARM) à partir de la biomasse de la forêt boréale. Pour se faire, plusieurs objectifs spécifiques devaient être réalisés :

- 1) Développement d'une banque de SARM isolés cliniquement.
- 2) Évaluation de l'activité antibiotique d'extraits de bourgeons de *Pinus banksiana*.
- 3) Identification des molécules responsables de l'activité antibiotique.

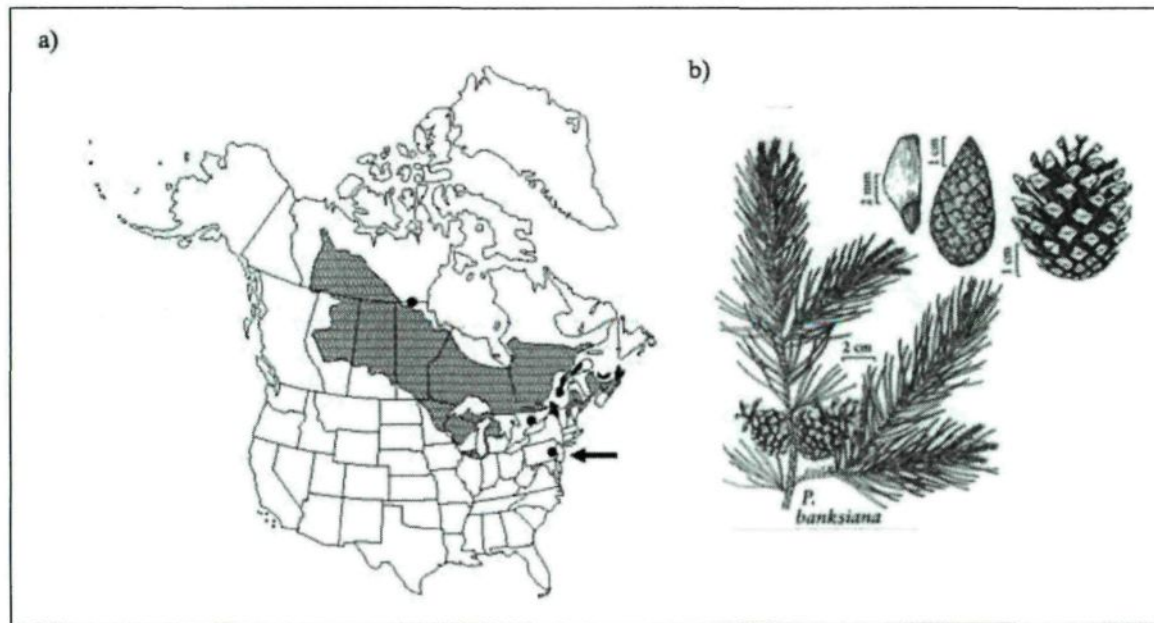
**2. REVUE DE LITTÉRATURE SUR *PINUS BANKSIANA LAMB*  
(PIN GRIS)**



## 2.1 Description et distribution

Le pin gris appartient au genre *Pinus* et se classe dans la famille des pinacées. Il se retrouve dans la forêt boréale, du Cap-Breton en Nouvelle-Écosse jusqu'à la rivière Mackenzie dans les Territoires du Nord-Ouest au Canada<sup>24</sup>.

**Figure 2.1** *Pinus banksiana* L. – Distribution au Canada, branche, bourgeon et cône



a) Distribution au Canada

b) Branche, bourgeon et cône

Image issue de l'ouvrage : *Flora of North America*. Vol. II, *Pinus banksiana*, Édition Flora of North America editorial committee, Oxford University press, New York

Ce conifère est de taille moyenne et il peut atteindre de 9 à 22 m. Il représente une des espèces les plus présentes sur le territoire à partir du 49<sup>e</sup> parallèle et il occupe une part importante dans la production forestière, surtout au nord du Québec<sup>25</sup>. Anciennement, on l'utilisait pour faire les mâts de bateaux à cause de ses tiges longues et droites. Aujourd'hui, on l'utilise encore pour cette propriété ainsi que pour fabriquer des poteaux électriques, des pilotis, du bois de mines, des traverses de chemin de fer, des panneaux, des échelles, des pagaies, des rames, des échafaudages et bien d'autres produits.

De plus, il est utilisé dans l'industrie des pâtes et papiers pour ses propriétés intrinsèques dans la fabrication des papiers couchés, des papiers hygiéniques, du papier journal et du carton<sup>25</sup>. Que ce soit dans l'industrie des pâtes et papiers ou dans celle du bois d'œuvre, les houppiers, les branchages et les écorces sont retirés de la fabrication des produits et brûlés pour en faire de l'énergie. Ce conifère, comme beaucoup d'autres plantes, est assujéti à de nombreuses prédatiions par les insectes ou les micro-organismes présents dans leur environnement. Chez les conifères, il a été démontré que les principales composantes chimiques leur attribuant une protection contre ces agressions proviennent de la production inductible d'oléorésine<sup>26</sup>. Dans ce mélange complexe de terpènes, on retrouve des diterpènes (C<sub>20</sub>), en particulier des acides résiniques tels que les acides abiétique, lévopimarique, palustrique, néoabiétique et déshydroabiétique<sup>26,27</sup>. D'autres molécules ont été isolées par différents chercheurs dans le passé, dont des mono-, sesqui- et triterpènes. Le tableau 1 illustre plusieurs exemples. Or, l'oléorésine du pin gris a été largement utilisée par les Amérindiens pour guérir les brûlures ou les plaies infectées<sup>28</sup>. Mais on reconnaît surtout le pin gris pour son implication célèbre dans la guérison de l'équipage de Jacques Cartier lors de son deuxième voyage en Amérique, à l'hiver 1536. Guidé par les Amérindiens, l'équipage avait préparé des mixtures d'aiguilles de pin gris pour guérir le scorbut<sup>29</sup>. De plus, certaines tribus ont, de façon traditionnelle, utilisé d'autres parties du pin gris. Les Cris se servaient d'écorces internes avec lesquelles ils préparaient des compresses pour soigner les plaies profondes. Il a aussi été noté que les Amérindiens du Potawatomi bouillaient les cônes de l'arbre pour en récolter la résine. Cet onguent avait plusieurs applications. De même, la fumée qui se dégageait des feux d'aiguilles était respirée pour décongestionner les poumons. Cette fumée servait à éveiller les malades d'un coma<sup>30</sup>. Récemment, ce sont les propriétés anticancéreuses de l'arbre qui ont été mises en évidence par le laboratoire LASÈVE. Les extraits hexanes du bois ont démontré une cytotoxicité intéressante contre une lignée de cellules causant le cancer du côlon, DLD-1. Par contre, à notre connaissance, dans la littérature, les bourgeons du pin gris n'ont jamais été étudiés pour leurs propriétés antibiotiques. Nous avons donc décidé d'en étudier la composition et les propriétés antibiotiques contre les infections résistantes (SARM).

