

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

par

JÉRÔME BÉRUBÉ-GAGNON, B.Sc. Chimie

Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*

2006



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

Tshiuetin,

*« Partager, pagayer, marcher, Katak, la
route difficile du Nord, à la rencontre
de ceux qui nous rendent meilleurs. »*

Florent Vollant

« Nous assistons à l'émergence d'une science qui n'est plus limitée à des situations simplifiées, idéalisées, mais nous met en face de la complexité du monde réel, une science qui permet à la créativité humaine de se vivre comme l'expression singulière d'un trait fondamental commun à tous les niveaux de la nature. »

La fin des certitudes, Ilya Prigogine, Prix Nobel de Chimie 1977.

RÉSUMÉ

De nos jours, un grand nombre de composés issus de plantes sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus à travers le monde, 12 proviennent de produits naturels, mais jusqu'ici, environ seulement 10 % des 250 000 espèces de plantes inventoriées ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives. Au Québec, les plantes de la forêt boréale n'ont fait l'objet que de très peu de recherches de composés actifs bien que les peuples autochtones aient utilisé une grande diversité de plantes pour soigner toutes sortes de maladies et d'affections. Ces connaissances médicinales ancestrales permettent d'orienter et de guider la recherche de molécules bioactives. De plus, face à l'émergence grandissante à l'échelle mondiale du phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques, la découverte de nouveaux composés antimicrobiens est devenue un objectif primordial dans la lutte contre les infections causées par des souches bactériennes résistantes. En Amérique du Nord, les écorces de plusieurs conifères étaient utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne pour un usage antiseptique. Le but de ce projet de recherche était donc, dans un premier temps, d'évaluer l'activité antibactérienne d'extraits d'écorces de conifères de la forêt boréale, soit : *Abies balsamea*, *Larix laricina*, *Picea glauca* et *Picea mariana*, puis en second lieu, d'isoler et d'identifier les composés responsables de l'activité de l'extrait ayant montré la plus grande activité. Ainsi, des extraits éthanoliques d'écorces ont été préparés et leur activité antimicrobienne a été évaluée sur deux souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, à l'aide de la méthode de diffusion du disque. Des quatre extraits testés, celui de l'écorce de *P. mariana* (épinette noire) s'est avéré le plus actif contre la souche de *S. aureus*. La bioautographie a permis l'isolation bioguidée de molécules actives présentes dans cet extrait. Dans la fraction active isolée, sept molécules de la classe des acides résiniques ont été identifiées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) : l'acide pimarique (1), l'acide sandaracopimarique (2), l'acide isopimarique (3), l'isopimarol (4), l'acide palustrique (5), l'acide déhydroabiétique (6) et l'acide abiétique (7). Cette étude constitue la première confirmation de la présence d'isopimarol dans l'écorce de *P. mariana*. Les composés (5), (6) et (7) sont les composés les plus abondants dans la fraction active isolée. L'évaluation de l'activité antibiotique des composés identifiés a montré que les composés (2), (3), (5), (6) et (7) sont actifs contre *S. aureus*. Nos résultats semblent donc valider l'utilisation traditionnelle de l'écorce de cette plante dans la médecine amérindienne.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mes codirecteurs de recherche, le Pr. Jean Legault et le Pr. André Pichette pour m'avoir permis de réaliser ce projet qui m'a donné l'occasion d'acquérir une expérience dans les domaines de la phytochimie et de la pharmacognosie.

Merci à mes parents, Maryse et Claude, qui m'ont soutenu et encouragé durant mes études à Chicoutimi et aussi durant mon stage en France. Ils ont partagé avec moi les moments de joie, mais aussi les moments difficiles. Ils ont su m'écouter et me conseiller et je leur en suis profondément reconnaissant.

Je tiens également à remercier tout spécialement M. Vakhtang Mshvildadze pour ses conseils, ses encouragements et pour tout ce qu'il m'a appris sur la phytochimie et l'isolation. Il est porteur d'une énergie et d'un enthousiasme qu'il a su me communiquer tout au long de notre collaboration et qui a mené, j'en suis sûr, au développement d'une amitié durable. J'aimerais aussi remercier mes collègues avec qui j'ai partagé ces deux années de recherche.

Merci également au Pr. Guy Balansard de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Marseille avec toute l'hospitalité et la générosité ensoleillée unique aux gens de la Provence. Un grand merci au Pr. Riad Elias ainsi qu'au grand M. Aun Chea pour leur collaboration et leur supervision lors de mon stage au Laboratoire de Pharmacognosie-Homéopathie à l'Université Aix-Marseille II.

TABLE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

AcOEt : Acétate d'éthyle

ATCC : «American Type Culture Collection»

CCM : Chromatographie sur couche mince

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EtOH : Éthanol

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance/pression

INT : Chlorure de *para*-iodonitrotétrazolium

MAC : «Minimum Amount of Compound Spotted»

MeOH : Méthanol

n-BuOH : *n*-Butanol

OMS : Organisation mondiale de la santé

R_f : Rapport de la distance parcourue par le composé (d_{sub}) sur celle parcourue par le front de solvant (d_{sol})

RP₁₈ : Phase inverse C₁₈ *

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLES DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	v
I. INTRODUCTION	1
1.1 Introduction générale.....	2
1.2 Problématique.....	7
1.3 Objectifs du projet de recherche.....	12
II. REVUE DE LITTÉRATURE	13
2.1 Principales caractéristiques de <i>Picea mariana</i>	14
2.2 Utilisations en médecine amérindienne traditionnelle.....	15
2.3 Études phytochimiques de <i>Picea</i>	16
2.3.1 Le genre <i>Picea</i>	16
2.3.2 <i>Picea mariana</i> (Mill.) BSP.	18
III. ARTICLE	22
Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de <i>Picea mariana</i>	
Résumé.....	24
1. Introduction.....	25
2. Matériel et méthodes.....	26

2.1	Matériel végétal.....	26
2.2	Extraction.....	26
2.3	Culture des microorganismes.....	26
2.4	Tests d'activité antibactérienne.....	27
2.4.1	Diffusion du disque.....	27
2.4.2	Bioautographie.....	27
2.4.3	Évaluation des MAC.....	29
2.5	Isolation et identification des composés actifs.....	30
2.5.1	Isolation.....	30
2.5.2	Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	30
3.	Résultats et discussion.....	32
3.1	Extraction.....	32
3.2	Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits.....	32
3.3	Isolation des composés actifs de l'extrait de <i>P. mariana</i>	33
3.4	Identification des composés de la fraction active par GC-MS.....	34
3.5	Évaluation de l'activité antibactérienne des composés isolés.....	36
4.	Conclusion.....	38
	Références.....	39
	Annexe 1.....	42
	Annexe 2.....	44
	Annexe 3.....	46

Annexe 4.....	48
Annexe 5.....	50
Annexe 6.....	52
Annexe 7.....	54
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	56
4. Conclusion et perspectives.....	57
V. BIBLIOGRAPHIE.....	59

Liste des figures

Figure 1. Exemples de molécules issues de produits naturels.....	3
Figure 2. Antibiotiques couramment utilisés de nos jours.....	9
Figure 3. <i>P. mariana</i> : a) Cônes. b) Profil de l'arbre. c) Aire de distribution.....	15
Figure 4. Molécules identifiées chez <i>Picea mariana</i>	21

Chapitre I

INTRODUCTION

1. Introduction

1.1 Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies.¹ Actuellement, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire.^{2,3}

À l'origine, ces ressources étaient employées sous leur forme brute, puis au fil du temps, la préparation d'extraits et de concentrés ont permis d'en intensifier l'effet médicinal.⁴ À partir du XIX^{ième} siècle, les molécules responsables des effets thérapeutiques ont été isolées et ont servi de prototypes à l'élaboration de médicaments.^{5,6} Quelques exemples de ces composés sont présentés à la figure 1. Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel.^{2,7}

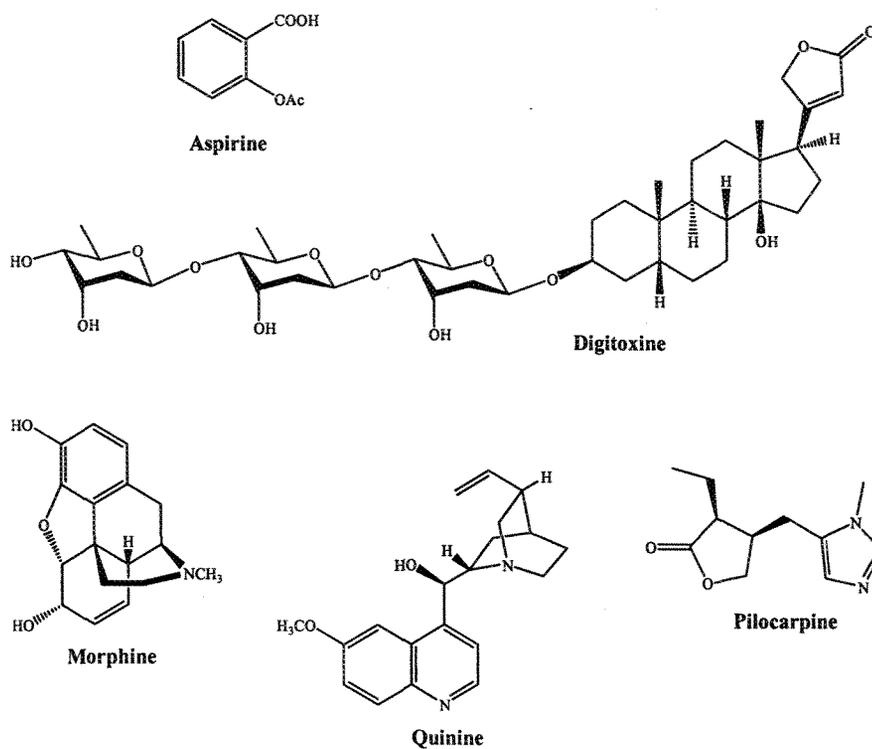


Figure 1. Exemples de molécules issues de produits naturels.⁵

De plus, des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 d'entre eux sont issus de produits naturels.^{8,9} Apparemment, cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est proportionnellement supérieur à ceux issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament.^{10,11}

Lorsque les grandes compagnies pharmaceutiques se sont détournées des produits naturels pour se tourner vers la chimie combinatoire au tournant des années 1990, elles

croyaient alors qu'à l'intérieur de quelques années, le nombre de molécules thérapeutiques obtenues serait grandement augmenté.⁵ Cependant, malgré les dizaines de milliards de dollars investis en recherche et en développement (R&D) au fil des années, le nombre de nouveaux médicaments a chuté.^{12,13,14} Ces nouvelles méthodes de découverte de molécules bioactives semblent avoir atteint certaines limites, ce qui peut expliquer un renouveau de l'intérêt porté à la recherche de composés à partir des sources naturelles telles que les plantes.^{5,15}

Par conséquent, les quelques 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur Terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels.^{16,17,18,19} Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques.⁹

Les plantes utilisent différents moyens pour se défendre des agressions de leur environnement que constituent les herbivores, les insectes, les bactéries, les moisissures, les rayons UV, etc. Certains de ces moyens de défense font appel à des composés chimiques qui interagissent avec le métabolisme de l'attaquant; étant alors intoxiqué et affecté, ce dernier pourrait être découragé de poursuivre son attaque. Certains de ces composés ont aussi un effet pharmacologique chez l'humain et peuvent donc servir de remèdes, tout dépendant de la dose utilisée.^{20,21} La recherche de composés possédant une activité

thérapeutique ne peut toutefois pas être entreprise au hasard compte tenu du très grand nombre d'espèces végétales. Cette démarche doit donc être orientée.²² Dans cette optique, l'ethnopharmacologie étudie les propriétés pharmacologiques des plantes et des préparations utilisées en médecine traditionnelle et permet donc d'orienter la recherche de composés bioactifs.^{23,24}

En Amérique du Nord, les peuples autochtones utilisaient une grande variété de plantes afin de traiter toutes sortes de maladies, infections et traumatismes.²⁵ Pendant près de 10 000 ans, soit à partir de leur arrivée sur le continent nord-américain jusqu'à leur sédentarisation par les gouvernements dans les années 1950, la survie de ces peuples a été étroitement liée aux connaissances qu'ils avaient des plantes médicinales.²⁶ De façon générale, ils croyaient que la nature fournissait les remèdes à toutes les maladies.²⁷ «Si une maladie semble être provoquée d'une façon naturelle, c'est à un herboriste qu'on fait appel; s'il n'est pas capable d'écarter la douleur, on se tournera alors vers un homme-médecine.»²⁸

Les travaux de Jones *et al.* (2000) ont montré que certaines plantes utilisées comme antimicrobiens par les peuples amérindiens de l'Est du Canada présentent une activité biologique significativement plus élevée que celle de plantes médicinales courantes ou de plantes choisies au hasard.²¹ Dans la médecine traditionnelle des peuples autochtones du Québec, les conifères étaient les plantes le plus souvent utilisées.²⁹ Leur écorces servaient à la préparation de nombreux remèdes utilisés pour soigner les brûlures, les coupures, les plaies infectées, les infections pulmonaires et respiratoires ainsi que les problèmes gastro-

intestinaux.^{27,30} Cependant, jusqu'à ce jour, les arbres de la forêt boréale utilisés en médecine traditionnelle par les peuples autochtones du Québec n'ont fait l'objet que de très peu d'études phytochimiques.

