

Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario

Janique Vandal, Léo G. Leduc, Garry Ferroni, Mamdouh Abou-Zaid

Département de Biologie
Université Laurentienne

Résumé

La multirésistance microbienne pose de grands problèmes au niveau de la santé publique. En fait, il ne reste que peu d'agents antimicrobiens effectifs contre certains microbes multirésistants. Les scientifiques sont donc à la recherche de nouveaux produits antimicrobiens. Cette recherche a évalué l'activité antimicrobienne de substances naturelles provenant de plantes originaires du Nord de l'Ontario. Vingt-cinq extraits, dix fractions et dix-neuf composés purs ont été testés contre des microbes pathogènes, soient *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. L'activité antimicrobienne des produits naturels a été observée en utilisant la technique de dosage sur microplaque qui emploie le résazurin, et la concentration minimale inhibitrice (CMI) des produits a été déterminée. Afin de démontrer que l'activité antimicrobienne des substances naturelles n'était pas limitée à une seule espèce, certains composés purs ont été testés contre des microbes secondaires, soient *Streptococcus lactis*, *Mycobacterium phlei* et *Schizosaccharomyces octosporus*. Quatre extraits de plantes (*Chimaphila umbellata*, *Betula papyrifera*, *Rhus typhina* et *Fraxinus pennsylvanica*) et six composés purs (acide gallique, éthyle gallate, acide cafféique, acide synapique, acide gentisique et acide chlorogénique) ont démontré une activité antibactérienne ou antifongique. Ces résultats démontrent que ces produits naturels ont le potentiel d'être développés en nouveaux agents antimicrobiens.

Mots clés : activité antimicrobienne, produits naturels, résazurin.

Introduction

Au cours des décennies, la résistance microbienne a évolué jusqu'au point où elle est présentement un grand problème dans le domaine de la santé publique à l'échelon mondial. Il n'y a que quelques agents antimicrobiens pouvant être utilisés contre certains pathogènes et ce nombre continue à diminuer. Effectivement, ce sont les microorganismes multirésistants aux drogues qui sont difficiles à traiter. Par exemple, les pathogènes multirésistants communs, tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* démontrent une résistance contre la majorité des drogues (Mitscher *et coll.* , 1999).

La résistance est une réponse adaptative par laquelle les microorganismes commencent à tolérer la concentration d'une drogue qui serait normalement inhibitrice (Talaro-Park, 2008). Le développement de la résistance aux drogues est causé par différents facteurs, tels que les caractéristiques microbiennes, les pressions de sélection et les changements sociaux et technologiques (Cowen, 1992). Le mésusage des agents antimicrobiens est l'une des causes principales dans l'émergence de la résistance microbienne (Barah, 2010). Selon Buckwold *et coll.* (1979), 50% des agents antimicrobiens, tels que les antibiotiques, sont employés de façon inappropriée. En conséquence, le traitement d'infections causé par des bactéries ou levures multirésistantes aux antibiotiques est maintenant un déficit dû au développement et à l'expansion de la résistance microbienne.

La résistance microbienne peut être intrinsèque ou acquise. Les microbes peuvent acquérir une nouvelle résistance lorsqu'il se produit une mutation spontanée dans leurs gènes ou lorsqu'il y a un transfert de nouveaux gènes provenant d'une autre espèce. L'information génétique portant la résistance qui est transférée d'une espèce à une autre se trouve sur les chromosomes ou les plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN extrachromosomiques, contenant des gènes qui ne sont pas nécessaires dans la réplication ou la survie de la cellule hôte. Les plasmides peuvent contenir des facteurs de résistance (R) qui donnent une résistance à la cellule hôte contre des antibiotiques et des inhibiteurs de croissance (Madigan *et coll.* , 1997). Ces gènes codent pour des enzymes spécifiques à la destruction et l'inactivation des agents antimicrobiens. Ceux-ci sont nommés les plasmides de résistance, ou les plasmides R.