**Tableau 2.1 Récapitulatif des molécules isolées à partir de *Pinus banksiana* répertoriées dans la littérature**

Nom	Famille	Partie	Référence
Acide oléique	Acide gras	Résine et bois	Tarr et Hibbert, 1931 <sup>31</sup>
Acide linoléique		Résine et bois	Tarr et Hibbert, 1931 <sup>31</sup>
Acide linoléique		Bois	Tarr et Hibbert, 1931 <sup>31</sup>
Acide lignocérique		Bois	Buchanan et al. 1959 <sup>32</sup>
Acide palmique		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Acide stéarique		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Pinocembrine	Flavanoïde	Bois	Erdtman, 1943 <sup>34</sup>
Pinobanksine		Bois	Erdtman, 1943 <sup>34</sup>
Quercétin		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
6-méthylquercétin		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
6-méthylmyricétin		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Catechol		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Vanillin		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Coniferin-E	Phénylpropane	Bois	Savidge, 1989 <sup>36</sup>
Acide ferrulique		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Pinosylvine	Stilbène	Bois	Lindstedt et Misiorny, 1951 <sup>38</sup>
Cis-monométhyl éther de pinosylvine		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Trans-monométhyl éther de pinosylvine		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Arabionose	Sucre	Bois	Hatton et Hunt, 1993 <sup>39</sup>
Xylose		Bois	Hatton et Hunt, 1993 <sup>39</sup>
Mannose		Bois	Hatton et Hunt, 1993 <sup>39</sup>
Galactose		Bois	Hatton et Hunt, 1993 <sup>39</sup>
Glucose		Bois	Hatton et Hunt, 1993 <sup>39</sup>
Acide malique	Autres métabolites	Aiguille	Sarkar et Malhotra, 1979 <sup>40</sup>
Acide quinique		Aiguille	Sarkar et Malhotra, 1979 <sup>40</sup>
Acide shikimique		Aiguille	Sarkar et Malhotra, 1979 <sup>40</sup>
Acide syringique		Aiguille	Sarkar et Malhotra, 1979 <sup>40</sup>
Acide benzoïque		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Glycérol		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
$\alpha$ -pinène	Monoterpène	Résine et bois	Tarr et Hibbert, 1931 <sup>31</sup>
L- $\beta$ -pinène		Résine et bois	Haagen-Smit et al., 1950 <sup>41</sup>
Camphène		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Myrcène		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Limonène		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
$\beta$ -pellandréne		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
$\gamma$ -terpinène		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Cis-p-Menthan-8-ol		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
$\alpha$ -terpinol		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>

Nom	Famille	Partie	Référence
Agathadiol	Diterpène	Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Toruloso		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
13-épitrorulosol		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Oxyde de manoyl		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
(+)-13-épimanoyl oxide		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
(-)-13-épimanoyl oxide		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Déhydroabiéto		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
18-norabiéta-8,11,13-trien-4-ol		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
19-norabiéta-8,11,13-trien-4-ol		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Pimaradiène		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
Isopimaradiène		Écorce	Rowe et al., 1971 <sup>35</sup>
δ-cadiène		Écorce	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
Déhydrojuvabione		Bois	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
Manool		Bois	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
z-abienol		Bois	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
Isoabienol		Bois	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
Neoabienol		Bois	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
Pimaral		Bois	Pichette et al., 1998 <sup>42</sup>
7-ketodéhydroabietol		Bois	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Acide abiétique	Acide résinique	Résine, bois, aiguille	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Acide pimarique		Résine et bois	Tarr et Hibbert, 1931 <sup>31</sup>
Acide sandaracopimarique		Bois et aiguille	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Acide isopimarique		Bois et aiguille	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Acide déhydroabiétique		Résine, bois, aiguille	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Acide 7-ketodéhydroabietique		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Acide néoabiétique		Bois et aiguille	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Acide 13-keto-8(14)podocarpen-18ique		Aiguille	Ikeda et al., 1977 <sup>43</sup>
Acide levopimarique		Aiguille	Ikeda et al., 1977 <sup>43</sup>
Acide palustrique		Aiguille	Ikeda et al., 1977 <sup>43</sup>
Phytosterol	Stérol	Résine et écorce	Tarr et Hibbert, 1931 <sup>31</sup>
Campesterol		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Dihydrocampesterol		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
β-sitosterol		Bois	Rudloff et Sato, 1963 <sup>33</sup>
Δ4-stigmastèn-3-one		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Δ4-campestèn-3-one		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Serraténediol	Triterpène	Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Episerraténediol		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Diepiserraténediol		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>
Episerraténediol-21monoéthyléther		Écorce	Bower et Rowe, 1967 <sup>37</sup>

### 3. ARTICLE 1

*Antibacterial Activity of Resinic acids isolated from buds of  
Pinus banksiana against a new clinical isolates of  
methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

### 3.1 Résumé

Les infections bactériennes multirésistantes sont devenues un problème de santé publique dans le monde entier. La prévalence de *Staphylococcus aureus* méticilline-résistant (SARM) est passée de moins de 3 % au début des années 80, à près de 40 % dans les années 2000, et ce, dans beaucoup d'hôpitaux des États-Unis et d'Europe. Le Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PC SIN) indique une augmentation de 14 % des incidences de SARM seulement en 2006-2007. Récemment, des souches de SARM résistants à la vancomycine ont été identifiées. Il est donc important de développer de nouveaux antibiotiques actifs contre ces bactéries. Au cours des 25 dernières années, 68 % des nouveaux antibiotiques découverts sont d'origine naturelle. Dans le cadre de ce travail, l'activité antibactérienne des extraits de bourgeons de *Pinus banksiana* a été examinée contre les SARM et *Escherichia coli*. Seul l'extrait à l'hexane, était actif contre *S. aureus* avec une  $IC_{50}$  de  $29 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ . L'analyse de la composition chimique de l'extrait à l'hexane, en utilisant la GC/MS, a permis d'identifier neuf acides résiniques, comprenant l'acide abiétique (1), néoabiétique (2), déhydroabiétique (3), abiét-8-énique (4), palustrique (5), pimarique (6), isopimarique (7), lévopimarique (8), et sandaracopimarique (9). L'activité antibactérienne des acides résiniques a été évaluée contre les staphylocoques sensibles à la méticilline et 35 isolats cliniques de SARM. La CMI a été déterminée selon la méthode de microdilution. Les résultats montrent que tous les acides résiniques examinés étaient actifs contre *S. aureus* sensible, avec une CMI entre 7,8 à 77  $\mu\text{M}$ , et contre les SARM, avec une CMI allant de 13 à 32  $\mu\text{M}$ .

*Antibacterial Activity of Resin acids from buds of  
Pinus banksiana against clinical isolates  
methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*

Marie-Eve Ouellette<sup>a</sup>, Patricia George<sup>a</sup>, André Pichette<sup>a</sup>,  
Doria Grimard<sup>b</sup> and Jean Legault<sup>a</sup>

<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

**Auteur-ressource :** Jean Legault, Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales.  
Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada, G7J 4R4  
Courriel : Jean\_Legault@uqac.ca

**Mots-clés :** *Pinus banksiana*, buds, resin acids, antibiotic, *S. aureus*, MRSA

### 3.2 Abstract

The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) increased from less than 3% in the early 1980s to rates as high as 40% in many hospitals in the United States and Europe. The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP) indicates an increase of 14% MRSA instance only in 2006-2007. Multi-resistant bacteria infection becomes the major public health problem worldwide. Since, vancomycin resistant MRSA were discovered in United States, its effectiveness is not guaranteed for the next years. Over the past 25 years, 68% of new antibiotics are from natural origin. Antibacterial activity of *Pinus banksiana* buds extracts was tested against *S. aureus* and *E. coli*. Only hexane extract was found active against *S. aureus* with an  $IC_{50}$  of  $29 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ . The analysis of chemical composition of hexane extract using GC-MS allowed to identify nine resinic acids including abietic acid, neoabietol, dehydroabietic acid, abiet-8-enic acid, palustric acid, pimaric acid, isopimaric acid, levopimaric acid, sandaracopimaric acid. Antibacterial activity of resinic acids was evaluated on methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and 35 clinical isolates MRSA. The MIC was determined using microdilution method. The results show that all resinic acids tested were active against MSSA with MIC ranging from 7.8 to 77  $\mu\text{M}$  and against MRSA with MIC ranging from 13 to 32  $\mu\text{M}$ .