D'autre part, on constate que jusqu'à maintenant seule la matière ligneuse a présenté un intérêt pour l'industrie forestière puisqu'elle entre dans la fabrication de produits tels que les pâtes et papiers et le bois d'œuvre qui sont générateurs d'emplois et de profits. Ce secteur d'activité est très important pour notre économie puisqu'il représente à lui seul près de 100 000 emplois au Québec.³¹ Ce sont principalement les résineux (épinette noire, sapin baumier, mélèze et thuja) qui sont exploités par l'industrie du bois et du papier.³² Cependant, lors de l'exploitation de la matière ligneuse, une grande quantité de biomasse, c'est-à-dire de branches, d'aiguilles et d'écorces, est produite. Chaque année, environ 2,5 millions de tonnes d'écorces sont ainsi détruites puisqu'elles sont le plus souvent brûlées pour fournir de l'énergie.³³ C'est donc une perte de biomasse importante. Cette matière végétale contient pourtant un grand nombre de molécules comme les flavonoïdes, les coumarines, les alcaloïdes, les polyphénols, les tannins, les lignanes, les terpènes et plusieurs autres qui possèdent potentiellement des activités biologiques telles qu'anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, antimicrobiennes, anti-oxydantes, etc.^{34,35,36}

Le Laboratoire d'analyse et de séparation des espèces végétales (LASEVE) s'intéresse donc à la valorisation de cette biomasse provenant de la forêt boréale dans le but d'isoler et d'identifier des molécules possédant une activité biologique intéressante. De plus, ce

laboratoire utilise les données de la médecine traditionnelle des peuples amérindiens du Québec comme base afin de guider cette recherche de molécules bioactives.³⁷

1.2 Problématique

La chimiothérapie des infections bactériennes a débutée au début des années 1940 avec la découverte de la pénicilline par Flemming.³⁸ Moins de quatre ans après l'introduction de la pénicilline G en usage clinique (1941), des cas où la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* avait développé une résistance à cet antibiotique étaient rapportés. Dans les années 1950, l'usage d'antibiotiques tels que l'érythromycine, la tétracycline et les aminoglycosides pour traiter des patients atteints d'une infection causée par la souche *S. aureus* résistante aux pénicillines a mené à l'apparition de souches de *S. aureus* multirésistantes.

La méthiciline a été développée en 1960 afin de traiter les infections causées par les souches *S. aureus* multirésistantes. Cependant, cette même année, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthiciline (SARM) sont apparues.³⁹ Durant les années 1970, les cas de SARM ont été observés à travers le monde entier. De nos jours, plusieurs études ont montré que le SARM représente une importante source d'infections nosocomiales (infections contractées en milieu hospitalier).^{40,41}

Selon l'OMS, il y aurait chaque jour un million d'infections qui se produisent dans les hôpitaux du monde.⁴² Plusieurs bactéries sont responsables de ce phénomène dont entre autres : les Streptocoques, par exemple *Streptococcus pyogenes*, les staphylocoques, par exemple *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* et plusieurs autres.⁴³ En 2004, le «National Nosocomial Infections Surveillance System» estimait que près de 55% des cas de staphylocoques rapportés en milieu hospitalier aux États-Unis étaient résistants à la méthicilline.⁴⁴

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est dû en grande partie à la prescription massive d'antibiotiques par les médecins, leur mauvaise administration et leur usage non-médical.^{45,46} Également, l'utilisation des antibiotiques en agriculture comme promoteurs de la croissance et dans la prévention des infections est suspectée de contribuer au développement de souches résistantes non seulement chez les animaux, mais aussi chez les populations humaines.⁴⁷ Fait intéressant, aux États-Unis, plus de 50% des antibiotiques produits sont utilisés en agriculture et la situation est sensiblement la même à travers le monde.⁴⁸ La figure 2 présente quelques exemples d'antibiotiques couramment utilisés de nos jours.

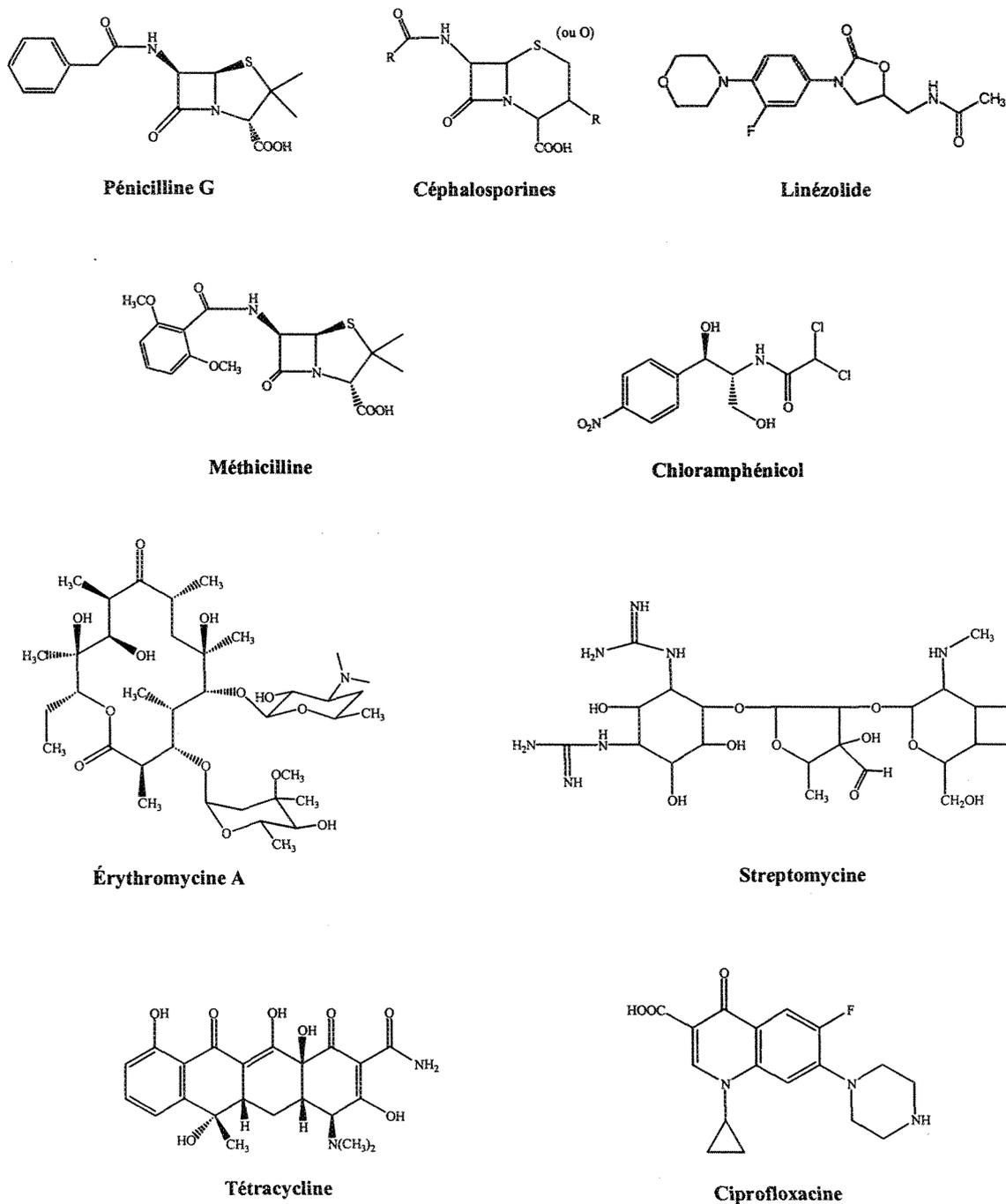


Figure 2. Antibiotiques couramment utilisés de nos jours.

Presque tous les nouveaux antibiotiques développés depuis les 40 dernières années ne sont que des variantes de composés chimiques connus et pour lesquels les bactéries ont déjà développé des résistances.^{49,50} La classe la plus récente d'antibiotiques, les oxazolidinones, a été introduite en usage clinique dans les années 1970. L'antibiotique le plus récent sur le marché, la linézolide (Zyvox), appartient à ce groupe et a été introduit sur le marché Nord-américain en 2000. Dès 2001, des cas de SARM résistants à la linézolide ont été rapportés. Sa structure chimique est présentée à la figure suivante (Fig. 3). Le phénomène de résistance aux antibiotiques se développe donc très rapidement et a pour conséquence de complexifier d'année en année la lutte aux infections microbiennes.

Paradoxalement, les grandes corporations pharmaceutiques délaissent peu à peu le domaine de la recherche d'antibiotiques nouveaux pour se concentrer davantage sur les maladies chroniques qui promettent des profits à plus long terme.^{51,52} La problématique de la résistance aux antibiotiques rappelle cependant qu'il est important de trouver de nouvelles molécules possédant une activité antibactérienne qui agissent sur des cibles cellulaires différentes de celles visées par les antibiotiques actuellement utilisés.⁵³ Les plantes peuvent être une source intéressante de nouveaux composés antibiotiques permettant de faire face à ce problème mondial majeur.⁵⁴ Lors des tests d'évaluation de l'activité antibactérienne réalisés au LASEVE, l'extrait d'écorce d'épinette noire (*P. mariana*) a démontré l'activité la plus intéressante. Par conséquent, ce projet de recherche avait donc pour but de réaliser l'isolation de molécules bioactives sur l'écorce de cette plante, une espèce végétale de la forêt boréale souvent utilisée en médecine traditionnelle

amérindienne comme antiseptique⁵⁵ et aussi parce qu'il s'agit d'une des principales essences végétales exploitées par l'industrie forestière au Québec. Les quantités d'écorces d'épinette noire qui sont détruites chaque année sont grandes et pourraient faire l'objet d'une revalorisation si des composés antibiotiques intéressants y étaient découverts.

1.3 Objectifs du projet de recherche

Le principal objectif de ce projet de recherche visait à valoriser l'écorces de conifères de la forêt boréale par l'évaluation de l'activité antibiotique d'extraits d'écorces d'*A. balsamea*, de *L. laricina*, de *P. glauca* et de *P. mariana*. Pour atteindre cet objectif, plusieurs objectifs spécifiques devaient être réalisés :

- 1) Préparer d'extraits éthanolique à partir des écorces.
- 2) Évaluer l'activité antibactérienne des extraits bruts sur une souche bactérienne Gram-négative : *Escherichia coli*, et une souche Gram-positive : *Staphylococcus aureus*.
- 3) Isoler et identifier les composés responsables de l'activité antibactérienne d'un des extraits.

Afin de bien situer le contexte dans lequel ce projet de recherche s'inscrit, nous présentons, au chapitre II, une revue de littérature sur *P. mariana* qui décrit les principales caractéristiques de cet arbre, ses différentes utilisations médicinales par les peuples amérindiens ainsi que la phytochimie du genre *Picea* et de l'espèce *P. mariana*. Le Chapitre III contient l'article scientifique qui sera soumis au *Journal of Ethnopharmacology* et qui présente l'essentiel des travaux et des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche. Au chapitre IV, nous effectuons un retour sur les éléments importants de ce projet et nous terminons en proposant, à la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche.

Chapitre II

REVUE DE LITTÉRATURE

2. Revue de littérature

Étant donné que l'extrait d'écorces de *P. mariana* est celui qui a démontré l'activité antibactérienne la plus intéressante lors des travaux réalisés dans le cadre de ce projet et que les efforts d'isolation des molécules bioactives ont été ensuite concentrées sur cet extrait, on trouve donc dans ce chapitre-ci une revue de littérature qui décrit les principales caractéristiques de cet espèce, ses utilisations ethnopharmacologiques ainsi que la phytochimie du genre *Picea* et de l'espèce *P. mariana*.

2.1 Principales caractéristiques de *Picea mariana*

L'épinette noire (*P. mariana* (Mill.) BSP) est un arbre conifère de la famille des *Picea*. Il atteint une hauteur de 8 à 20 mètres et possède une forme en cône étroit et aigu. Le bois des rameaux est pubescent et ses cônes ont de 2 à 3 cm de longueur. Ses terrains de prédilection sont humides, granitiques, sablonneux ou tourbeux.

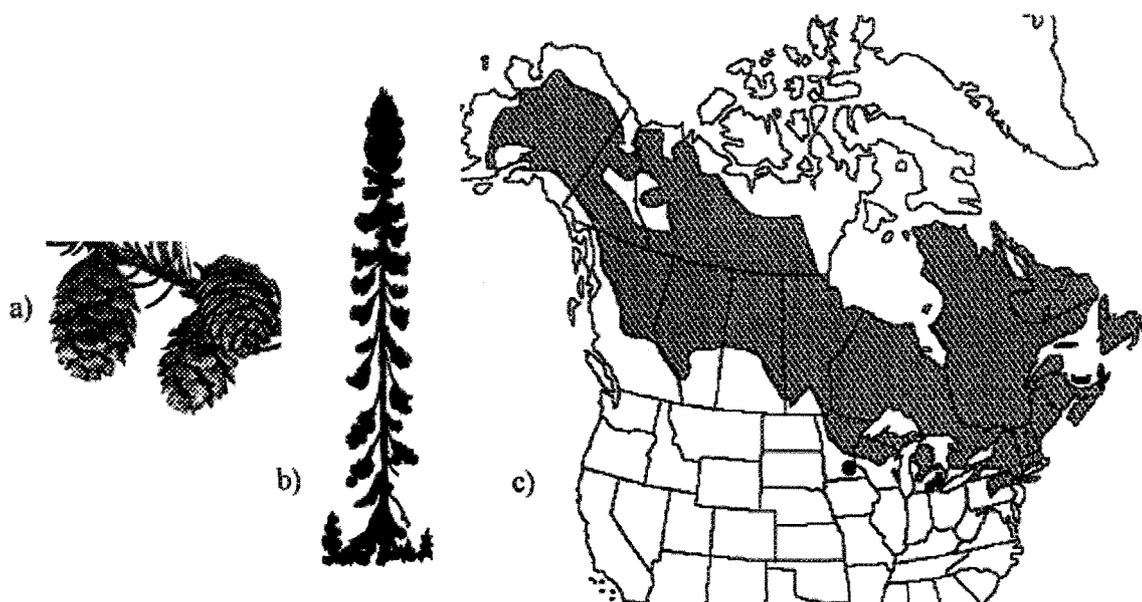


Figure 3. *P. mariana* : a) Cônes. b) Profil de l'arbre. c) Aire de distribution *