La résistance peut aussi être présente chez les microorganismes même avant qu'ils soient exposés aux drogues. Les microbes peuvent naturellement contenir l'information génétique menant à la résistance (Tenover, 2006). En fait, le microbe peut être naturellement imperméable à l'agent antimicrobien ; le microbe peut altérer l'agent ; le microbe peut modifier la cible de l'agent ; le microbe peut expulser l'agent ; et la cible de l'agent antimicrobien peut être absente chez le microbe (Madigan *et coll.* , 1997).

Lorsque les microbes résistants sont exposés aux agents antimicrobiens, ceux-ci sont les seuls à survivre et se reproduire dans la population. Leur progéniture hérite donc de cette résistance microbienne. L'élimination des microorganismes susceptibles aux drogues mène à la formation d'une population microbienne complètement résistante. Dans ce cas, la résistance est en fait sélectionnée par la présence des agents antimicrobiens dans l'environnement (Mitscher *et coll.* , 1999, et Madigan *et coll.* , 1997). L'utilisation inappropriée des antibiotiques par la population humaine est l'une des causes principales du développement rapide de la résistance microbienne (Jarvis, 1996 et Madigan *et coll.* , 1997). Aussi, la diversité génétique, l'adaptabilité

et la fécondation rapide des populations microbiennes sont aussi des facteurs jouant de grands rôles dans le développement de la résistance microbienne, ainsi que dans le processus de l'inactivation des drogues (Talaro-Park, 2008).

Le fait que le nombre de microorganismes multirésistants augmente, il y a une grande inquiétude que plusieurs antibiotiques deviendront inefficaces. Alors, la découverte et le développement de nouveaux agents antimicrobiens sont grandement recherchés. De ce fait, plusieurs scientifiques à la recherche de nouveaux agents antimicrobiens commencent à porter une attention particulière aux végétaux (Hopley et Schalkwyk, 2006). Les plantes contiennent des produits chimiques naturels, nommés phytochimiques, lesquels sont reconnus pour démontrer des activités antimicrobiennes. Les phytochimiques ont des propriétés protectrices et préventives contre des maladies. Les végétaux ont longtemps été une source importante de produits naturels utilisés pour la santé. Approximativement 80% des individus vivant dans des pays développés utilisent la médecine traditionnelle. Des scientifiques, tels que Jones et coll. (2000) ont basé la sélection de plantes pour leur recherche à l'aide d'informations ethnobotaniques, ainsi que leur utilisation par le peuple indigène. Il s'ensuit que les produits naturels dérivés des végétaux devraient être étudiés davantage pour découvrir leur potentiel antimicrobien.

La province de l'Ontario héberge approximativement 2% de la forêt mondiale (Ressources Naturelles Canada, 2011). La flore du Nord de l'Ontario se constitue des basses terres de la baie d'Hudson, de la forêt boréale et de la forêt des Grands Lacs. Sa géographie se retrouve au nord du lac Huron, de la rivière des Français, du lac Nipissing et de la rivière Mattawa. Cette région présente un paysage végétal varié où l'on retrouve surtout des conifères, des espèces d'arbres à feuilles caduques, des épinettes, les sapins baumiers, les pins gris, les peupliers, les bouleaux et les cèdres (Ressources Naturelles Canada, 2011). Les peuples des Premières Nations du Canada incorporent souvent les plantes dans leur médecine traditionnelle. Selon Arnason *et coll.* (1981), plus de 400 plantes sont utilisées dans la médecine amérindienne, dont 105 plantes étaient efficaces selon leurs composantes phytochimiques. À ce jour, plusieurs plantes originaires du Nord de l'Ontario n'ont jamais été testées pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Cette recherche a pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne de substances naturelles provenant de plantes du Nord de l'Ontario. Vingt-cinq extraits, dix fractions et dix-neuf composés ont été testés contre quatre microbes pathogènes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. L'activité antimicrobienne des produits naturels a été observée en utilisant la technique de dosage sur microplaque qui emploie le résazurin, un indicateur rédox. Cette technique permet aussi la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des produits. Les composés démontrant une activité antimicrobienne ont été testés contre des microbes secondaires, soient *Streptococcus lactis*, *Mycobacterium phlei* et *Schizosaccharomyces octosporus*, afin de démontrer que leur activité n'était pas limitée à une seule espèce. Cette recherche démontre que certains produits naturels ayant des propriétés antimicrobiennes ont le potentiel d'être développés en nouveaux agents antimicrobiens.