### 3.3 Introduction

In North America, following the massive antibiotherapy that occurs in 1980's, resistance for certain antibiotics was developed. Thus, when time comes to treat an infection, serious problems happened. The sensitive bacteria were eliminated, but the resistant ones were selected. Among these organisms, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been found to have a major impact on patient care and have been responsible for numerous outbreaks in hospitals. The prevalence of MRSA increased from less than 3% in the early 1980s to rates as high as 40% in many hospitals in the United States and Europe<sup>1-4</sup>. The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP) indicates an increase of 14% MRSA instance only in 2006-2007<sup>2</sup>. Currently, approximately 95% of the strains are resistant to penicillin G (aminopenicillins, carboxypenicillins and ureidopenicillins)<sup>3</sup>. Whereas the Community strains are, in general, sensitive to the penicillin M (methicilline, oxacillin), but not nosocomials strains<sup>3</sup>. The glycopeptides remain generally active on MRSA-H<sup>5</sup>. Since 1997, stocks having sensitivity to the glycopeptides decreased, they are more commonly called GISA (Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*)<sup>5</sup>. Currently, the vancomycin, is the antibiotic of choice to treat the infections with MRSA-H. However, considering that several MRSA resistant to the vancomycin (VRSA) were discovered first in Japan (1996) and then in United States (1999), its effectiveness is perhaps not guaranteed for the next years<sup>6, 7</sup>. Since the resistant bacterial infections are in the process of becoming major public health problems the search for new active antibiotics against the resistant bacteria is a very important task<sup>5</sup>. In the past 25 years, 68% of antibacterial discovered are from natural origin<sup>9</sup>. Actually, only about fifty percent of plants were studied for their chemical composition and biological activities. Consequently, it is relevant to assess antibiotic activity from plant extracts and to isolate bioactive compounds.

*Pinus banksiana* (Jack Pine) is the most widely distributed pine species in Canada, from the Cape Breton Island in Nova Scotia up to the river Mackenzie in Territory of the Northwest<sup>8</sup>. *P. banksiana*, like others conifers, are subject to attacks by a wide range of pathogens as fungi and bacteria. The principal chemical and physical defence of conifers is made of inducible production of oleoresin<sup>10</sup> which possess antifungal and antibacterial activities. Moreover,

oleoresin was used by the first nation to healed infected wounds, boils and pyodermas<sup>11</sup>. Conifer buds contains also protective oleoresin. In this study, antibacterial activity of buds extracts from *P. banksiana* was evaluated for the first time against clinical isolates MRSA and some antibacterial compounds were identified.

### 3.4 Material and Methods

#### 3.4.1 Plant material

Buds of *Pinus banksiana* were collected in the boreal forest of Saguenay region, Québec, Canada, in May 2007. The specimen was identified by Patrick Nadeau (Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi). A voucher specimen (QFA-0540468) was deposited at the Herbarium Louis-Marie of Université Laval, Québec, Canada.

#### 3.4.2 Chemicals

Abietic acid were purchased from Sigma-Aldrich (purity 75%) and neoabietol, dehydroabietic acid, abiet-8-enic acid, palustric acid, pimaric acid, isopimaric acid, levopimaric acid and sandaracopimaric acid were purchased from Helix Biotech corporation (purity > 85%).

#### 3.4.3 Extraction and antibacterial-bioguided screening of extracts and fractions.

The air-dried buds of *Pinus banksiana* (1.6 kg) were reduced in powder before being successively extracted with hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH using a Soxhlet apparatus (5 L each for 48 h). Evaporation under reduced pressure, at a temperature not higher than 45°C, yielded a hexane extract (489 g), a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract (84 g) and a MeOH extract (166 g). The bioactive hexane extract was subjected to silica gel column chromatography using a gradient elution of Hexane-ethyl acetate (100:0, 95:5, 85:15, 70:30, 50:50) to give 7 fractions. Bioactive fraction 2 was analyzed by GC/MS.

#### 3.4.4 Identification of resinic acids using GC/MS Analysis

Bioactive fraction 2 was methylated with diazomethane as described by Schlenk and Gellerman, 1960<sup>12</sup>. Analyses by GC-MS were performed on a Agilent Technologies (Model 6890N) gas chromatograph, equipped with a DB-5 column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and coupled to a mass spectrometer (Model 5973 Network) equipped with an automatic injector (Model 7683 series). Helium was used as a carrier gas with a flow rate of 1 ml/min and the split ratio was 50:1. The injector temperature was 250°C with a MSD transfer line heater temperature of 280°C. The

oven temperature was set to 100°C for 2 min, then raised by 3°C/min to reach 280°C and then was left constant for 10 min. Identification of resinic acids was made on the basis of their retention indices on DB-5 columns<sup>13</sup> and their mass spectra, which were compared with resinic acids standard and reference data<sup>14</sup>.

#### **3.4.5 Isolation and identification of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains.**

From March 2007 to March 2008, 35 screening swabs from nares (n=31), throat (n=3), Groin pus (n=1) were obtained from patients hospitalized at Chicoutimi hospital. Identification of *S. aureus* was performed using the Slidex Staph-Kit (bioMerieux 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. In addition, *S. aureus* profile was determined with API Staph test strip with bacterial suspension of saline McFarland of 0.5 (bioMerieux, Durham, NC) according to the manufacturer's protocol. API Staph strips were held for 24 h before the results were read. A latex agglutination (SLIDEX) test detecting methicilin resistance in Staphylococci based on the production of low-affinity PBP2a, which is encoded by the *mecA* gene was performed on all strains (data not shown). An antibiogram was also performed to confirm the identification of MRSA strains using disk diffusion test.

#### **3.4.6 Antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method.**

The antimicrobial activity of different classes of antibiotics was determined by diffusion method (*Kirby-Bauer*) as described by NCCLS. The antibiotics tested 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/sulfomethoxazole (1.25/23.75 µg), rifampicin (5 µg), gentamicin (10 µg) and vancomycin (30 µg). The agar medium had pH 7.2 to 7.4 before inoculating potential MRSA. The antibiotics were maintained at 8°C or lower -14°C according to manufacturer's recommendations. The pure culture was inoculated on a non-selective plate for 18-24 h. Each colony was collected with a wire loop and transferred the growth to a tube containing 4 to 5 mL of a tryptic-soy broth. The inoculum density was standardized with BaSO<sub>4</sub> using 0.5 McFarland standard. All strains

were incubated at 37°C until it achieves or exceeds the turbidity of 0.5 McFarland standard. Inoculation of the dried surface (Muller-Hinton agar plate) by streaking the swab over the entire sterile agar surface. This procedure was repeated two more times. After 15 min, the appropriate disk were applied on the surface with a sterile forceps. The inverted plates was placed in a incubator at 37°C/air/16 to 18 h or 24 h for vancomycin. The inhibition zones were measured with a millimetric ruler. Interpretation of zone sizes by references of the manufacturer. Quality control organisms used were ATCC strains number 25923.