Tel que présenté à la figure 4, cette espèce se retrouve uniquement en Amérique du Nord, de Terre-Neuve jusqu'en Alaska et de la limite nordique des arbres jusqu'au sud des Grands Lacs et du nord du New Jersey.⁵⁶ Au Québec, on retrouve l'épinette noire principalement dans la forêt boréale. C'est par conséquent l'espèce dominante de la forêt d'Abitibi ainsi que de la Côte-Nord.⁵⁷

2.2 Utilisations en médecine amérindienne traditionnelle

De nombreux peuples amérindiens vivant dans la forêt boréale utilisaient différentes parties de l'épinette noire afin de traiter et soigner les symptômes de plusieurs maladies. Les Algonquins utilisaient la gomme d'épinette noire en tant qu'onguent désinfectant et ils préparaient une infusion avec les branches afin de «guérir l'intérieur».⁵⁸ Les Cris utilisaient

* Image tirée de l'ouvrage : *Flora of North America, Vol. II : Pteridophytes and Gymnosperms*, 1993, Ed. Flora of North America editorial committee, Oxford University press, New-York, p.370.

eux aussi la gomme (résine) récoltée sur le tronc qu'ils appliquaient sur les plaies, coupures ou brûlures infectées. Une décoction de gomme était administrée afin de soigner les maux de ventre et d'estomac. Les cônes d'épinette noire étaient bouillis dans l'eau et la décoction ensuite utilisée pour soigner les diarrhées, les infections des yeux, de la bouche, de la gorge ou des dents ainsi que certaines maladies vénériennes.^{55,59,60} De plus, les Cris mangeaient les bourgeons et les extrémités des branches pour leur effet tonique et aussi pour la prévention de problèmes cardiaques.⁶¹ Les Esquimaux du Nord du Québec (Inuktitut) appliquaient une pommade de graisse et de gomme d'épinette noire sur les plaies pustuleuses. Une décoction de gomme ou d'aiguilles permettait de traiter les infections respiratoires.⁶² Les Innus (Montagnais) buvaient une décoction des branches afin de soulager la toux et les maux de gorge.⁶³ Les Iroquois mâchaient la gomme d'épinette noire pour faciliter la digestion.⁶⁴ Les Ojibwais prenaient une infusion de racines et d'écorces contre les douleurs stomacales et les tremblements.⁶⁵ Les aiguilles et l'écorce étaient utilisées en tant que stimulants et toniques. L'écorce servait aussi de sel médicinal.⁶⁶ Les Potawatomis du Wisconsin appliquaient une pâte faite d'écorce interne d'épinette noire sur les inflammations cutanées.⁶⁷

2.3 Études phytochimiques de *Picea*

2.3.1 Le genre *Picea*

En Norvège, Slimestad (2003) a évalué la composition en flavonoïdes des bourgeons et des aiguilles chez les arbres du genre *Picea* et il a montré que chez *Picea*, les flavonoïdes

prédominants sont ceux présentant des structures moins oxygénées telles que le kaempférol et la quercétine.⁶⁸

Kraus et Spiteller (1996) ont examiné les composés phénoliques présents dans les petites branches de *P. glauca*.⁶⁹ Ces composés étaient obtenus suite à une extraction à l'AcOEt et les glucosides étaient présents dans l'extrait de n-butanol (*n*-BuOH). Les acétophénones sont les composés phénoliques prédominants (jusqu'à 70 %) et les glycosides d'acétophénones sont les principaux constituants (90 %) de la fraction glucosidique. Au début de la période de végétation, l'acide cinnamique et ses dérivés sont les principaux composés présents dans les branches (>90 %), puis leur proportion diminue en faveur d'autres composés phénoliques. Les quantités de lignanes et de glycosides de lignanes dans les branches sont faibles. Levitin, en 1977, a étudié l'écorce d'épinette blanche et y a quantifié la présence d'holocellulose (38,3 %), de lignine (7,7 %) et d'acides phénoliques (7,7 %).⁷⁰

Selon la littérature, on trouve chez plusieurs espèces du genre *Picea* des alcaloïdes de type pipéridine disubstitués en positions 2 et 6.^{71,72} Par exemple, chez *Picea abies* et *Picea pungens*, le (+)-6-épidihydropinidine et le (+)-6-épiépipinidinol ont été identifiés.⁷³ Ces alcaloïdes sont présents dans les aiguilles, le bois et les racines. Chez *Picea*, on retrouve ces alcaloïdes 2,6-disubstitués sous leur forme *cis* et *trans*, alors que chez le genre *Pinus*, ceux qui ont été isolés ne se trouvaient que sous la forme *cis*.⁷⁴ De plus, certains alcaloïdes de ce

type ont montré une activité tératogène très élevée et seraient peut-être impliqués dans les cas d'avortement de vaches qui consomment des aiguilles de pin.⁷³

En Turquie, le groupe de Uçar à l'Université d'Istanbul a analysé par GC-MS les composés volatils présents dans les aiguilles et le bois de *Picea orientalis*, une espèce qui pousse dans la région du Caucase et de la Mer noire. Dans les aiguilles, les composés volatiles majoritaires sont : α -pinène, camphène, β -pinène, β -myrcène, δ -3-carène, α -terpinolène, bornéol, terpinéol-4, α -terpinéol, acétate de bornyle, β -caryophyllène, α -humulène, germacène D, muurolol, α -cadinol. Dans le bois, les composés volatiles majoritaires sont : α -pinène, β -pinène, δ -3-carène, β -phéllandrène, limonène, α -terpinolène, terpineol-4, α -terpinéol, acétate de bornyle, α -copaène, β -caryophyllène, α -humulène, oxyde de caryophyllène, oxyde de manoyle, labdadién-8-ol, abiéol, palustrol, ester méthylique d'acide déhydroabiétique, néoabiétal, ester méthylique d'acide abiétique.⁷⁵

Au Japon, l'équipe de Tanaka a isolé des triterpènes de type époxyserratanes à partir des cires qui recouvrent les aiguilles de *Picea jezoensis*.⁷⁶ Dans le cadre d'une autre étude, ils ont également isolé et identifié plusieurs diterpènes de type abiétane dans l'écorce du tronc de *Picea glehni*.⁷⁷

2.3.2 *Picea mariana* (Mill.) BSP.

Étant donné que *P. mariana* représente une des principales espèces végétales exploitées par l'industrie forestière, elle fait l'objet de nombreuses études à caractère

écologique et environnemental. Ces études s'attardent à comprendre et à évaluer les types d'environnements menant à une pousse plus rapide des arbres, les types de sols favorisant la meilleure régénération de cette espèce, la flore microbienne associée à cette espèce d'arbre, etc.^{78,79,80,81} Par contre, peu d'études phytochimiques ou pharmacologiques ont été réalisées jusqu'à ce jour sur *P. mariana*.

L'équipe de Willför en Finlande a identifié les composés phénoliques bioactifs présents dans les nœuds et le bois de cœur de *P. mariana*. Dans les nœuds, ils ont identifié plusieurs lignines telles : 7-hydroxymatairésinol, secoisolaricirésinol, liovil, laricirésinol, matairésinol et pinorésinol. Leur équipe a aussi identifié un flavonoïde : la catéchine. Dans le bois de cœur, les principaux composés phénoliques sont : 7-hydroxymatairésinol, 7-*allo*-hydroxymatairésinol, secoisolaricirésinol, liovil, α -conidendrine, laricirésinol, matairésinol, lignine A, cyclolaricirésinol, pinorésinol, les deux isomères du 1,3-(*bis*-guaiacyl)-1,2-propandiol et la catéchine.⁸² Dans la littérature, on rapporte que la (-)-catéchine est phytotoxique alors que l'énantiomère (+) a des propriétés antibactériennes et antifongiques.⁸³ On rapporte aussi que le matairésinol possède des activités antibactérienne et antioxydante.⁸⁴

Hooper *et al.* (1984) ont identifié les phytostérols et les triterpènes de 67 plantes médicinales utilisées par les amérindiens des Maritimes.⁸⁵ Dans les branches, l'écorce et les aiguilles de *P. mariana*, ils ont confirmé la présence de phytostérols : le campstérol, le stigmastérol et le β -sitostérol. Dans l'écorce, les branches et les aiguilles, ils ont identifié la

β -amyrine, un triterpène. L' α -amyrine a aussi été identifiée dans les branches.⁸⁵ Les phytostérols sont connus pour leur activité antimicrobienne⁸⁶ et peuvent être ajoutés à la nourriture afin de minimiser la détérioration causée par la croissance microbienne ou l'oxydation.⁸⁷ Dans une autre étude, Schneider *et al.* (1991) ont isolé deux alcaloïdes dans les aiguilles de *P. mariana* : l'epidihydropinidine et le pinidiol (Figure 5).⁸⁸

Lors de la fabrication de la pulpe à partir du bois de conifères par le procédé «*Kraft*», une huile est obtenue. Conner *et al.* (1980) ont identifié les principaux composés et groupes de composés présents dans le bois de cœur et l'écorce de *P. mariana* permettant de caractériser la composition de l'huile obtenue avec cette espèce.⁸⁹ L'équipe de Conner a ainsi identifié dans le bois de cœur et dans l'écorce les composés suivants :

- acides gras : palmitique, stéarique, oléique, linoléique, 5,9,12-octadécatriénoïque, 5,11,14-eicosatriénoïque, béhénique
- acides résiniques : pimarique, sandaracopimarique, palustrique, lévopimarique, isopimarique, abiétique, déhydroabiétique, néoabiétique
- non saponifiables : diterpènes, campesterol, sitostérol, triterpènes

L'activité antibactérienne de certains acides résiniques, entre autre l'acide déhydroabiétique, est connue et rapportée dans la littérature.⁹⁰

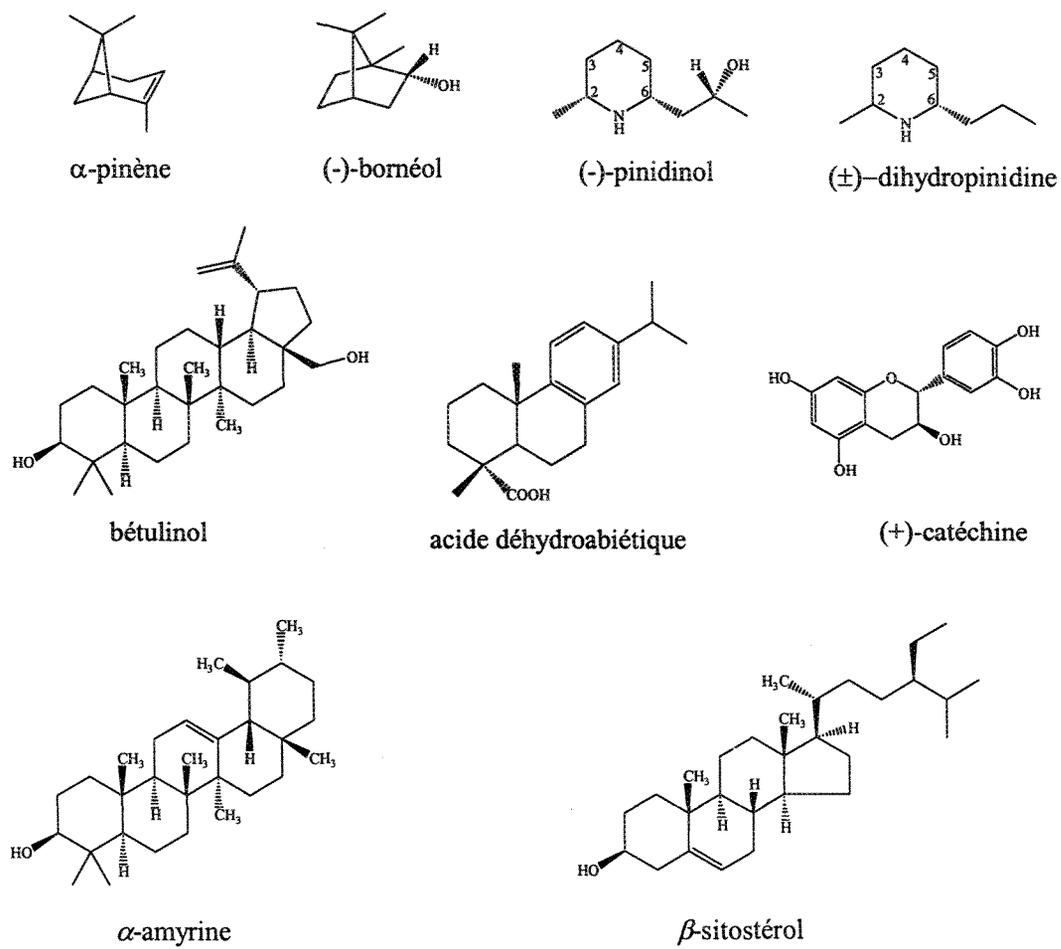


Figure 4. Molécules identifiées chez *Picea mariana*.

Chapitre III

ARTICLE :

Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

Ethnopharmacological Communication

Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces

de *Picea mariana*

Jérôme Bérubé-Gagnon, André Pichette, Vakhtang Mshvildadze, Pierre-Luc Larouche, F.

Simard et Jean Legault*

Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Qué., Canada.