Méthodologie

Plantes

Vingt-cinq extraits et dix fractions chimiques provenant de seize différentes espèces de plantes issues à partir de différents sites dans le nord de l'Ontario ont été testés (Tableau 1). Ceux-ci ont été fournis sous forme de poudre déshydratée par Ressources Naturelles Canada, Centre de foresterie des Grands Lacs, Sault-Ste-Marie.

Procédures d'extraction et fractionnement

Toutes procédures concernant le recueillement, l'identification, l'extraction et le fractionnement des plantes ont été faites par Ressources Naturelles Canada. L'analyse et l'identification des composés actifs dans les extraits de plantes concernant une activité biologique étaient basées sur les méthodes d'Abou-Zaid *et coll.* (2000), Andersen et Markham (2005) et Dey et Harborne (1989). Chaque phytochimique a été extrait dans de l'éthanol 70%, sauf ceux-ci : les extraits #8c (bouleau blanc), #9b (bouleau jaune), #3b (pruche du Canada) et #10c (sumac vinaigrier) ont été extraits dans l'acétone 70% ; et l'extrait #10b (sumac vinaigrier) a été extrait dans du méthanol 70% (Tableau 1).

Les extraits bruts de deux espèces, soient la chimaphile à ombelles (#4) et le bouleau blanc (#8a), ont été sélectionnés pour le fractionnement selon leur activité antimicrobienne. Cinq fractions de chaque espèce ont été extraites à partir de concentrations croissantes d'éthanol (0, 20, 50, 70, 100%). Les composés ont donc été identifiés selon les méthodes de Dey et Harbone (1989) et Harbone (1994). La séparation, purification et quantification des composés individuels des extraits bruts ont été faites en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

Composés

Dix-neuf composés d'origine pharmaceutique ont été testés pour leur activité antimicrobienne potentielle (Tableau 2). Ces composés ont été achetés sur le marché et fournis par Ressources Naturelles Canada.

Solutions des produits naturels

Tous les extraits ont été dissouts dans des éprouvettes de verre avec du DMSO 10% (v/v) pour obtenir des concentrations finales de 1 000 µg/mL et 10 000 µg/mL. Tous les fractions et les composés ont été dissouts dans des éprouvettes de verre avec du diméthyl sulfoxyde(DSMO) 10% (v/v) pour obtenir une concentration finale de 1 000 µg/mL. Dans le but d'éviter des biais, l'identité de chaque produit naturel fut masquée jusqu'à ce que l'obtention des résultats.

Solutions stocks et milieux de culture

Une solution stérile saline 0.9% a été préparée en dissolvant 2.7 g de NaCl dans 300 mL d'eau distillée stérile. La solution de DMSO 10% a été préparée en ajoutant 10 mL de DMSO 100% dans 90 mL d'eau distillée stérile. La solution du résazurin qui était employée comme indicateur redox a été préparée en dissolvant 270 mg de résazurin (Sigma-Aldrich, Canada) dans 40 mL d'eau distillée stérile. Les solutions 'iso-sensitest broth'(ISB) et l'agar 'iso-sensitest'(ISA) ont été préparées selon les recommandations du manufacturier.

Cultures fongiques

La levure primaire utilisée dans cette étude était *Candida albicans* ATCC 10231. La levure secondaire qui a été employée était *Schizosaccharomyces octosporus* (Laurentian University Culture Collection).

Cultures bactériennes

Les bactéries primaires qui ont été utilisées étaient *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Les bactéries secondaires étaient *Mycobacterium phlei* ATCC 11758 et *Streptococcus lactis* ATCC 19435.