### 3.4.7 Antibacterial activity measurement using microdilution method

Antibacterial activity was evaluated using the microdilution method described by Banfi and al., 2003 with some modifications<sup>15</sup>. Briefly, exponentially growing bacteria were plated in 96-well flat bottom microplates (BD Falcon) at a density of  $5 \times 10^3$  gram-negative *E. coli* (ATCC 25922) or  $40 \times 10^3$  gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923) per well in 100  $\mu$ L nutrient broth (Difco). Increasing concentrations of tested compounds in methanol (Sigma-Aldrich) were then added (100  $\mu$ L per well). The final concentration of ethanol in the culture medium was maintained at 0.1% (v/v) to avoid solvent toxicity. The microplates were incubated for 6 h at 37°C. Absorbance was measured after 6 h and 24 h on an automated 96-well Varioskan plate reader plate reader (Thermo, Labsystems) using wavelengths of 660 nm for *S. aureus* and 600 nm for *E.coli*. The results were expressed as concentration inhibiting fifty percent (IC<sub>50</sub>) of bacteria growth for the extracts and fractions and as the minimal inhibitory concentration (MIC<sub>90</sub>) which inhibits 90% of bacterial growth for resinic acids. Four antibiotics including rifampicin, cefoxitin, amoxicillin and levofloxacin were used as positive control on *S. aureus* ATCC 25923 and on 35 MRSA strains.

### 3.5 Results and Discussion

#### 3.5.1 Extraction of buds from *P. banksiana*, fractionation and evaluation of antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*.

The principal objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of buds from *P. banksiana*. The buds were successively extracted with respectively hexane, dichloromethane and methanol. Three extracts were obtained with an extraction yield of 31% for hexane, 5% for dichloromethane and 10% for methanol. The antibacterial activity of each fraction of hexane extract was evaluated against gram-positive *S. aureus* and gram-negative *E. coli*. Gentamicin was used as positive control with an  $IC_{50}$  of  $0.012 \pm 0.002$   $\mu\text{g/ml}$  against *S. aureus* and  $0.030 \pm 0.003$   $\mu\text{g/ml}$  against *E. coli*. The results presented in Table 1 showed that all extracts were not active against *E. coli* with  $IC_{50} > 50$   $\mu\text{g/ml}$ . Hexane extract was found active against *S. aureus* with  $IC_{50}$  of  $29 \pm 3$   $\mu\text{g/ml}$  while dichloromethane and methanol extracts were inactive ( $IC_{50} > 50$   $\mu\text{g/ml}$ ). Therefore, hexane extract was fractionated using chromatographic column in order to identify compounds responsible of the antibacterial activity. Seven fractions were obtained and tested against both bacterial strains. Unsurprisingly, all fractions were not active against *E. coli*. The results showed that fractions 1, 5, 6 and 7 were not active ( $IC_{50} > 50$   $\mu\text{g/ml}$ ). In contrast, fractions 2, 3 and 4 were active against *S. aureus* with  $IC_{50}$  of  $25 \pm 5$ ,  $13 \pm 7$  and  $50 \pm 7$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The antibacterial activity of fractions 2 and 3 was not significantly different but both fractions were found more active than fraction 4. Consequently, the chemical composition of fraction 2 was determined.

#### 3.5.2 Chemical composition of bioactive fraction from hexane extract.

Chemical composition of bioactive fraction 2 was analysed by GC/MS. Fraction 2 was methylated with diazomethane as described in material and methods. Identification of resin acids was made on the basis of their retention indices on DB-5 columns<sup>13</sup> and their mass spectra, which were compared with resin acids standard and reference data<sup>14</sup>. As presented in the Figure 1, nine resin acids were identified in fraction 2 including abietic acid (1), neoabietol (2), dehydroabietic acid (3), abiet-8-enic acid (4), palustric acid (5), pimaric acid (6), isopimaric acid (7), levopimaric

acid (8) and sandaracopimaric acid (9). Diterpenoid resin acids are important component of conifer oleoresin which are involved against herbivore and pathogen attack<sup>16</sup>. To the best of our knowledge, this is the first time that these known resin acids are found in buds of *P. banksiana*. However, resin acids 2, 3, 5 and 8 were found in needles of *P. banksiana*<sup>17</sup>. Moreover, at the exception of resin acid 4, all other compounds have already been identified in pine cones from *Pinus contorta*, *Pinus jeffreyi*, *Pinus lambertiana* and *Pinus sylvestris*<sup>18</sup>. However, it is important to mention that conifer buds are poorly studied. But, the presence of flavanoids was reported in buds of some *Pinus* species<sup>19</sup>. Interestingly, isopimaric acid (7) from *Pinus nigra* shows antibacterial activity against MRSA<sup>20</sup>. Consequently, we set up a bank of MRSA isolated in clinical in order to evaluate antibacterial activity of resin acids isolated from *P. banksiana* bud's.

### 3.5.3 Isolation and characterisation of clinical isolates MRSA.

Thirty-five bacterial strain isolated from nares (n=31), throat (n=3) and groin pus (n=1) were obtained from patients hospitalized at Chicoutimi hospital. The bacterial strains were characterised using Slidex Staph kit and Api Staph. In Table 2, the results obtained with Slidex Staph-Kit indicate that all isolates bacterial strains were *S. aureus*. Moreover, Api Staphprofiles allow to identify two different type of *S. aureus* strains as 6736153 and 6736113 with probability of 97.8% and 86.7%, respectively. The methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923 was identified as a 6736153 strain. A latex agglutination test for PBP2a protein encoding for *mecA* resistant gene shows that all bacterial strains isolated are MRSA (data not shown). An antibiogram on MSSA control and thirty-five clinical isolates MRSA strains was also performed with various classes of antibiotics including:  $\beta$ -lactam (penicillin, amoxicillin/clavulanic acid), fluoroquinolone (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin), lincosamide (clindamycin), macrolide (erythromycin), cephalosporin (cefoxitin), oxazolidone (linezolid), sulfonamide (trimethoprim/sulfomethoxazole), rifamycin (rifampicin), aminoglycoside (gentamicin) and glycopeptide (vancomycin). The results, presented in Table 3 and 4, indicate that MSSA (ATCC 25923) is sensitive to all antibiotics tested except levofloxacin. In Table 3, the results show that 77% of MRSA are resistant to penicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, clindamycin, erythromycin and cefoxitin. Interestingly, three MRSA are sensitive to fluoroquinolone

antibiotics (08-U-0194, 08-U-0204, 08-U-0209). The results presented in Table 4 indicate that 88.5% of MRSA are sensitive to linezolid, TMP/SMX, rifampicin and gentamicin. For vancomycin, 65.7% of MRSA are sensitive and 34.3% are intermediate. Overall, this profile of antibiogram is similar to the typical phenotype of endemic MRSA strains reported by Grüner et al., 2007<sup>21</sup>.