Mots-clés : conifères, *Picea mariana*, écorce, activité antibactérienne, bioautographie, acides résiniques

*Demandes d'informations : Dr J. Legault
Université du Québec à Chicoutimi
555, boulevard de l'Université
Chicoutimi, Québec, Canada
G7H 2B1
Tel. 00 1 (418) 545-5011. Fax : 00 1 (418) 545-5012.
E-mail : Jean_Legault@uqac.ca

Résumé

Les écorces de conifères provenant de la forêt boréale sont utilisées depuis des millénaires dans les médecines traditionnelles des Premières Nations du Nord-Est du Canada comme antiseptiques afin de traiter diverses infections. L'activité antibactérienne d'extraits éthanoliques d'écorces d'*Abies balsamea*, *Larix laricina*, *Picea glauca* et *Picea mariana*, a été évaluée sur deux souches bactériennes, soit *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les quatre extraits étaient actifs sur la souche Gram-positive *S. aureus* et inactifs sur *E. coli*. L'isolation des molécules actives présentes dans l'extrait éthanolique de *P. mariana* a été bioguidée par bioautographie. Dans la fraction active isolée, sept molécules de la famille des acides résiniques ont été identifiées par GC-MS : l'acide pimarique (1), l'acide sandaracopimarique (2), l'acide isopimarique (3), l'isopimarol (4), l'acide palustrique (5), l'acide déhydroabiétique (6) et l'acide abiétique (7). Cette étude constitue la première confirmation de la présence d'isopimarol dans l'écorce de *P. mariana*. Parmi les composés identifiés, les plus abondants sont les composés (5), (6) et (7). L'activité antibactérienne des composés identifiés dans la fraction active a été évaluée et les composés (2), (3), (5), (6) et (7) ont montré une activité contre *S. aureus*.

1. Introduction

En Amérique du Nord, les peuples des Premières Nations utilisaient une grande variété de plantes dans le but de traiter et de soigner toutes sortes de maladies (Moerman, 1991). Durant des milliers d'années, la survie de ces peuples a été étroitement liée à la connaissance qu'ils avaient des plantes médicinales (Assiniwi, 1988). Dans la médecine traditionnelle amérindienne, les conifères étaient le groupe de plantes le plus largement utilisé (Arnason, 1981). Leurs écorces entraient dans la fabrication de différentes préparations servant à traiter les brûlures, coupures, plaies infectées et aussi les problèmes gastriques ou intestinaux (Bergeron *et al.*, 1996). Les écorces d'*A. balsamea*, de *L. laricina*, de *P. glauca* et de *P. mariana* étaient utilisées en tant qu'antiseptiques dans les médecines traditionnelles des Algonquins, des Cris, des Innus et des Iroquois (Moerman, 1998 ; Marles *et al.*, 2000). Dans cette étude, l'activité antibactérienne d'extraits éthanoliques d'écorces de quatre conifères : *A. balsamea*, *L. laricina*, *P. glauca*, *P. mariana*, a été évaluée sur deux souches bactériennes, soit *S. aureus* et *E. coli*. Plusieurs composés antibactériens ont par la suite été identifiés dans l'extrait de *P. mariana*.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal

Quatre espèces de conifères ont été sélectionnées : *Abies balsamea* (L.) Mill., *Larix laricina* (Du Roi) Koch., *Picea glauca* (Moench) Voss., *Picea mariana* (Mill.) BSP. Le 13 décembre 2003 dans la région de Chicoutimi (71°0'11" W, 48°18'41" N), les quatre espèces de conifères ont été récoltées et identifiées par M. Patrick Nadeau, technicien en biologie (Université du Québec à Chicoutimi). Pour chacun de ces arbres, un spécimen témoin a été déposé à l'Herbier Louis-Marie à l'Université Laval à Québec et les numéros de références correspondants à *A. balsamea*, *L. laricina*, *P. glauca*, et *P. mariana* sont respectivement : 0493199, 0493197, 0493200 et 0493198.

2.2 Extraction

L'écorce a d'abord été enlevée des troncs, séchée à l'air libre durant 24 heures puis broyée et mise en poudre. Les poudres d'écorces (80 g) de chacune des quatre espèces sélectionnées ont été extraites à l'aide d'éthanol 95 % en utilisant un appareil de type Soxhlet pour une durée de 12 heures. Le solvant a été évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'emploi d'une pompe à vide a ensuite permis d'enlever les traces de solvant dans l'extrait.

2.3 Culture des microorganismes

Les souches bactériennes utilisées étaient *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et ont été cultivées dans du bouillon de culture «Nutrient Broth»

(Difco) et incubés durant la nuit pour une durée de 18 heures à 37 °C avant d'être utilisées lors des tests d'activité antibactérienne. Les souches étaient conservées à -80 °C dans un mélange de bouillon de culture «Nutrient Broth» et de 5% (v/v) de glycérine.

2.4 Tests d'activité antibactérienne

2.4.1 Diffusion du disque

L'activité antibactérienne des extraits éthanoliques d'écorces a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion du disque (Bauer *et al.*, 1966). Les bactéries ont été inoculées sur gel d'agar Mueller-Hinton (Fluka) placé dans des pétris stériles qui a ensuite été inoculé avec la solution bactérienne en utilisant une tige de coton. Un milligramme (1 mg) d'extrait éthanolique d'écorce a été dissout dans 20 µL de DMSO, placé sur un disque de fibre de verre de 6 mm de diamètre (Difco) et celui-ci a été déposé sur la surface d'agar inoculée. Des disques imprégnés de DMSO (20 µL) et de chloramphénicol (30 µg), servant respectivement de témoin négatif et de témoin positif, ont aussi été déposés sur la surface de la gélose inoculée. Les pétris ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 18 heures. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

2.4.2 Bioautographie

Afin d'identifier quelles étaient les molécules responsables de l'activité antibactérienne dans l'extrait éthanolique de *P. mariana*, nous avons adaptée une méthode de

bioautographie à partir d'anciennes méthodes (Hamburger *et al.*, 1987 ; Didry *et al.*, 1990) et celle-ci est une combinaison de deux variantes connues sous les appellations de «bioautographie par contact» et «bioautographie directe» (Rios *et al.*, 1988).

Dans un premier temps, nous avons séparé l'extrait éthanolique de *P. mariana* en effectuant une extraction liquide-liquide à l'aide de chloroforme (CHCl_3) et d'eau. Ces solvants ont ensuite été évaporés. Des tests sur CCM (Wagner, 1984) ont permis de déterminer qu'un mélange chloroforme-méthanol dans un rapport de 40 : 1 est le système de solvants le plus approprié pour obtenir une bonne séparation des composés présents dans l'extrait chloroformé. La bioautographie de cet extrait a ensuite été réalisée selon la méthode suivante : 1 mg d'extrait dilué dans 100 μL d'acétone a été déposé au bas de la plaque CCM (5cm X 20 cm) sur une bande de 2 cm située à 1,5 cm du bord de la plaque. La plaque a ensuite été développée dans un système de solvant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ dans un rapport de 40 :1 jusqu'à ce que le front de solvant soit à 2 cm du haut de la plaque de CCM. Le solvant a été évaporé avec précaution sous la hotte. Par la suite, dans une hotte microbiologique, une couche de 1 mm d'épais d'agar Mueller-Hinton solidifié a été déposée sur la plaque CCM développée. La surface de la gélose a été inoculée avec une solution bactérienne de 1×10^7 bactéries/mL à l'aide d'un coton tige. La plaque a été incubée pendant 18 heures à l'intérieur d'une boîte en plastique non-hermétique où se trouvent des plats de pétris contenant de l'eau stérile. Puis, une solution de chlorure de *para*-iodonitrotétrazolium (INT) 2 mg/mL (Cole, 1994) a été vaporisée sur la surface de la gélose et incubée à nouveau pendant quatre heures. L'INT est alors transformé par une

déhydrogénase bactérienne en un composé d'une couleur rouge foncé. L'inhibition de la croissance bactérienne est révélée par la présence de zones claires. Pour fin de comparaison, une seconde plaque CCM est développée en parallèle et révélée en vaporisant une solution d'acide sulfurique 20 % (v/v) dans le méthanol puis en plaçant la plaque dans une étuve à 80°C pendant 5 minutes.

2.4.3 Évaluation des «*Minimum Amount of Compound Spotted*»

En utilisant la bioautographie, nous avons déterminé, pour chacun des composés identifiés par GC-MS dans la fraction active isolée, la quantité minimale déposée sur la plaque ayant une activité inhibitrice de la croissance bactérienne, appelée en anglais : «*Minimum Amount of Compound Spotted*» (MAC) (Didry *et al.* 1990). Les tests ont été effectués en utilisant des standards d'acides résiniques (Helix Biotech Corporation) correspondants aux composés identifiés dans la fraction isolée. Ces composés sont dilués dans l'acétone à des concentrations de 5.0 , 2.5 , 1.25 , 0.625 , 0.312 et 0.156 mg/mL. Ensuite, 20 µL de chacune de ces concentrations sont déposés sur une même plaque de CCM ce qui donne respectivement une masse déposée (MAC) de 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12.5 µg, 6.25 µg et 3.12 µg. Une couche de gel d'agar Mueller-Hinton est déposée sur la plaque de silice, puis la surface de gélose est inoculée avec une solution bactérienne de 1×10^7 bactéries/mL à l'aide d'un coton tige. Tel que décrit à la section 2.4.2, la plaque est incubée et ensuite développée en utilisant l'INT. Le MAC est déterminé comme étant la plus faible quantité d'un composé déposée produisant une zone d'inhibition visible. La détermination du MAC

du chloramphénicol, celui-ci servant de témoin positif, a été effectuée de la même façon. Un témoin négatif était aussi évalué en utilisant 20 μ L d'acétone pure.

2.5 Isolation et identification des composés actifs

2.5.1 Isolation

La séparation des molécules actives de l'extrait de *P. mariana* a été effectuée à l'aide d'une première colonne chromatographique sur gel de silice (Silicycle, Ultra Pure, Silia-P Flash F₂₅₄, 40-63 μ m) et le solvant d'élution était le chloroforme distillé. L'extrait (15,0 g) a été déposé sur la colonne et 27 fractions ont été obtenues. Chaque fraction a été analysée par CCM en utilisant un système de solvants CHCl₃/MeOH 40 :1 et le révélateur utilisé était H₂SO₄ 20% dans MeOH. Les fractions ont été regroupées selon leur profil CCM. La fraction ORG1-F₁ (5,27 g) contenait les composés ayant un R_f de 0,6. La chromatographie de 4,0 g de ORG1-F₁ a permis d'isoler, en utilisant un gradient 100 % CHCl₃ à 100% MeOH, 705 mg d'une fraction contenant les composés ayant un R_f de 0,6. Cette fraction a été purifiée sur colonne chromatographique ouverte en utilisant la phase inverse RP₁₈ comme phase stationnaire. Le système de solvants d'élution était un mélange méthanol-eau dans un rapport 99 : 1. Les fractions 40 à 50 contenaient les composés ayant un R_f de 0,6 et ont été regroupées (97 mg).

2.5.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Avant d'être analysée par GC-MS, la fraction isolée a d'abord été solubilisée dans le chloroforme puis méthyliée à l'aide de diazald (Black, 1983). L'analyse de la composition chimique de la fraction active isolée a ensuite été réalisée à l'aide d'un appareil Agilent Technologies GC 6890N couplé à un spectromètre de masse Agilent Technologies 5973 Network. La colonne chromatographique est une HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) de marque Agilent Technologies. La température de la colonne était programmée à 100°C pendant 2 minutes puis augmentée jusqu'à 280°C à un gradient de 3°C/min puis maintenue à cette température pendant 10 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250 et 280°C. L'Hélium était le gaz vecteur à un débit de 1 mL/min et le volume d'injection était de 1 μ L.

3. Résultats et discussion

3.1 Extraction

Les écorces des quatre espèces de conifères ont été extraites avec de l'EtOH 95% par soxhlet. Les rendements obtenus lors de la préparation des extraits éthanoliques sont de 28,8 g (36%) pour *A. balsamea*, 22,4 g (28%) pour *L. laricina*, 15,2 g (19%) pour *P. glauca* et de 19,2 g (24%) pour *P. mariana*.

3.2 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits

L'activité antibactérienne des extraits de conifères a été évaluée sur une souche bactérienne gram-positive : *S. aureus*, et une souche gram-négative : *E. coli* à l'aide de la méthode de diffusion du disque. Les résultats présentés au tableau 1 montrent que les quatre extraits sont modérément actifs contre la souche de *S. aureus* et inactifs sur *E. coli*. À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de l'activité antibactérienne d'extraits éthanoliques d'écorces de ces conifères. Parmi les quatre extraits testés, l'extrait éthanolique de *P. mariana* est celui qui a démontré l'activité antibactérienne la plus élevée sur *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de 10,70 mm. L'extrait de *P. mariana* a été étudié dans le but d'isoler et d'identifier les composés antibactériens.

Tableau 1. Activité antibactérienne des extraits d'écorces de conifères par la méthode de diffusion du disque.

Extrait ^a	Inhibition de la croissance bactérienne	
	(mm)	
	<i>E. coli</i> ± 0,05	<i>S. aureus</i> ± 0,05
<i>A. balsamea</i>	-	9,50
<i>L. laricina</i>	-	9,10
<i>P. glauca</i>	-	8,60
<i>P. mariana</i>	-	10,70
Témoin positif ^b	25,00	22,30
Témoin négatif ^c	-	-

^a: 1 mg d'extrait éthanolique d'écorce

^b: 30 µg de chloramphénicol

^c: 20 µL de DMSO

- : inactif

3.3 Isolation des composés actifs de l'extrait de *P. mariana*

L'extrait éthanolique de *P. mariana* a été fractionné par une extraction liquide-liquide (CHCl₃-eau) afin de simplifier la composition chimique de l'extrait. Les deux fractions ont été testées et la fraction CHCl₃ s'est avérée la plus active. La bioautographie de la fraction chloroformée de *P. mariana* a permis de bioguider l'isolation de composés antibactériens. En effet, après bioautographie, la fraction présente une zone d'inhibition à un R_f de 0,6 (Figure 1). Sur la base du R_f des composés révélés par bioautographie, l'extrait éthanolique de *P. mariana* a été séparé par chromatographie sur colonne tel que décrit dans la section matériel et méthode et le suivi de la séparation sur colonne a été fait par CCM dans les

mêmes conditions d'élution que celles utilisées pour la bioautographie. L'activité antibactérienne de la fraction active isolée a été testée par diffusion du disque (résultats non-montrés).