Préparation des cultures microbiennes

S. aureus, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* ont été cultivés sur des plaques d'ISA et incubés sous les conditions appropriées, soient à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour la levure. *S. lactis* a été cultivé sur l'agar 'brain-heart infusion' (ATCC medium 44) à 37°C pendant 48 h. *M. phlei* a été cultivé sur un agar de glycérol (ATCC medium 27) à 37°C pendant 48 h. *S. octosporus* a été cultivé sur une plaque de Sabouraud 4% - Dextrose Agar (SDA) (EMD Millipore) à 30°C pendant 48 h. Une colonie isolée a été transférée dans 150 mL d'ISB 1X concentré. Le flacon a été ensuite incubé sous les conditions appropriées déjà mentionnées ci-dessus. Par la suite, la densité optique de l'ISB inoculé a été mesurée avec un spectrophotomètre à 500 nm. Des dilutions en série furent effectuées avec de l'eau stérile saline pour obtenir une lecture entre 0, 500 et 0, 599.

Technique de dosage sur microplaque – résazurin

Pour le dépistage de l'activité antimicrobienne des produits naturels, les microplaques de 96 puits ont été préparées selon les méthodes de Sarker *et coll.* (2007). Chaque produit naturel a été testé en triplicata (colonne 1, 2, 3). De plus, chaque microplaque contenait un témoin stérile (C1), un témoin négatif (C-) et un témoin positif (C+) (Voir le tableau ci-dessous).

Exemple de la technique de dosage sur microplaque :

C-	C+	1	2	3	C1
Agent antimicrobien	DMSO 10%	Produit naturel	Produit naturel	Produit naturel	Produit naturel
ISB 3. 3X					
Résazurin	Résazurin	Résazurin	Résazurin	Résazurin	Résazurin
Suspension microbienne	Solution stérile saline				

Dans le premier puits de la colonne du témoin négatif, 100 µL de ciprofloxacine (agent antibactérien) ou d'amphotéricine B (agent antifongique) dissouts dans du DMSO 10% a été pipeté. Cent microlitres de DMSO 10% a été ajouté dans le premier puits de la colonne du témoin positif. Cent microlitres du produit naturel en question ont été pipetés dans les premiers puits des colonnes intitulées 1, 2 et 3, ainsi que dans le premier puits de la colonne du témoin stérile. Par la suite, 50 µL d'ISB 3. 3X concentré ont été ajoutés dans chacun des autres puits, sauf dans ceux de la première rangée. Une double dilution en série a ensuite été effectuée en

utilisant une pipette à voies multiples. Suivant, 10 µL de résazurin a été pipeté dans chaque puits. Dix microlitres de la solution stérile saline 0.9% a été ajouté seulement dans les puits de la colonne stérile. Dix microlitres de la suspension microbienne ont aussi été ajoutés dans chaque puits de la microplaque, sauf dans les puits de la colonne stérile. Finalement, 30 µL d'ISB 3.3X concentré a été pipeté dans chaque puits pour assurer un volume final de 100 µL. Les microplaques étaient donc incubées aux températures appropriées mentionnées ci-dessus, mais la période d'incubation était raccourcie de 2 heures.

Comme le résazurin est un indicateur redox de couleur bleue, les réactions démontrant des résultats positifs étaient représentées par des puits de couleur bleus. Les puits de couleur bleus indiquent qu'il y a une inhibition de la croissance microbienne. Cependant, le résazurin peut être réduit lorsque l'oxygène dans le milieu est limité et devient une couleur rose. Les puits de couleur rose indiquent qu'il y a une croissance microbienne. Le changement de couleur du bleu au rose, à l'aide de la dilution en série, a permis la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). De plus, le pH des puits bleus des produits naturels qui démontraient une activité antimicrobienne a été mesurée.

Résultats

En commençant avec une concentration initiale de 1 000 µg/mL, seulement la chimaphile à ombelles (#4) et le bouleau blanc (#8a) ont démontré une activité antimicrobienne contre *S. aureus*, avec des CMI de 250 µg/mL et 1 000 µg/mL, respectivement. Du fait que ces plantes ont démontré un potentiel antimicrobien, elles ont été séparées davantage en fractions et testées contre les microbes primaires à une concentration de 1 000 µg/mL (Tableau 3). Les fractions 1-4 de l'extrait #4 ont démontré des effets antimicrobiens contre les microbes avec des CMI variées (Tableau 3 et 6). Les fractions 2 et 3 de l'extrait #4 ont aussi démontré des activités antimicrobiennes contre *E. coli* et *C. albicans*. Ces derniers résultats étaient inattendus vu que l'extrait lui-même avait seulement démontré une activité contre *S. aureus*. Les fractions 2 et 3 de l'extrait #8a ont également démontré des activités antimicrobiennes contre *S. aureus* avec des CMI de 500 µg/mL et 62.6 µg/mL, respectivement (Tableau 3 et 6).