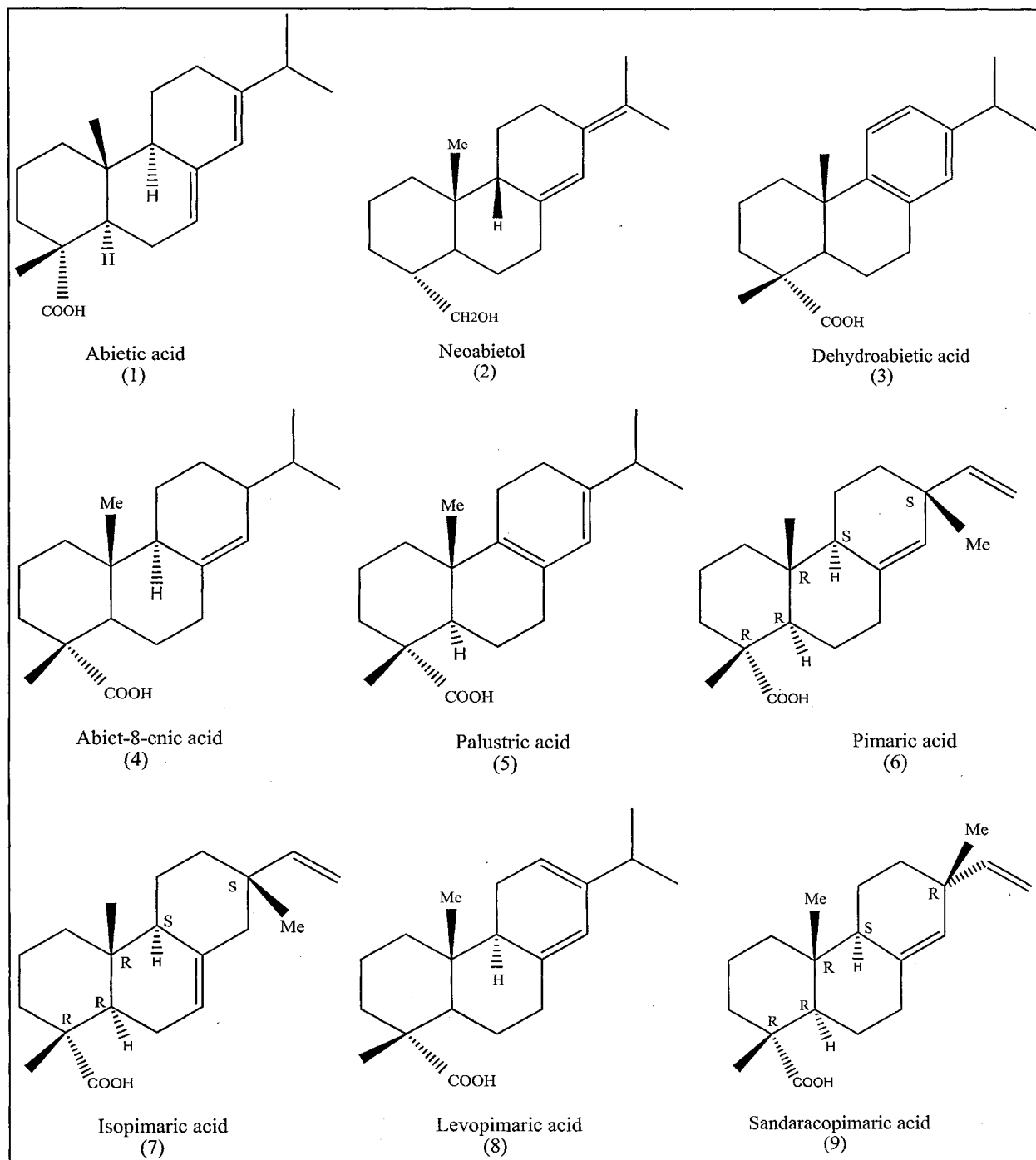
#### 3.5.4 Evaluation of antibacterial activity of resin acids against MSSA and MRSA.

Antibacterial activity of resin acids (**1-9**) from *P. banksiana* was assessed against MSSA and MRSA. Microdilution method was used instead of diffusion disk method because the resin acids diffuse poorly through Muller-Hinton agar plate. Rifampicin, cefotaxim amoxicillin and levofloxacin were used as positive control. The results presented in Table 5 show that MSSA is sensitive to cefotaxim ( $MIC_{90}$ ;  $1.0 \pm 0.3 \mu M$ ), amoxicillin ( $MIC_{90}$ ;  $0.5 \pm 0.2 \mu M$ ) and levofloxacin ( $MIC_{90}$ ;  $0.5 \pm 0.4 \mu M$ ) but the sensitivity is intermediate for rifampicin ( $MIC_{90}$ ;  $3.1 \pm 0.5 \mu M$ ). In contrast, MRSA are found resistant to rifampicin ( $MIC_{90} > 12.5 \mu M$ ), amoxicillin ( $MIC_{90} > 62.5 \mu M$ ) and levofloxacin ( $MIC_{90} > 62.5 \mu M$ ). However, the sensitivity of MRSA is intermediate to resistant for cefotaxim ( $MIC_{90} > 62.5 \mu M$ ). These results support the antibiogram obtained with diffusion disk method (Table 3 and 4). The cytotoxicity of resin acids were evaluated on human skin fibroblasts, WS1. The results indicated that all resin acids are not cytotoxic and do not inhibit the growth of cultured cells (data not shown). In contrast, Söderberg et al. (1996) reported that dehydroabietic acid (**3**) was toxic on human epithelial and fibroblasts cells<sup>22</sup>. The  $MIC_{90}$  of resin acids (**1-9**) was determined on MSSA and MRSA. The results show that all resin acids are active against MSSA and MRSA with  $MIC_{90}$  ranging from 7.8 to 77  $\mu M$  for MSSA and 13 to 32  $\mu M$  for MRSA, respectively. Resin acid **4** and **8** possess higher activity against MSSA with 7.8 and 8.3  $\mu M$  while compounds **1**, **3**, **7** and **8** are most active against MRSA with  $MIC_{90}$  ranging from 13 to 19  $\mu M$ . The antibacterial activity of compound **1** was previously reported against *S. aureus* by Himejima et al., 1992<sup>23</sup> and compound **7** against MRSA by Smith et al., 2005<sup>20</sup>. Moreover, some dehydroabietic derivatives were also found active against *S. aureus*<sup>24</sup>. These results are reviewed by Savluchinske-Feio et al., 2006<sup>25</sup>. To our knowledge, this is the first time that the antibacterial activity of resin acids is reported against MRSA, except for **7**. On the other hand, for resin acid **2**, **5**, **7**, **9**, no significant difference was



found between the sensitivity of MSSA and MRSA. Surprisingly, resin acids **1** and **3** are more active against MRSA (MIC<sub>90</sub> of 13 and 14  $\mu$ M, respectively) in comparison with MSSA (MIC<sub>90</sub> of 77 and 46  $\mu$ M, respectively).

In conclusion, hexane extract from buds of *P. banksiana* was found active against *S. aureus*. Nine resinic acids were identified and their antibacterial activity was tested. All resinic acids were found active against MSSA and clinical isolates MRSA.

**Figure 3.1** Molecular structure of resinic acids isolated from bud of *P. banksiana*

**Table 3.1** Extraction yield (dry) and antibacterial bioguided screening of extracts and fractions from buds of *Pinus banksiana*.