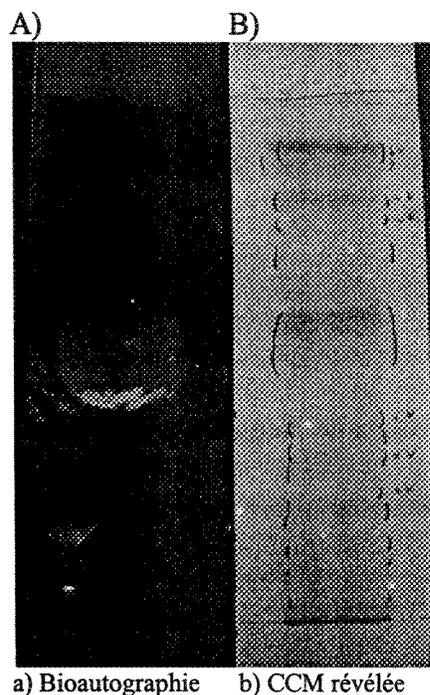


Figure 1. Bioautographie de l'extrait chloroformé de *P. mariana*.

3.4 Identification des composés actifs par GC-MS

La fraction isolée a été méthylée à l'aide de diazald puis analysée par GC-MS (figure 2). Sept pics ont été détectés dont deux pics particulièrement plus intenses, soit les pics 6 et 7 à des temps de rétention de 42,79 et 43,93 min respectivement. Les autres pics sont quant à eux d'intensité faible à moyenne et révèlent la présence de composés minoritaires dans la fraction. Les résultats de cette analyse par GC-MS sont présentés au tableau 2.

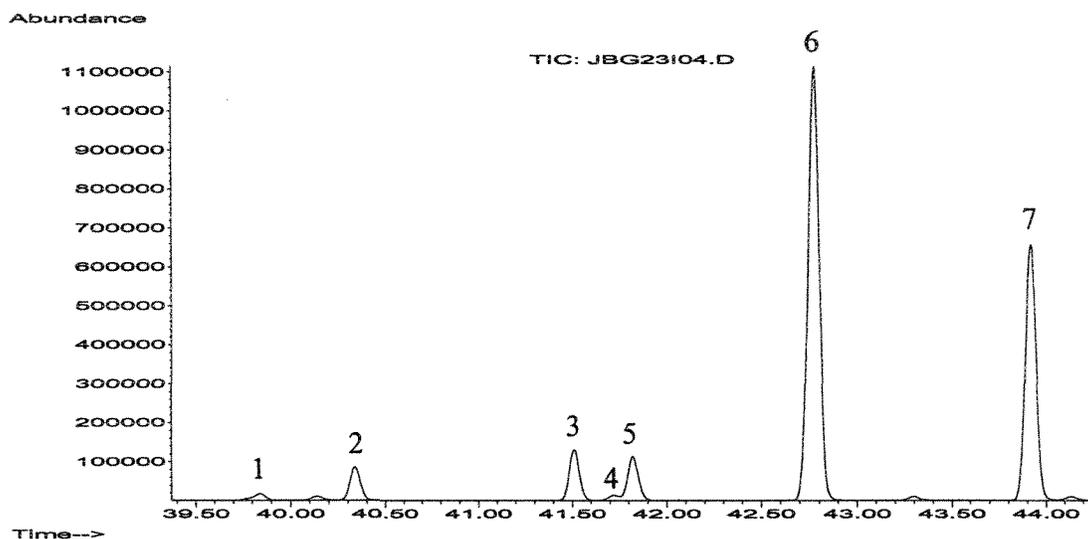


Figure 2. Chromatogramme GC-MS de la fraction isolée

Les composés de la fraction isolée ont été identifiés en comparant les temps de rétention des pics et leurs spectres de masse à ceux d'acides résiniques commerciaux. Sept composés ont été identifiés (figure 3) : l'acide pimarique (1), l'acide sandaracopimarique (2), l'acide isopimarique (3), l'isopimarol (4), l'acide palustrique (5), l'acide déhydroabiétique (6) et l'acide abiétique (7). Les pourcentages relatifs des composés 1 à 7 étaient respectivement de 0,92%, 3,68%, 5,55%, 0,53%, 5,03%, 50,96% et 29,53%. Les composés (5), (6) et (7) constituent 86% de la fraction isolée. Les résultats de cette analyse sont présentés au tableau 2 et les spectres de masse des composés identifiés sont présentés en annexe. Tous les composés identifiés dans la fraction isolée, excepté l'isopimarol, ont déjà été identifiés dans l'écorce et le bois de cœur de *P. mariana* (Conner *et al.*, 1980). Ces travaux rapportent pour la première fois la présence d'isopimarol dans l'écorce de *P. mariana*. L'isopimarol a été identifié dans diverses plantes ainsi que dans des extraits d'aiguilles et de bois de *Picea orientalis* (Uçar *et al.*, 2003).

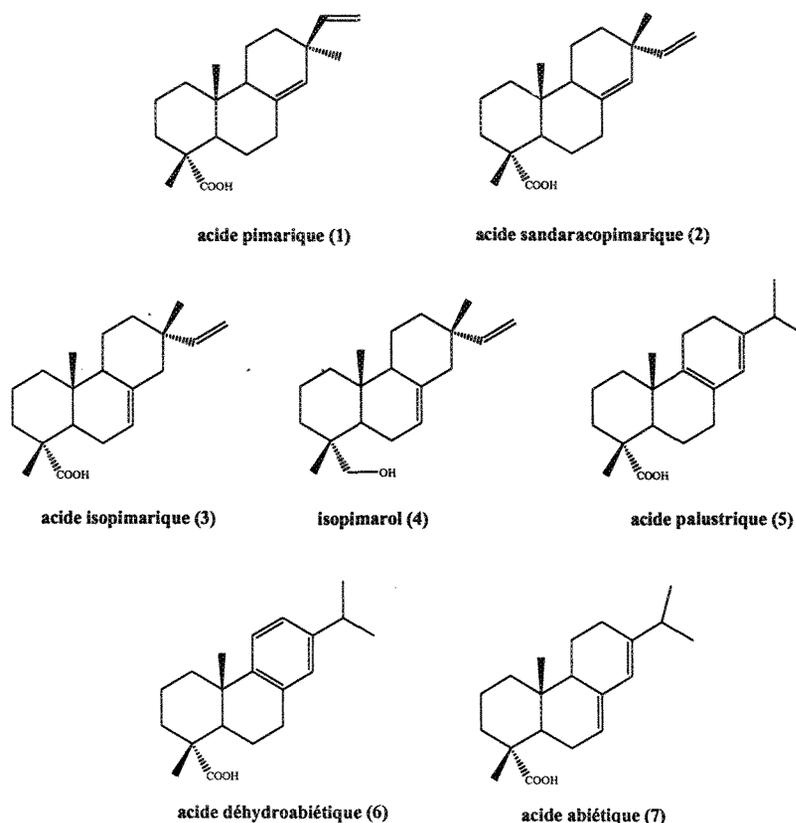


Figure 3. Structures chimiques des composés identifiés

3.5 Évaluation de l'activité antibactérienne des composés isolés

L'activité antibactérienne des composés identifiés dans la fraction isolée a été évaluée sur la souche *S. aureus* (tableau 2). Le chloramphénicol, servant de témoin positif, a une valeur de MAC de 0,2 μg sur cette bactérie. Les résultats montrent que l'acide pimarique et l'isopimarol sont inactifs et que l'acide sandaracopimarique, l'acide isopimarique, l'acide palustrique, l'acide déhydroabiétique et l'acide abiétique sont modérément actifs contre *S. aureus*. Les trois composés majoritaires (5), (6) et (7) ont montré la meilleure activité antibiotique avec un MAC de 6,25 μg . Ces trois composés pourraient être les principaux

responsables de l'activité de l'extrait sur *S. aureus*. Plusieurs molécules parmi les acides résiniques, dont entre autres l'acide déhydroabiétique et l'acide isopimarique, possèdent des activités biologiques connues (Keeling *et al.*, 2006) telles qu'antibactérienne (Söderberg *et al.*, 1990), antifongique (Slavuchinske *et al.*, 1999), anti-tumorale, antivirale, inhibitrice de l'oxyde nitrique (Gigante *et al.*, 2003) et larvicide (Elliger *et al.*, 1976). Les tests d'activité que nous avons effectués montrent que l'isopimarol et l'acide pimarique ne sont pas actifs contre *S. aureus*. Contrairement à Beccera *et al.* (2002), nous avons trouvé que l'isopimarol était inactif sur *S. aureus*.

Tableau 2. Composition chimique (%) de la fraction isolée et activité antibactérienne.

#	Composé	Temps de rétention (min)	% relatif	Activité antibactérienne <i>S. aureus</i> MAC (μ g)
1	Acide pimarique	39,84	0,92	-
2	Acide sandaracopimarique	40,34	3,68	12,5
3	Acide isopimarique	41,51	5,55	12,5
4	Isopimarol	41,73	0,53	-
5	Acide palustrique	41,83	5,03	6,25
6	Acide déhydroabiétique	42,79	50,96	6,25
7	Acide abiétique	43,93	29,53	6,25
	Chloramphénicol	-	-	0,2

4. Conclusion

Les résultats de nos travaux ont montré l'activité antibactérienne d'extraits éthanoliques d'*A. balsamea*, de *L. laricina*, de *P. glauca* et de *P. mariana* sur une souche de *S. aureus*. De plus, la mise au point d'une méthode de bioautographie adaptée à cette étude a permis d'isoler rapidement les composés antibactériens présents dans l'extrait éthanolique de *P. mariana*. L'extrait actif a été fractionné et sept composés de la classe des acides résiniques ont été identifiés par GC-MS dans la fraction active isolée : l'acide pimarique (1), l'acide sandaracopimarique (2), l'acide isopimarique (3), l'isopimarol (4), l'acide palustrique (5), l'acide déhydroabiétique (6) et l'acide abiétique (7). Ces travaux constituent la première identification de l'isopimarol dans l'écorce de *P. mariana*. Parmi les composés identifiés, les composés (5), (6) et (7) ont montré une activité intéressante et ceux-ci comptent pour près de 86% du contenu de la fraction active isolée.

Remerciements

Ce projet de recherche a été par le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). Nous remercions également Patrick Nadeau pour l'identification des plantes et M. Gobeil pour le matériel végétal.

RÉFÉRENCES

- Arnason, T., Hebda, R.J., Johns, T., 1981. Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. *Canadian Journal of Botany* 59, 2189-2325.
- Assiniwi, B., 1988. *La médecine des Indiens d'Amérique*. Guérin littérature : Montréal.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496
- Beccera, J., Flores, C., Mena, J., Aquaveque, P., Alarcón, J., Bittner, M., Hernández, V., Hoeneisen, M., Ruiz, E., Silva, M., 2002. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47, 151-157
- Bergeron, C., Marston, A., Gauthier, R., Hostettmann, K., 1996. Screening of Plants Used by North American Indians for Antifungal, Bactericidal, Larvicidal, and Molluscicidal Activities. *Intl. Journal of Pharmacognosy* 34, 233-242.
- Black, T.H., 1983. *Aldrichimica* 16, 3.
- Cole, M.D., 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays- a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology* 22, 837-856.
- Conner, A.H., Diehl, M.A., Rowe, J.W., 1980, Tall Oil Precursors and Turpentine In Black and White Spruce. *Wood Science* 13, 111-116
- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M., 1990. New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*. *Journal of Ethnopharmacology* 29, 283-290.

- Elliger, C.A., Zinkel, D.F., Chan, B.G., Waiss, A.C.Jr., 1976. Diterpene acids as larval growth inhibitors. *Experientia* 32, 1364-1366.
- Gigante, B., Santos, C., Silva, A.M., Curto, M.J.M., Nascimento, M.S.J., Pinto, E., Pedro, M., Cerqueira, F., Pinto, M.M., Duarte, M.P., Laires, A., Rueff, J., Gonçalves, J., Pegado, M.I., Valdeira, M.L., 2003. Catechols from abietic acid. synthesis and evaluation as bioactive compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11, 1631-1638.
- Hamburger, M.O., Cordell, G.A., 1987. A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products* 50, 19-22.
- Keeling, C.I., Bohlmann, J., 2006. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry* 67
- Marles, R.J, Clavelle, C., Monteleone, L., Tays, N., Burns, D., 2000. *Aboriginal Plant Use in Canada's Northwest Boreal Forest*. UBC Press, Toronto, p. 94.
- Moerman, D.E., 1991. The medicinal flora of Native North America: an analysis. *Journal of Ethnopharmacology* 31, 1-42.
- Moerman, D.E. 1998. *Native American Ethnobotany*. Timber Press: Portland, p. 400.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127-146.
- Slavuchinske Feio, S., Gigante, B., Roseiro, C., Marcelo-Curto, M.J., 1999. Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. *Journal of Microbiological Methods* 35, 201-206.
- Söderberg, T.A., Gref, R., Holm, S., Elmros, T., Hallmans, G., 1990. Antibacterial activity of rosin and resin acids in vitro. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* 24, 199-205.

Uçar, G., Balaban, M., Usta, M., 2003. Volatile needle and wood extracts of oriental spruce

Picea orientalis (L.) Link. Flavour and Fragrance Journal 18, 368-375.