En testant les extraits de plantes à une concentration initiale de 10 000 µg/mL, chacun d'entre eux a eu un effet antimicrobien contre *S. aureus* avec des CMI variées (Tableau 7). À cette concentration, l'extrait #4 a démontré une activité antimicrobienne contre chacun des microbes (Tableaux 4 et 7). De plus, les extraits #10b et 10c avaient des effets antimicrobiens contre les 3 bactéries primaires et les extraits #8b, #8c et #11 contre la levure *C. albicans* (Tableau 4 et 7).

Les composés chimiques ont été testés en utilisant une concentration initiale de 1 000 µg/mL, où l'acide gallique, l'éthyl gallate et l'acide caféique ont démontré des effets antimicrobiens contre *S. aureus*, avec des CMI de 500, 1 000 et 1 000 µg/mL, respectivement (Tableaux E et H). L'acide gallique était aussi efficace contre *M. phlei* avec une CMI de 1 000 µg/mL. De plus, les acides sinapique, gentisique et chlorogénique ont démontré des activités antimicrobiennes contre *C. albicans* et *S. octosporus*, tous avec des CMI de 1 000 µg/mL.

Le pH de tous les extraits, fractions et composés chimiques démontrant une activité antimicrobienne a été mesuré. Les valeurs de pH obtenues se retrouvaient dans la zone de

neutralité, ce qui indique que l'inhibition de la croissance microbienne n'était pas influencée par des conditions acides ou basiques.

Discussion et conclusion

Le fait que chacun des extraits de plantes démontrait une activité antimicrobienne contre *S. aureus* à une concentration de 10 000 µg/mL suggère que cette souche de bactérie a peu de défense contre les produits naturels. Cependant, ces résultats sont en accord avec le fait que les bactéries Gram-positives, telles que *S. aureus*, sont généralement plus sensibles aux antibiotiques en comparaison aux bactéries Gram-négatives (Cos *et coll.*, 2006). Cette sensibilité est généralement liée à la structure de la paroi cellulaire. La paroi des bactéries Gram-positives est organisée de telle sorte qu'elle offre moins de protection contre les corps étrangers, ces bactéries sont donc plus vulnérables à la destruction.

L'extrait de la chimaphile à ombelles (*Chimaphila umbellata*) était le seul extrait à démontrer une activité antimicrobienne contre chacun des microbes primaires, les trois bactéries et la levure (Tableau 4). Cette plante est communément utilisée par le peuple des Premières Nations du Nord de l'Amérique. Elle est souvent employée dans la médecine traditionnelle puisqu'elle possède des propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire, astringente, altérative, diurétique et antiseptique pour le tractus urinaire (Caldecott, 2010). Les feuilles de cette plante sont aussi utilisées dans les applications topiques pour le traitement des infections cutanées (Hausen *et coll.*, 1988). De plus, une étude par Galvan *et coll.* (2008) a démontré les propriétés antifongiques et antioxydantes de cette plante contre certaines levures.

Les extraits faits à partir des baies du sumac vinaigrier (*Rhus typhina*) ont démontré des effets efficaces contre les trois bactéries primaires (Tableau 4). Ces résultats sont en accord avec ceux de Borchardt *et coll.* (2008), où les baies provenant de *R. typhina* ont démontré une zone d'inhibition claire contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cependant, une zone d'inhibition partielle avait aussi été observée contre *C. albicans*. Dans l'étude de Borchardt *et coll.* (2008), les drupes de la plante ont été testées, avec et sans le péricarpe. Ce sont seulement les extraits avec le péricarpe qui ont démontré une activité antimicrobienne. Cela suggère que les phytochimiques responsables pour ces effets antimicrobiens sont retrouvés dans les fruits qui entourent les noyaux.