Extracts and fractions	Extraction yield (% w/w)	IC <sub>50</sub> (µg/ml ± SD) <sup>a,b</sup>	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Hexane extract	31%	29 ± 3	> 50 <sup>f</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	5%	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>f</sup>
MeOH extract	10%	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 1	Nd	>50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 2	Nd	25 ± 5	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 3	Nd	13 ± 7	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 4	Nd	50 ± 2	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 5	Nd	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 6	Nd	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Fraction 7	Nd	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Gentamicin <sup>e</sup>	(-)	0.012 ± 0.002	0.030 ± 0.003

Nd: not determined.

<sup>a</sup> Data represent mean values (± standard deviation) for three independent experiments.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub>: concentration inhibiting 50% of bacterial growth.

<sup>c</sup> *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

<sup>d</sup> *Escherichia coli* ATCC 25922.

<sup>e</sup> Positive control.

<sup>f</sup> Extract having an IC<sub>50</sub> >50 µg/ml are considered as inactive.

Table 3.2 Identification and source of clinical isolates *S. aureus*

Strains number	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(bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.)<sup>c</sup> API Staph test strip (bioMerieux, Durham, NC)

**Table 3.3** Antibiogram of clinical isolates MRSA using disk diffusion test with some classes of antibiotics including:  $\beta$ -lactam (penicillin, amoxicillin/clavulanic acid), fluoroquinolone (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin), lincosamide (clindamycin), macrolide (erythromycin) and cephalosporin (cefoxitin)

Strains number	Penicillin <sup>a</sup>	Amox /Clav <sup>b</sup>	Cipro <sup>c</sup>	Moxi <sup>d</sup>	Levo <sup>e</sup>	Clinda <sup>f</sup>	Erythro <sup>g</sup>	Cefox <sup>h</sup>
08-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)

Strains number	Penicillin <sup>a</sup>	Amox /Clav <sup>b</sup>	Cipro <sup>c</sup>	Moxi <sup>d</sup>	Levo <sup>e</sup>	Clinda <sup>f</sup>	Erythro <sup>g</sup>	Cefox <sup>h</sup>
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)  $\leq 28$ ; susceptible (S)  $\geq 29$

<sup>b</sup> Amoxicillin/clavulanic acid (20/10  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 19$ ; susceptible (S)  $\geq 20$

<sup>c</sup> Ciprofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 15$ ; intermediate (I) 16-20; susceptible (S)  $\geq 21$

<sup>d</sup> Moxifloxacin (5  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 20$ ; intermediate (I) 21-23; susceptible (S)  $\geq 24$

<sup>e</sup> Levofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 15$ ; intermediate (I) 16-18; susceptible (S)  $\geq 19$

<sup>f</sup> Clindamycin (2  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 14$ ; intermediate (I) 15-16; susceptible (S)  $\geq 17$

<sup>g</sup> Erythromycin (15  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 13$ ; intermediate (I) 14-22; susceptible (S)  $\geq 23$

<sup>h</sup> Cefoxitin (30  $\mu\text{g}$ ) : resistant (R)  $\leq 21$ ; susceptible (S)  $\geq 22$

**Table 3.4** Antibiogram of clinical isolates MRSA using disk diffusion test with some classes of antibiotics including: oxazolidone (linezolid), sulfonamide (trimethoprim/sulfomethoxazole), rifamycin (rifampicin), aminoglycoside (gentamicin) and glycopeptide (vancomycin).

Strains number	Linezolid <sup>a</sup>	TMP/SMX <sup>b</sup>	Rifampicin <sup>c</sup>	Gentamicin <sup>d</sup>	Vancomycin <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)

Strains number	Linezolid <sup>a</sup>	TMP/SMX <sup>b</sup>	Rifampicin <sup>c</sup>	Gentamicin <sup>d</sup>	Vancomycin <sup>e</sup>
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



**Table 3.5 Evaluation of antibacterial activity of resinic acids isolated from buds of *P. banksiana* against *S. aureus* and clinical isolates MRSA**

Antibiotic/Compounds	MSSA <sup>c</sup> MIC <sub>90</sub> (μM) <sup>a,b</sup>	MRSA <sup>d</sup> MIC <sub>90</sub> (μM) <sup>a,b,c</sup>
Abietic acid (1)	77 ± 6	13 ± 3
Neoabietol (2)	16.5 ± 0.3	20 ± 4
Dehydroabietic acid (3)	46 ± 3	14 ± 2
Abiet-8-enic acid (4)	7.8 ± 0.6	26 ± 3
Palustric acid (5)	35 ± 3	32 ± 3
Pimaric acid (6)	14 ± 1	28 ± 4
Isopimaric acid (7)	14 ± 2	19 ± 7
Levopimaric acid (8)	8.9 ± 0.3	21 ± 1
Sandaracopimaric acid (9)	16 ± 2	13 ± 3
Rifampicin	3.1 ± 0.5(I) <sup>f</sup>	> 12.5 (R) <sup>f</sup>
Cefoxitin	1.0 ± 0.3 (S) <sup>g</sup>	> 62.5 (I) <sup>g</sup>
Amoxicillin	0.5 ± 0.2 (S) <sup>h</sup>	> 62.5 (R) <sup>h</sup>
Levofloxacin	0.5 ± 0.4 (S) <sup>i</sup>	> 62.5 (R) <sup>i</sup>

<sup>a</sup>Data represent mean values (± standard deviation) for three independent experiments.

<sup>b</sup>MIC<sub>90</sub> : concentration inhibiting 90% of bacterial proliferation.

<sup>c</sup>Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

<sup>d</sup>Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

<sup>e</sup>Means of 35 clinical isolates MRSA

<sup>f</sup>Rifampicin MIC (μM): susceptible (S) ≤1; intermediate (I) 2-4; resistant (R) ≥5

<sup>g</sup>Cefoxitin MIC (μM): susceptible (S) ≤19; intermediate (I) 20-74; resistant (R) ≥75

<sup>h</sup>Amoxicillin MIC (μM): susceptible (S) ≤11; resistant (R) ≥22

<sup>i</sup>Levofloxacin (μM): MIC (μM) : susceptible (S) ≤6; intermediate (I) 7-21; resistant (R) ≥22

### **3.5.5 Acknowledgments**

The authors would like to thank Catherine Dussault, Line Poisson and Sandra Bouchard for technical assistance. This work was supported by the Fonds de la recherche forestière du Saguenay-Lac-Saint-Jean and the Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

### 3.5.6 References

- (1) Boyce, J.M., Causey, W.A., 1982. Increasing occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infect Control*;3:377–83.
- (2) Simon, A.E., Gravel, D., McGreer, A., Bryce, E., Loeb, M. et Mulvey, M., 2005. Surveillance for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Patients Hospitalized in Canadian Acute-Care Hospitals. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *Canada Communicable Disease Report (CCDR)*, 31-03: 33-40.
- (3) Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 7687–7692.
- (4) Voss, A., Milatovic, D., Wallrauch-Schwarz, C., Rosdahl, V.T., Braveny, I., 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J.Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 13:50–55.
- (5) Canada Communicable Disease Report, 2007. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals—a report update from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. *Can. Commun. Dis. Rep.* 31–02:33–40.
- (6) Smith, T.L., Pearson, M.L., Wilcox, K.R., 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 340: 493–501.
- (7) Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C., 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J.Antimicrob. Chemother.*40:135–136.
- (8) Rudolph, T.D., Laidly, P.R., 1990. *Silvic of North America: Vol. 1: Conifers: Jack Pine*. Agriculture Handbook 654. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC, pp 280-293.