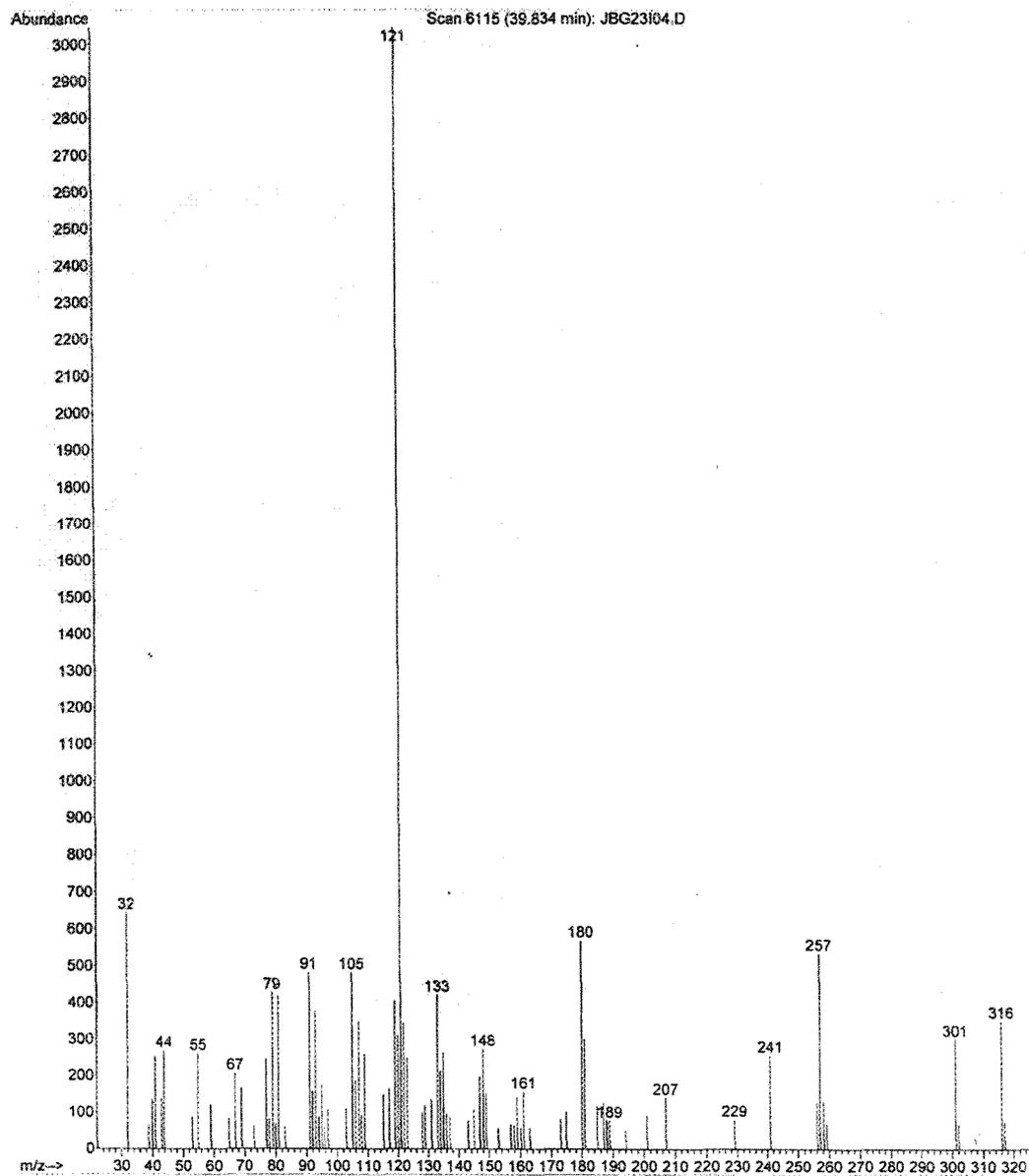
Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Analysis : A Thin Layer

Chromatography Atlas. Springer-Verlag, New-York, pp.320.

ANNEXE 1

Spectre de masse du composé (1)

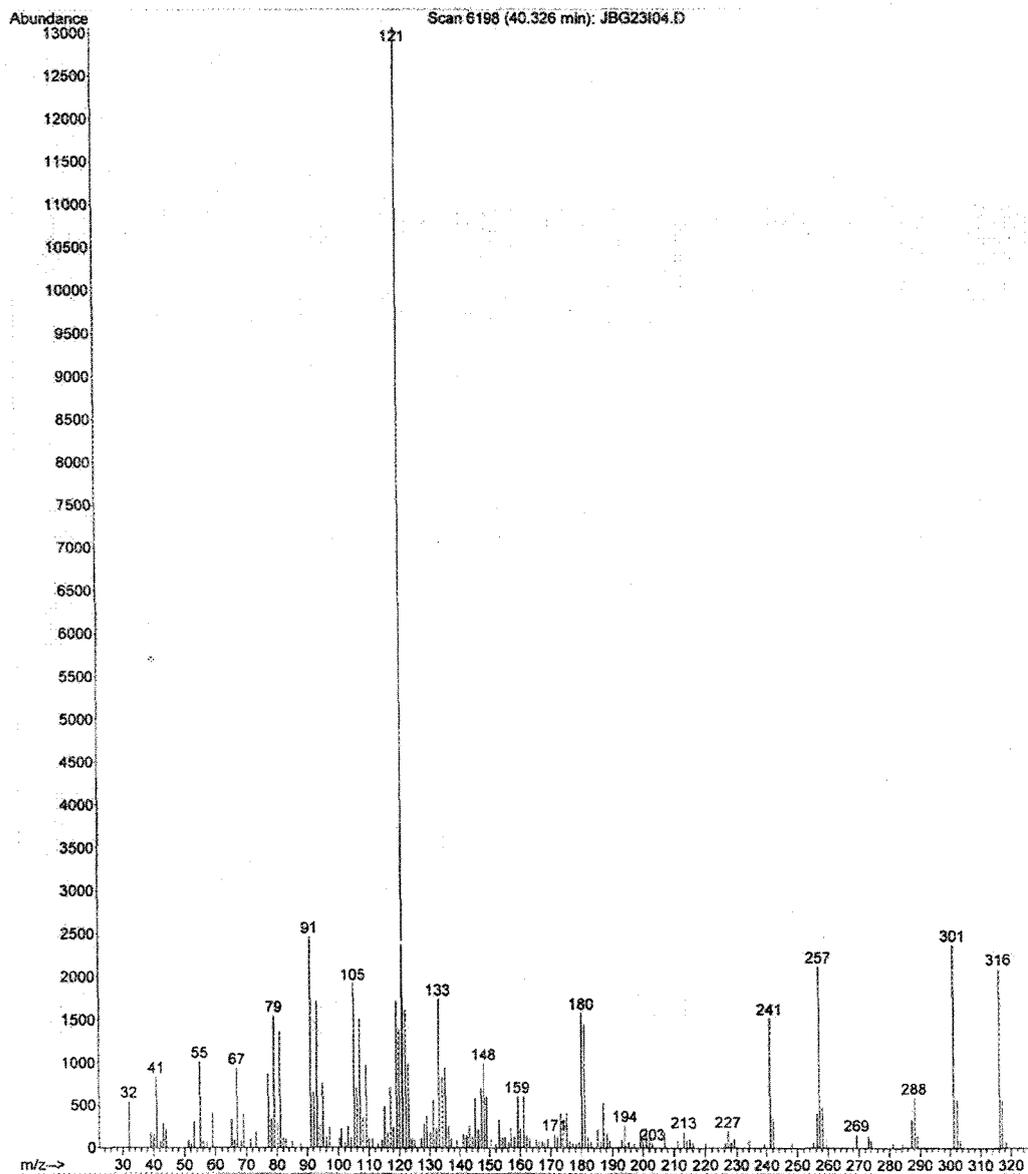
File :D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23I04.D
Operator : Charles Sirois
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction FI2 40-50
Misc Info : méthylé
Vial Number: 1



ANNEXE 2

Spectre de masse du composé (2)

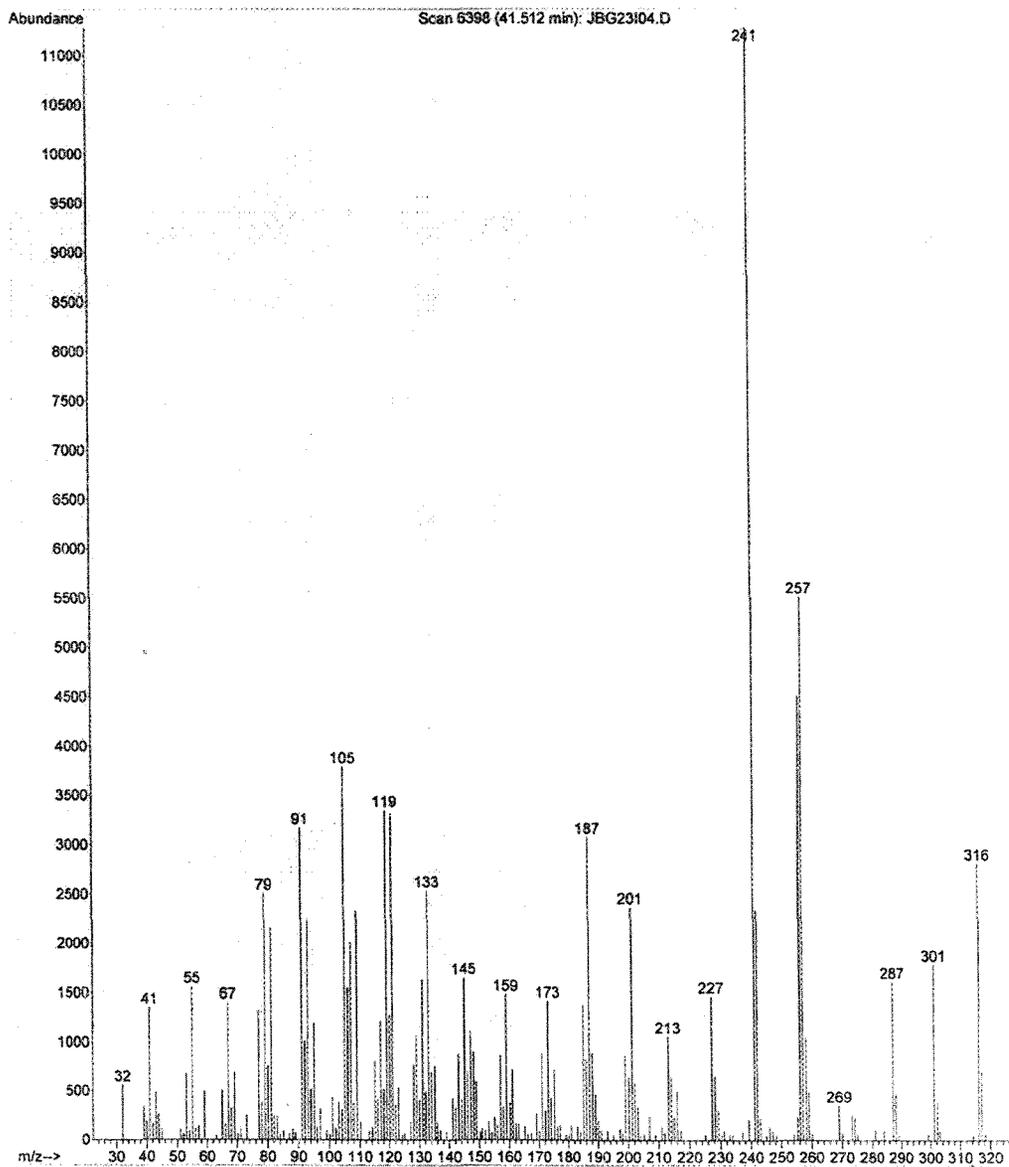
File : D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23104.D
Operator : Charles Sirois
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction PI2 40-50
Misc Info : méthylé
Vial Number: 1



ANNEXE 3

Spectre de masse du composé (3)

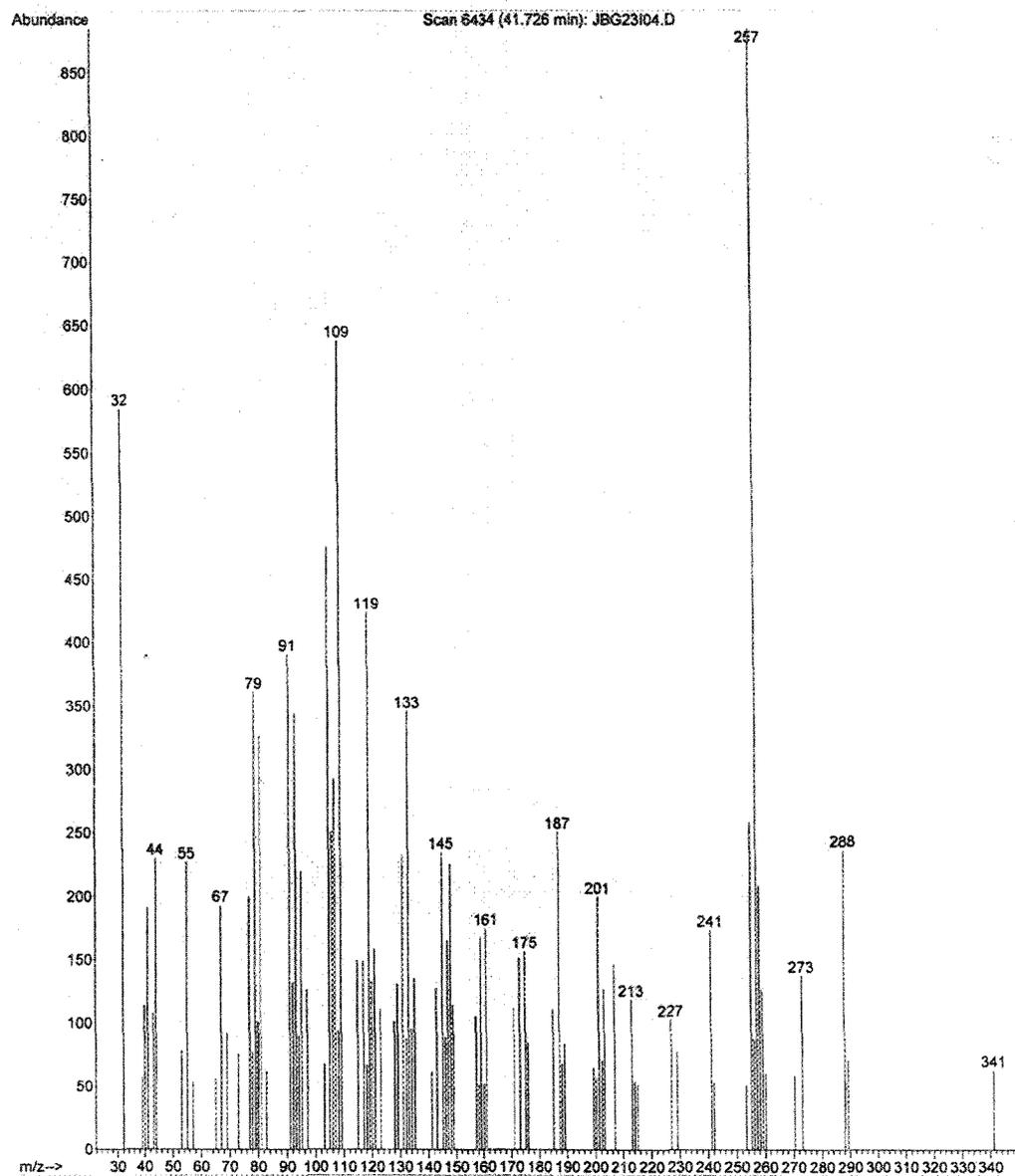
File : D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23I04.D
Operator : Charles Sirols
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction PI2 40-50
Misc Info : méthyle
Vial Number: 1