En plus de démontrer une activité antibactérienne contre *S. aureus* à 10 000 µg/mL, les extraits provenant des brindilles et branches, et phloème du bouleau blanc (*Betula papyrifera*), ainsi que l'extrait provenant du feuillage du frêne rouge de l'Amérique (*Fraxinus pennsylvanica*) ont démontré une activité antifongique contre *C. albicans* (Tableau 4 et 7). Une étude faite par Omar *et coll.* (2000) démontre que des extraits provenant de l'écorce et du bois du bouleau blanc possède des propriétés antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline. D'ailleurs, les plantes du genre *Fraxinus* sont souvent utilisées dans la médecine traditionnelle puisqu'elles sont reconnues pour posséder des composés naturels ayant des propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydative et diurétique (Kostova et Iossifova, 2007). L'étude d'Omar *et coll.* (2000) a démontré que les extraits de l'écorce et du bois de cette plante étaient inefficaces contre *S. aureus* et *C. albicans*. L'origine des extraits provenant des différentes parties de la plante pourrait être l'explication de ces différents résultats.

Tel que mentionné dans la section des résultats, l'acide gallique, l'éthyl gallate et l'acide caféique ont démontré un effet antimicrobien contre *S. aureus*. Puisque *S. aureus* était la seule bactérie Gram-positif parmi les microbes primaires. Ces trois composés ont été présumés d'être efficaces contre les bactéries Gram-positives. Ces composés ont été testés contre deux autres bactéries Gram-positives, soient *M. phlei* et *S. lactis*. Ce n'est seulement que l'acide gallique qui a démontré une activité antimicrobienne contre une deuxième bactérie Gram-positif, *M. phlei*.

L'acide gallique est un composé naturel reconnu pour ses effets antimicrobiens et antiviraux. Les études de Jayaraman *et coll.* (2010) et Ahn *et coll.* (1998) démontrent que l'acide gallique possède des activités antimicrobiennes contre divers microbes, tels que *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Également, Sato *et coll.* (1997) ont démontré que l'acide gallique isolé de *Terminalia chebula* RETS est efficace contre *E. coli* et *P. aeruginosa* avec des CMI de >1 000 µg/mL. Cette dernière étude a aussi démontré l'activité antibactérienne de ce composé contre 20 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline et sept souches *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline. Une augmentation de la concentration initiale (>1 000 µg/mL) de ce composé pourrait supporter les résultats de ces études.

Il est important de remarquer que l'acide gallique est un composé retrouvé dans la plante *Rhus typhina* (Borchardt *et coll.*, 2008). Les extraits de *Rhus typhina* n'étaient pas efficaces contre les microbes lorsqu'une concentration initiale de 1 000 µg/mL était utilisée. Par contre, lorsque la concentration a été augmentée à 10 000 µg/mL, tous les extraits de cette plante ont démontré une activité antimicrobienne (Tableaux D et G). En conséquence, il est possible que la concentration de l'acide gallique dans l'extrait de cette plante ait été augmentée à un niveau auquel il est efficace.

Pareillement à l'acide gallique, Sato *et coll.* (1994) ont démontré que l'éthyl gallate était efficace contre vingt souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline et sept souches *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline. Cependant, cette étude a aussi démontré son efficacité contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. L'éthyl gallate agit aussi de façon synergistique lorsqu'il est combiné avec la tétracycline, mupirocine et l'acide fusidique contre des souches spécifiques de *Staphylococcus aureus* résistantes et sensibles à la méthicilline (Soo *et coll.*, 2010).

Plusieurs différents résultats ont été obtenus concernant l'étude des propriétés antimicrobiennes de l'acide caféique. Selon l'étude de Zhao *et coll.* (2011), l'acide caféique isolé de *Salvia miltiorrhiza* est efficace contre *S. aureus* avec un CMI de >200 µg/mL, et contre *E. coli* avec une CMI de 100 µg/mL. Alors que l'étude de Rauha *et coll.* (2000), a démontré que ce composé était inefficace contre *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* et légèrement efficace contre *P. aeruginosa*. L'activité antimicrobienne de l'acide caféique est variable lorsque ce composé est isolé de différentes espèces, employé à différentes concentrations et contre différentes souches de microorganismes, ainsi qu'en employant des différentes méthodologies. Ce composé devrait être étudié davantage pour vérifier ses effets.