- (9) Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Naturel products as source of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461–477.
- (10) Croteau, R., Johnson, M.A., année. Biosynthesis of terpenoid of wood extractives. In: *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. pp 379–439.
- (11) San Feliciano and al., année. Abiatane acids: source, biological activities and therapeutic uses. *Planta Med.* 5:485–490.
- (12) Schlenk, H., Gellerman, J.L., 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Anal. Chem.* 32: 1412–1414.
- (13) Kovats, E., 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* 1: 229–247.
- (14) Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4<sup>th</sup> Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream: Illinois, USA, 804 p.
- (15) Banfi, E., Scialino, G., Monti-Bragadin, C., 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J. Antimicrob. Chemmother.* 52: 796–800.
- (16) Keeling, C.I., Bohlmann, J., 2006. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry.* 67: 2415–2423.
- (17) Schuh, B.A., Benjamin, D.M., 1984. The chemical feeding ecology of *Neodipriondubiosus* schedl, *N. rugifrons* midd., and *N. lecontei* (Fitch) on jack pine (*Pinus banksiana* lamb.). *Journal of chemical ecology.*10: 1071–1079.
- (18) Micales, J.A., Han, J.S., Davis, J.L., Young, R.A., 1994. Chemical composition and fungitoxic activities of pine cone extractive. *Biodeterioration Research* 4, Edited by Llewellyn GC, Dashek WV, O’Rear CE, Plenum Press, NewYork, pp 317-332.
- (19) Sliemstad, R., 2003. Flavanoids in buds and young needles of *Picea*, *Pinus* and *Abies*. *Biochemical Systematics and Ecology.* 31: 1247–1255.

- (20) 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: 538–542.
- (21) Grüner, B.M., Han, S.R., Meyer, H.G., Wulf, U., Bhaki, S., Siegel, E.K., 2007. Characterization of a catalase-negative methicillin-resistant staphylococcus aureus strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2684-2685.
- (22) Söderberg, T.A., Johansson, A., Gref, R., 1996. Toxic effects of some resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology*. 107: 99–109.
- (23) Himejima, M., Hobson, K.R., Otsuka, T., Wood, D.L., Kubo, I., 1992. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: A defense mechanism against microbial invasion. *Journal of Chemical Ecology*. 18: 1809–1818.
- (24) Gigante, B., Silva, A.M., Curto, M.M.J., Savluchinske-Feio, S., Roseiro, J.C., Reis, V.R., 2002. Structural effects on the bioactivity of dehydroabietic acid derivatives. *Planta Med*. 68: 680–684.
- (25) Savluchinske-Feio, S., Curo, M.J.M., Gigante, B., Roseiro, J.C., 2006. Antimicrobial activity of resin acid derivatives. *Appl. Microbiol Biothechnol*. 72: 430–436.

## **4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'objectif de ce projet était de d'identifier de nouveaux antibiotiques contre les bactéries résistantes à partir de la biomasse de la forêt boréale. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons isolé et caractérisé une banque de SARM et évalué l'activité antibiotique de plusieurs extraits et fractions de bourgeons de *Pinus banksiana*. Trois extractions successives, hexane (31 %), dichlorométhane (5 %) et méthanol (10 %) ont été effectuées. Ces trois fractions ont été testées pour leur propriété antibiotique (*E.coli* et *S. aureus*). Seule la fraction hexane a été trouvée active ( $29 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ ). C'est cet extrait qui a été fractionné et qui a permis l'isolation de neuf acides résiniques : l'acide abiétique (1), néoabiétique (2), déhydroabiétique (3), abiét-8-énique (4), palustrique (5), pimarique (6), isopimarique (7), lévopimarique (8), sandaracopimarique (9). Ces acides résiniques présentes dans l'oléorésine sont impliqués dans la réponse des conifères aux attaques des pathogènes<sup>44</sup>.

Même si la plupart de ces acides résiniques (sauf 4) ont déjà été retrouvés dans les cônes de plusieurs autres espèces de *Pinus*<sup>45</sup>, les bourgeons, sont très peu étudiés. Pour tester ces acides résiniques, nous avons isolé 35 SARM provenant de patients hospitalisés à l'hôpital de Chicoutimi. Les souches ont été caractérisées et différentes classes d'antibiotiques ont été testées pour permettre une comparaison avec les acides résiniques isolés, provenant du pin gris. Les résultats des antibiogrammes effectués ont révélé que 77 % des SARM étaient résistants à la pénicilline, amoxicilline/acide clavulanique, ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine, clindamycine, érythromycine et céfoxitine. En opposition, 89 % des SARM ont démontré une sensibilité au linzolid, au TMP/SMX, à la rifampicine et à la gentamicine. Pour ce qui est de la vancomycine, 66 % des SARM y étaient sensibles, alors que 34 % se trouvaient dans la zone intermédiaire. De façon générale, le profil des souches isolées a démontré un phénotype endémique similaire à celui reporté par *Grüner et al.*, 2007<sup>46</sup>. Ces résultats confirment un besoin urgent de développer de nouveaux antibiotiques puisque l'efficacité de ceux disponibles s'amointrit dangereusement.

L'activité antibiotique des acides résiniques a été évaluée avec la méthode de microdilution. Les résultats ont montré que tous les acides résiniques étaient actifs contre les SARM avec une CMI entre 13 et 32  $\mu\text{M}$ . Un contrôle MSSA a été utilisé. Celui-ci s'est avéré sensible aux acides résiniques avec une CMI entre 7,8 et 77  $\mu\text{M}$ . Les acides résiniques (4) et (8) étaient plus actifs sur

les SASM que sur les SARM, alors que les acides résiniques (1), (3) et (7) étaient plus actifs sur les SARM que sur SASM. Dans la littérature, *Savluchinske-Feio et al.* (2006) avait déjà répertorié l'activité antibiotique du composé (1) et (7) contre *S. aureus*<sup>47</sup>. Chacun des acides résiniques a été testé sur des fibroblastes humains (WS-1) et n'a démontré aucune cytotoxicité. Ces résultats s'opposent à *Söderberg et al.* (1996) qui avait reporté que l'acide déhydroabiétique (3) était toxique pour les fibroblastes humains ainsi que pour les cellules épithéliales<sup>48</sup>. Au meilleur de nos connaissances, c'était la première fois que l'activité antibiotique des acides résiniques était testée sur les SARM, sauf pour le composé (7). Il semble donc que l'utilisation de cette plante par les communautés amérindiennes pour guérir les plaies infectées soit bel et bien fondée.

Dans le même ordre d'idée, il serait pertinent d'évaluer l'activité des composés isolés sur d'autres lignées bactériennes causant aussi de graves problèmes dans les centres hospitaliers, comme les *ERV* (entérocoque résistant à la vancomycine) *Bacillus subtilis*, *Clostridium difficile* et *Salmonella typhimurium*.