ANNEXE 4

Spectre de masse du composé (4)

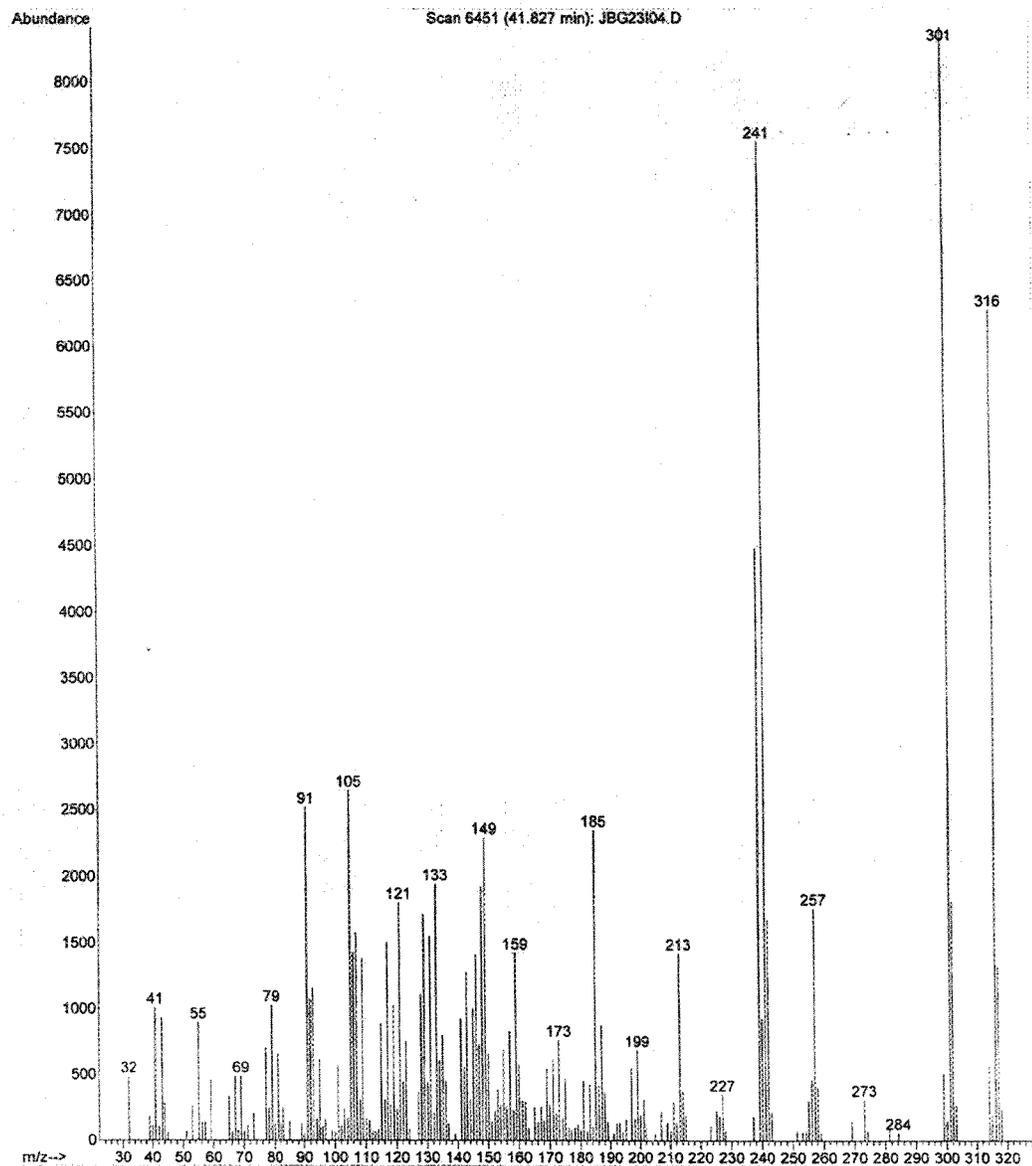
File : D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23104.D
Operator : Charles Sirois
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction PI2 40-50
Misc Info : méthylé
Vial Number: 1



ANNEXE 5

Spectre de masse du composé (5)

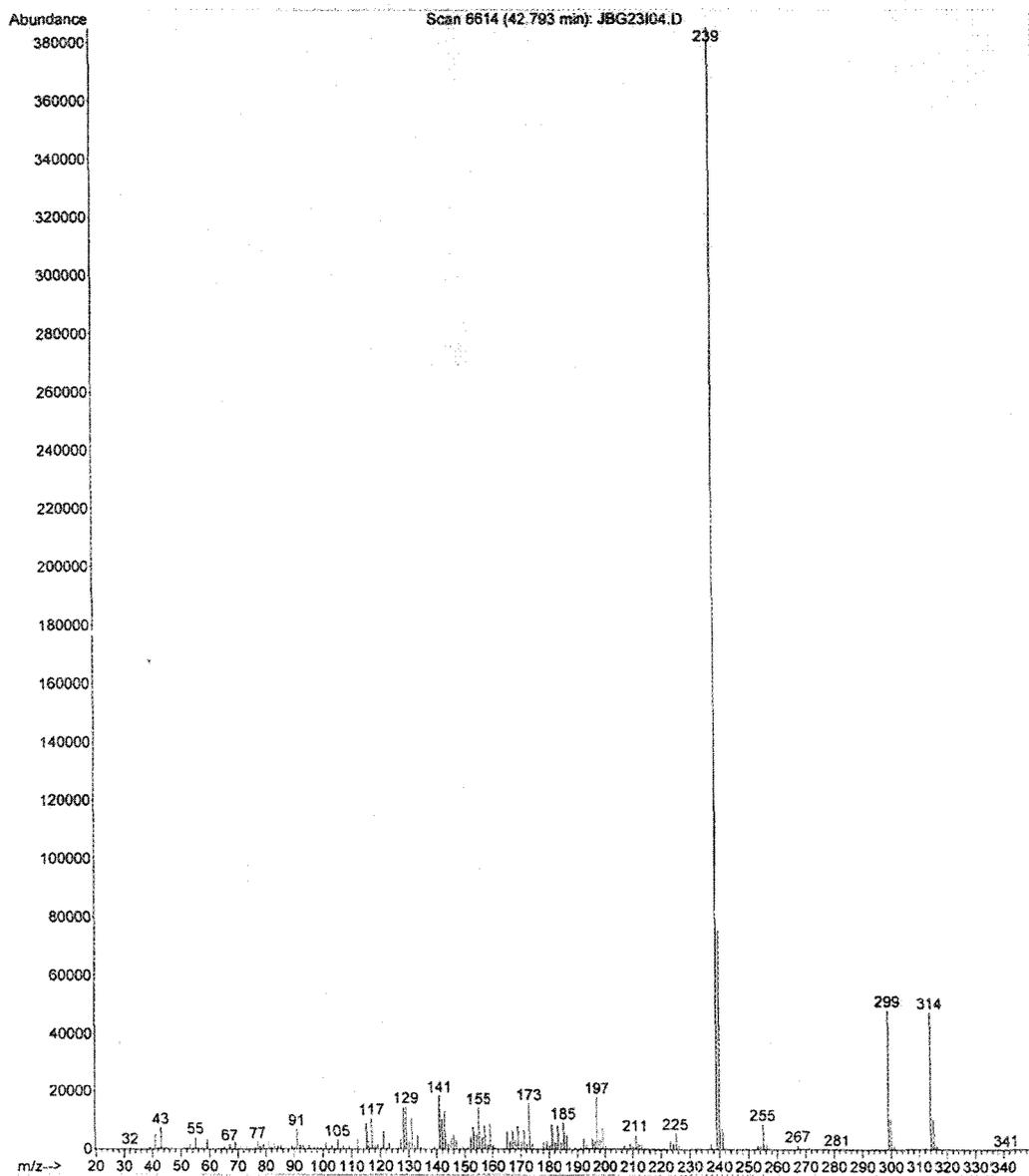
File :D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23104.D
Operator : Charles Sirois
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction PI2 40-50
Misc Info : méthylé
Vial Number: 1



ANNEXE 6

Spectre de masse du composé (6)

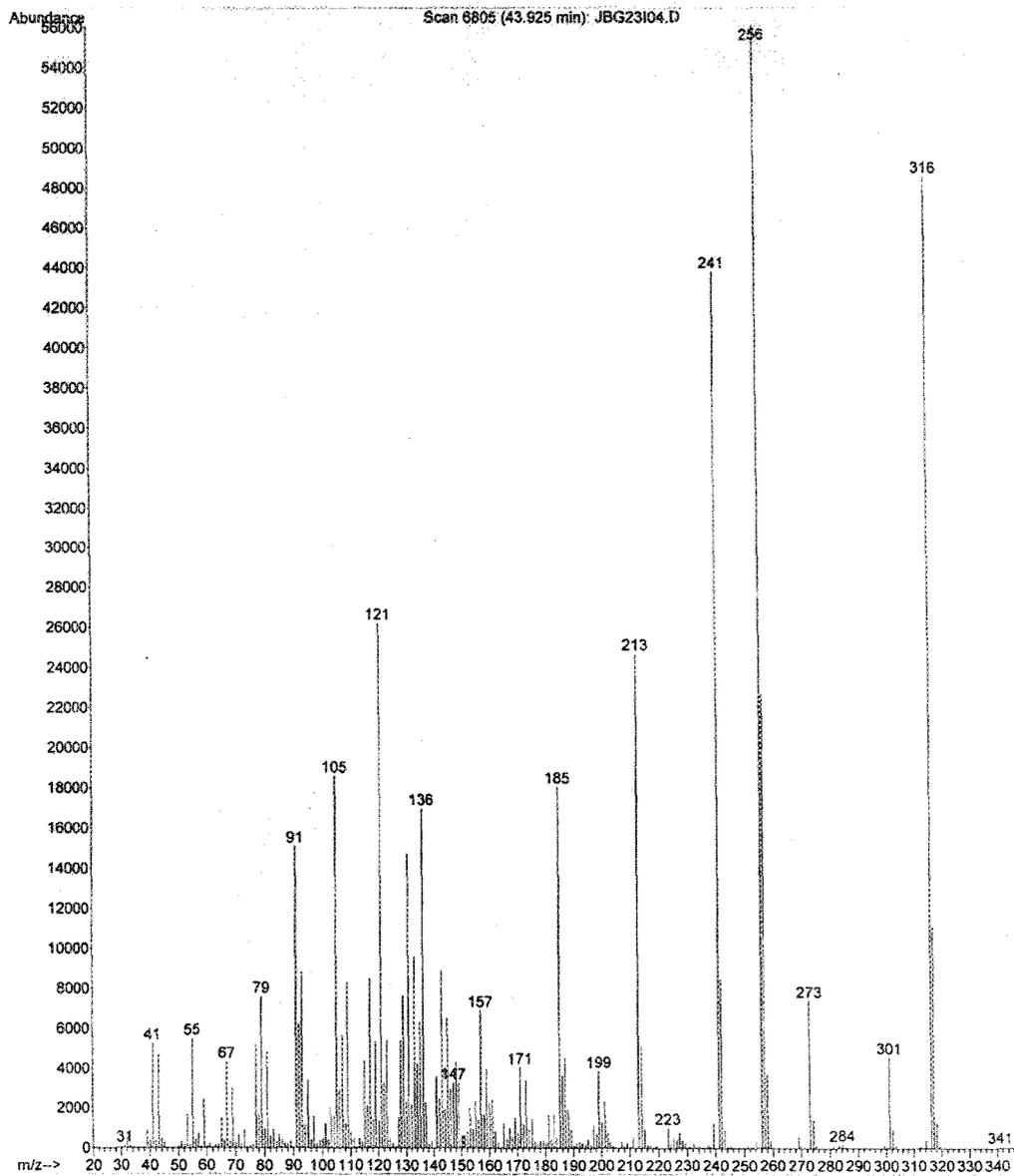
File :D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23I04.D
Operator : Charles Sirois
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction FI2 40-50
Misc Info : méthylé
Vial Number: 1



ANNEXE 7

Spectre de masse du composé (7)

File : D:\MSDCHEM\Data\JBG\JBG23104.D
Operator : Charles Sirois
Acquired : 23 Sep 2004 9:39 using AcqMethod ARCS.M
Instrument : GCMS
Sample Name: Fraction FI2 40-50
Misc Info : méthylé
Vial Number: 1



Chapitre IV

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4. Conclusion et perspectives

L'objectif de ce projet de recherche était de valoriser les écorces de conifères par l'évaluation de l'activité antibactérienne d'extraits d'écorces d'*A. balsamea*, de *L. laricina*, de *P. glauca* et de *P. mariana*, puis d'isoler et identifier les principaux composés antibactériens d'un des extraits. L'extrait éthanolique d'écorce d'épinette noire s'est avéré le plus actif contre la souche de *S. aureus*. L'élaboration d'une méthode de bioautographie nous a permis de «bioguider» l'isolation des molécules actives. L'analyse par GC-MS de la fraction active isolée a mené à l'identification de sept molécules faisant partie de la famille des acides résiniques soit : l'acide pimarique (1), l'acide sandaracopimarique (2), l'acide isopimarique (3), l'isopimarol (4), l'acide palustrique (5), l'acide déhydroabiétique (6) et l'acide abiétique (7). À notre connaissance il s'agit de la première identification de l'isopimarol dans l'écorce de *P. mariana*. L'activité antibactérienne des composés identifiés dans la fraction active a été évaluée et les composés (2), (3), (5), (6) et (7) ont montré une activité contre *S. aureus*. De plus, ces résultats ayant démontré l'activité antimicrobienne d'extraits d'écorce d'*A. balsamea*, de *L. laricina*, de *P. glauca* et de *P. mariana*, il semble que l'utilisation traditionnelle de ces écorces par les amérindiens dans le but de traiter et soigner certaines infections et en tant qu'antiseptiques soit validée et fondée.

Ce projet de recherche constitue les premiers efforts, au LASEVE, dans l'élaboration de différentes techniques et de méthodes permettant la découverte de nouvelles molécules antibactériennes. Nous pensons qu'il pourrait être intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne d'extraits de gommes et de houppiers provenant des quatre espèces de conifères utilisées dans ce projet et de préparer ces extraits en utilisant une extraction séquentielle à l'aide de solvants de différentes polarités. Également, il serait d'intérêt de tester l'activité de ces extraits ou des composés isolés sur des lignées bactériennes résistantes aux antibiotiques telles que SARM et ERV (entérocoques résistants à la vancomycine) et d'évaluer l'activité antimicrobienne sur d'autres souches comme par exemple : *Bacillus subtilis*, *Clostridium difficile*, *Salmonella thyphumurium*, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* sp.

La forêt boréale est une richesse majeure pour le Québec et une source importante de molécules à potentiel thérapeutique. Pourtant, nous commençons à peine à nous intéresser aux molécules bioactives que notre forêt et ses plantes contiennent. D'autres projets comme celui-ci permettront peut-être un jour de diversifier le secteur d'activité relié à la forêt boréale et d'amener au développement de produits à valeur ajoutée tout en redonnant une place centrale et cruciale aux connaissances médicinales des peuples amérindiens qui se sont développées et transmises par la tradition orale au fil des millénaires.

Chapitre V
BIBLIOGRAPHIE

5. Bibliographie

1. Lee, K.-H. *J. of Nat. Prod.*, 2004, 67, 273-283
2. Farnsworth, N.R.; Arkerlele, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z. *Bull. WHO*, 1985, 63, 965-981
3. Fleurentin, J.; Pelt, J.-M. *La Recherche*. 1990, 21,(222), 811-818
4. Tyler, V.E. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1589-1592
5. Butler, M.S. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 2141-2153
6. Patwardhan, B. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 100, 50-52
7. Cordell, G.A.; Colvard, M.D. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 100, 5-14
8. Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 52-60
9. Rollinger, J.M.; Haupt, S.; Stuppner, H.; Langer T J. *Chem. Inf. Comput. Sci.* 2004, 44, 480-488
10. Verpoorte, R. *DDT Reviews*. 1998, 3,(5), 232-238
11. Adams, C.; Brantner, V.V. *Social Research Network*. 2004
12. Gershell, L.J.; Atkins, J.H. *Nature Rev Drug Discovery*. 2003, 2, 321-327
13. Davis, A.M.; Teague, S.J.; Kleywegt, G.J.; *J. Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 42, 2718-2736

14. Rouchi, A.M. *Chem. Eng. News*. 2003, 13, 77-91
15. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 1022-1037
16. Farnsworth, N.R. *Pharm. Technol.* 1995, (Aug), 14-15
17. Larsson, J.; Gottfries, J.; Bohlin, L.; Backlund, A. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 985-991
18. Cutler, S.J.; Cutler, H.G. Biologically Active Natural Products : Pharmaceuticals. 2000 CRC Press, New-York, pp.277
19. Balandrin, M.F.; Kinghorn, A.D.; Farnsworth, N.R. *Human Medicinal Agents from Plants*. Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F., Eds.: ACS Symposium Series 534, American Chemical Society, Washington, D.C., 1993, 2-12
20. Moerman, D.E.; Estabrook, G.F. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, 87, 51-59
21. Jones, N.P.; Arnason, J.T.; Abou-Zaid, M.; Akpagana, K.; Sanchez-Vindas, P.; Smith, M.L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 73, 191-198
22. Cordell, G.A.; Shin, Y.G. *Pure and Applied Chemistry*. 1999, 71, 1089-1094
23. Colegate S.M.; Molyneux, R.J. Bioactive Natural Products. 1993, CRC Press, New-York, pp.528
24. Ciba Foundation Symposium 185. Ethnobotany and the Search for New Drugs, 1994, John Wiley & Sons.
25. Moerman, D.E. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991, 31, 1-42
26. Assiniwi, B. La médecine des Indiens d'Amérique. 1988, Guérin Littérature, Montréal, 448 pp.
27. Bergeron, C.; Marston, A.; Gauthier, R.; Hostettmann, K. *International Journal of Pharmacognosy*. 1996, 34,(4), 233-242

28. Hultkrantz, A. Guérison chamanique et médecine traditionnelle des indiens d'Amérique. 1995, Éditions le Mail, Aix-en-Provence, p. 59
29. Arnason, T.; Hebda R.J.; Johns, T. *Canadian Journal of Botany*. 1981, 59, 2189-2325
30. Moerman, D.E. Native American Ethnobotany. 1998, Timber Press, Portland
31. Association Canadienne de Pâtes et Papiers. Tableaux statistiques 1995. Montréal, 1999.
32. Commission d'étude sur la gestion de la forêt québécoise, *Rapport*, Chapitre 2, Ministère des ressources naturelles du Québec, décembre 2004
33. Ministère des Ressources Naturelles du Québec. *Rapport annuel de gestion 2003-2004*. 2004, Gouvernement du Québec
34. Murphy Cowan, M. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, 12, (4), 564-582
35. Braz-Filho. *Pure Appl. Chem*. 1999, 71, (9), 1663-1672
36. Rowe, J.W. Natural Products of Woody Plants I. 1989, Springer-Verlag, New-York, pp.690
37. Leblanc, J., *Québec Science*, Mai 2005, 36
38. Ball, P. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, 16, 263
39. Ito, T.; Okuma, K.; Ma, X.X.; Yuzawa, H.; Hiramatsu, K. *Drug Resistance Updates*. 2003, 6, 41
40. Öncü, S.; Özsüt, H.; Yildirim, A. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2003, 2
41. Truffault, A.; Mimos, O.; Karim, A.; Edouard, A.; Nordmann, P.; Samii, K. *Ann. Fr. Anesth. Réanim*. 2000, 19, 151

42. World Health Organization: *Overcoming antimicrobial resistance. Report on infectious diseases* 2000.
43. Georgopapadakou, N.H. *Drug Resistance Updates*. 2002, 5, 181-191
44. NNIS. *American Journal of Infectious Control*. 2004, 32, 470-485
45. Norris, S. La résistance aux antibiotiques. Gouvernement du Canada, Division des sciences et de la technologie, 1999
46. Jansen, W.T.M., Van der Bruggen, J.T., Verhoef, J., Fluit, A.C. *Drug Resistance Updates*. 2006, 9, 123-133
47. Magee, J.T.; Pritchard, E.L.; Fitzgerald, K.A.; Dunstan, F.D.J.; Howard, A.J. *BMJ*. 1999, 319, 1239
48. Berge, A.C.B.; Atwill, E.R.; Sischo, W.M. *Preventive Veterinary Medicine*. 2003, 61, 91
49. Lipsitch, M.; Singer, R.S.; Levin, B.R. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2002, 99, 5752
50. Babic, M., Hujer, A.M., Bonomo, R.A. *Drug Resistance Updates*. 2006, 9, 142-156
51. Projan, S.J. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2003, 14, 621
52. Spellberg, B.; Powers, J.H.; Brass, E.P.; Miller, L.G.; Edwards, J.E.Jr. *Clin. Infect. Dis*. 2004, 38, 1279
53. Brown, E.D.; Wright, G.D. *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 2005
54. Shah, A.; Cross, R.F.; Palombo, E. *Phytotherapy Research*. 2004, 18, 615-618
55. Marles, R.J; Clavelle, C.; Monteleone, L.; Tays, N.; Burns, D. Aboriginal Plant Use in Canada's Northwest Boreal Forest. 2000, UBC Press, Toronto, pp.368

56. Benvie, S. Encyclopedia of North American Trees. 2000, Firefly Books, New-York, p.52.
57. Frère Marie-Victorin. Flore laurentienne. 1995, 3^{ème} édition, Gaëtan Morin éditeur, Montréal.
58. Black, M.J. Algonquin Ethnobotany : An Interpretation of Aboriginal Adaptation in South Western Quebec. 1980, Ottawa: Musée National, Mercury Series, Number 65
59. Leighton, A.L. Wild Plant Used by the Woods Crees of East-Central Saskatchewan. 1985, Ottawa, Musée National du Canada, Mercury Series, Number 101
60. Porsild, A.E. Edible Roots and Berries of Northern Canada. 1937, Toronto, Canada Department of Mines and Resources, Musée National du Canada
61. Lamont, S.M. The Fisherman Lake Slave and Their Environment : A Story of Floral and Faunal Resources. 1977, M.Sc. thesis, Department of Plant Ecology, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK Canada
62. Wilson, M.R. *Canadian Journal of Anthropology*. 1978, 8, 180-196
63. Speck, F.G. Medicines Practices of the Northeastern Algonquians. 1917, Proceedings of the 19th International Congress of Americanists, 303-321
64. Rousseau, J. Le Folklore Botanique de l'Île-aux-Coudres. 1945, Contribution de l'Institut Botanique de Montréal, 55, 75-111
65. Smith, H.H. Ethnobotany of the Ojibwe Indians. 1932, Bulletin of the Public Museum of Milwaukee, 4, 327-525
66. Reagan, A.B. Plants Used by the Bois Fort Chippewa (Ojibwa) Indians of Minnesota. Wisconsin Archeologist, 1928, 7, (4), 230-248

67. Smith, H.H. Ethnobotany of the Potawatomi Indians. 1933, Bulletin of the Public Museum of Milwaukee, 7, 1-230
68. Slimestad, R. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003, 31, 1247-1255
69. Kraus, C.; Spiteller, G. *Phytochemistry*. 1996, 44, (1), 59-67
70. Levitin, N. Chemical Composition of the Braks of White Spruce, Basalm Fir and Jack Pine. 1977, Eastern Forest Products Laboratory, Ottawa
71. Tawara, J.N.; Lorenz, P.; Stermitz, F.R. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 321-323
72. Stermitz, F.R.; Miller, M.M. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, (4), 1019-1020
73. Tawara, J.N.; Blokhin, A.; Foderaro, T.A.; Stermitz, F.R. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 4813-4818
74. Todd, F.G.; Stermitz, F.R.; Blokhin, A.V. *Phytochemistry*. 1995, 40, (2), 401-406
75. Uçar, G.; Balaban, M.; Usta, M. *Flavour and Fragrance Journal*. 2003, 18, 368-375
76. Tanaka, R.; Tsujimoto, K.; In, Y.; Ishida, T.; Matsunaga, S.; Terada, Y. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 1044-1047
77. Kinouchi, Y.; Ohtsu, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Matsunaga, S.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 817-820
78. Price, A.G.; Dunham, K.; Carleton, T.; Band, L. *Journal of Hydrology*. 1997, 196, 310-323
79. Jobidon, R.; Cyr, G.; Thiffault, N. *Forest Ecology and Management*. 2004, 198, 209-221
80. Croser, C.; Renault, S.; Franklin, J.; Zwiazek, J. *Environmental Pollution*. 2001, 115, 9-16

81. Fillion, M.; Hamelin, R.C.; Bernier, L.; St-Arnaud, M. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, *June*, 3541-3551
82. Willför, S.; Nisula, L.; Hemming, J.; Reunanen, M.; Holmbom, B. *Holzforschung*. 2004, *58*, 335-344
83. Veluri, R.; Weir, T.L.; Bais, H.P.; Stermitz, F.R.; Vivanco, J.M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, *52*, (5), 1077-1082
84. Kumarasamy, Y.; Nahar, L.; Cox, P.J.; Dinan, L.N.; Ferguson, C.A.; Finnie, D.A.; Jaspars, M.; Sarker, S.D. *Pharmaceutical Biology (Lisse, Netherlands)*. 2003, *41*, (3), 203-206
85. Hooper, S.N.; Chandler, R.F. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984, *10*, 181-194
86. Sharma, R.K. *Bioorganic Chemistry*. 1993, *21*, (1) 49-60
87. Zawistowski, J. Patent No. US20050811, *U.S. Pat. Appl. Publ.* 2005, 21 pp.
88. Schneider, M.J.; Montali, J.A.; Hazen, D.; Stanton, C.E. *Journal of Natural Products*. 1991, *54*, (3), 905-909
89. Conner, A.H.; Diehl, M.A.; Rowe, J.W. *Wood Science*. 1980, *13*, (2), 111-116
90. Söderberg, T.A.; Gref, R.; Holm, S.; Elmros, T.; Hallmans, G. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 1990, *24*, 199-205