## **5. RÉFÉRENCES**

- (1) Boyce, J.M., Causey, W.A., 1982. Increasing occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infect Control*. 3: 377–383.
- (2) Voss, A., Milatovic, D., Wallrauch-Schwarz, C., Rosdahl, V.T., Braveny, I., 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 13: 50–55.
- (3) Magilner, D., Moses Byerly M., M.Cline D., 2008. The Prevalence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (CA-MRSA) in Skin Abscesses. *NC Med J*. 69 : 352-354
- (4) Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*. Édition Boeck p.528 à 530.
- (5) Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 10: 505–520.
- (6) Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C. et al., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 5: 751–762.
- (7) Honeyman, A., Friedman, H. and Bendinelli, M., 2001. *Staphylococcus Aureus* Infection and Disease. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 335 p.
- (8) Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Involvement of Pantone- Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*, 29: 1128–1132.
- (9) Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer Jand Nizet, V., 2005. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *Journal of experimental medicine*. 202 : 209-215.
- (10) Bureau de la sécurité des laboratoire (ASPC), Agence Santé Publique du Canada, 2011. Fiches techniques santé/sécurité (FTSS) - *Staphylococcus aureus*, 3 p.

- (11) Jupeau-Vessières, A.M. et Scavizzi, M.R., 1994. Évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques E.M.C. Maladies infectieuses. EncyclMédChir., Paris : Éditions Techniques, 8-006-0-10, 16 p.
- (12) Nauciel. C. et Vildé, J.L., 2005. Bactériologie médicale, Édition Masson Paris, p. 20 à 23.
- (13) Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 : 7687-7692.
- (14) Jevons, M.P., 1961. Celbenin-resistant staphylococci. Br. Med. J. 1: 124-125.
- (15) Simor, A.E., Ofner-Agostini, M., Bryce, E., Green, K., McGeer, A., Mulvey, M., Paton, S. and the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada, 2001. The evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals: 5 years of national surveillance. CMAJ. 165: 21-26
- (16) Simor, A.E., Ofner-Agostini, M., Gravel, D., Varia, M., Paton, S., McGeer, A., Bryce, E., Loeb, M. et Mulvey, M., 2005. Surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcal aureus* in Canadian hospitals – a report update from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Canadian Communicable Disease Reports. 31: 33-40.
- (17) Neu, H.C., 1992. The Crisis in Antibiotic Resistance. Science. 257: 1064-1073.
- (18) Smith, P.F. and Wilkinson, B.J., 1981. Differential methicillin susceptibilities of peptidoglycan synthetases in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology. 148: 610-617.
- (19) Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. Microbiologie. Édition Boeck, p.807.
- (20) Agence de la santé publique du Canada, 2008. Fiche de renseignements - *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) d'origine communautaire, 3 p.
- (21) K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri and F. C. Tenover. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 40 :135–136.

- (22) Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Naturel products as source of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461–477.
- (23) Canada Communicable Disease Report, 2007. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals—a report update from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. *Can Commun Dis Rep* 31–02:33–40.
- (24) Marie-Victorin, 1995. Flore Laurentienne. 3<sup>e</sup> Edition, Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 1093 pages. (Édition originale parue en 1935).
- (25) Zhang, S.Y., Koubaa, A., 2009. Les résineux de l'Est du Canada: Écologie forestière, caractéristiques, transformation et usages. In: FPIInnovations (Ed.), Publication spéciale - SP-526E. FPIInnovations-Forintek division, Québec, 377 p.
- (26) Savluchinske-Feio, S., Curto, M.J.M., Gigante, B. et Roseiro, J.C., 2006. Antimicrobial activity of resin acid derivatives. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 72: 430-436.
- (27) Croteau, R. et Johnson, M.A., 1985. Biosynthesis of terpenoid of wood extractives. In: Higuichi, T. (ed), Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Orlando, p. 379-439.
- (28) San Feliciano, A., Gordaliza, M., Salinero, M.A. et Miguel del Corral, J.M., 1993. Abiataneacids: source, biological activities and therapeutic uses. *Planta Med.* 5: 485-490.
- (29) Durzan, D.J., 2009. Arginine, scurvy and Cartier's "tree of life". *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5:1-16.
- (30) Moerman, D., 1998. Native american ethnobotany. N.R. Pharm. Technol, Timber press, Oregon, Farnsworth, 927 p.
- (31) Tarr, H.L.A. and Hibbert, H., *Canad. J. Research*, 1931,5~414.
- (32) Buchanan, M. A., R. V. Sinnett, and J. A. Jappe. 1959. The fatty acids of some American pulpwoods. *Tappi.* 42 : 578-583.
- (33) Rudloff, E., Sato, A., 1963. The Heartwood extractives of *Pinus banksiana Lamb.* *Canadian Journal of Chemistry.* 41: 2165-2174.

- (34) Erdtman, H., 1943. Svensk Papperstidn, 46 : 226-229.
- (35) Rowe, J.W., Nagasampagi, B.A., Burgstahler, A.W., Fitzsimmons, J.W., 1971. Derivatives of nordehydroabietane from pine bark. *Phytochemistry*. 10: 1647-1651.
- (36) Savidge, R.A., 1989. Coniferin, a biochemical indicator of commitment to tracheid differentiation in conifers. *Canadian Journal of Botany*. 67: 2663-2668.
- (37) Bower, C.L., Rowe, J. W., 1967. Extractives of jack pine bark: occurrence of (+V13-epimanol oxide and related labdane diterpenes. *Phytochemistry*. 6: 151-153.
- (38) Lindstedt, G., Misiorny, A., 1951. Constituent of Pine Heartwood. *ActaChemica Scandinavica*. 5: 121-128.
- (39) Hatton, J.V., Hunt, K., 1993. Chemical properties of juvenile and mature wood from second-growth jack pine. *Cellulose Chemistry and Technology*. 27: 17-32.
- (40) Sarkar, S. K., Malhotra, S.S., 1979. Gas-Liquid chromatographic method for separation of the organic acid and its application to the pine needle extracts. *Journal of Chromatography*. 171: 227-232.
- (41) Haagen-Smit Aj, Redemann Ct, Wang Th, Mirov Nt., 1950. Composition of gum turpentines of pines: a report on *Pinus ponderosa*, *P. banksiana*, *P. canariensis*, and *P. washoensis*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc. 39 : 260-265.
- (42) Pichette, A., Garneau, F.X., Jean, FI., Riedl, B., Girard, M., 1998. Chemical Differences Between the Wood Extracts of Jack Pine (*Pinus Banksiana*), Black Spruce (*Picea Mariana*) and Balsam Fir (*Abies Balsamea*) from Eastern Canada. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 18 : 427-438.
- (43) Ikeda, T., Matsumura, F., Benjamin, D.M., 1977. Chemical basis for feeding adaptation of pine sawflies *Neodiprion rusifrons* and *Neodiprion swainei*. *Science*. 197: 497-499.

- (44) Keeling, C.I., Bohlmann, J., 2006. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry*. 67: 2415–2423.
- (45) Micales, J.A., Han, J.S., Davis, J.L. et Young, R.A., 1994. Chemical composition and fungitoxicactivities of pine cone extractive. *Biodeterioration Research* 4, Edited by Llewellyn, G.C., Dashek, W.V., O’Rear, C.E., Plenum Press, New York, p. 317-332.
- (46) Grüner, B.M., Han, S.R., Meyer, H.G., Wulf, U., Bhaki, S., Siegel, E.K., 2007. Characterization of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2684-2685.
- (47) Savluchinske-Feio, S., Curo, M.J.M., Gigante, B., Roseiro, J.C., 2006. Antimicrobial activity of resin acid derivatives. *Appl. Microbial Biothechnol.* 72: 430–436.
- (48) Söderberg, T.A., Johansson, A., Gref, R., 1996. Toxic effects of some resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology*. 107: 99–109.