Tel que déjà mentionné, les acides sinapique, gentsique et chlorogénique étaient les seuls composés efficaces contre la levure *C. albicans*. Puisque *C. albicans* était la seule levure dans les microorganismes primaires, ces trois composés ont été testés contre une deuxième levure, *S.*

octosporus, pour la vérification de leur activité antifongique. Chacun des trois composés a démontré une efficacité antifongique contre la levure secondaire.

L'étude par Ayaz *et coll.* (2008) a démontré qu'un extrait provenant de *Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC était efficace contre *C. albicans*. Le composé prédominant dans cet extrait était l'acide sinapique ayant une concentration de 2505 ng/g. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux de l'étude de Pinhero *et coll.* (2003), où l'acide gentisique était inefficace contre *E. coli*, *S. aureus*, et *P. aeruginosa*. L'acide gentisique est présentement utilisé en combinaison avec le fludioxinil dans le traitement d'infections fongiques puisqu'elle augmente l'activité de ce fongicide (Kim *et coll.*, 2007). Pareillement, l'acide chlorogénique est reconnu pour ses effets antifongiques. De fait, de nouveaux agents antifongiques ayant de nouveaux modes d'action et une basse toxicité, basés sur l'acide chlorogénique, sont dans le processus de développement (Daneshtalab, 2008).

Conclusion

Le nombre de pathogènes résistants aux antibiotiques augmente sans cesse depuis quelques années. La découverte de nouveaux agents antimicrobiens se trouve à être la solution pour combattre ce problème. Heureusement, les ressources naturelles présentent un grand potentiel et l'opportunité de découvrir de nouveaux antibiotiques. À l'aide de médecine traditionnelle et de l'ethnobotanique, le dépistage des phytochimiques dans les extraits de plantes va mener à leur découverte. Cette étude a affirmé que certains extraits de plantes provenant du Nord de l'Ontario, ainsi que certains composés chimiques, démontrent des effets antimicrobiens importants. Les extraits principaux qui ont démontré des activités antibactériennes et/ou antifongiques étaient la chimaphile à ombelles (*Chimaphila umbellata*), le bouleau blanc (*Betula papyrifera*), le sumac vinaigrier (*Rhus typhina*) et le frêne rouge de l'Amérique (*Fraxinus pennsylvanica*). L'acide gallique, l'éthyl gallate et l'acide caféique sont les composés chimiques qui ont démontré une activité antibactérienne. Les acides sinapique, gentisique et chlorogénique étaient les 3 composés démontrant une activité antifongique. Les résultats de cette étude illustrent le potentiel de ces produits naturels pouvant être développés en agents antimicrobiens ou pouvant être utilisés en combinaisons avec autres drogues.

Tableau 1

Liste de plantes originaires du Nord de l'Ontario testées pour leur activité antimicrobienne

Nom commun	Famille	Nom scientifique	Partie de la plante
#1. Sapin baumier	<i>Pinaceae</i>	<i>Abies balsamea</i>	Aiguilles
#2. Pin gris	<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus banksiana</i>	Aiguilles
#3a. Pruche du Canada	<i>Pinaceae</i>	<i>Tsuga Canadensis</i>	Aiguilles
#3b. Pruche du Canada	<i>Pinaceae</i>	<i>Tsuga Canadensis</i>	Brindilles et branches
#3c. Pruche du Canada	<i>Pinaceae</i>	<i>Tsuga Canadensis</i>	Brindilles et branches
#4. Chimaphile à ombelles	<i>Ericaceae</i>	<i>Chimaphila umbellata</i>	Feuillage
#5. Chiogène hispide	<i>Ericaceae</i>	<i>Gaultheria hispidula</i>	Feuillage
#6a. Berce très grande	<i>Apiaceae</i>	<i>Heracleum maximum</i>	Tige et feuilles
#6b. Berce très grande	<i>Apiaceae</i>	<i>Heracleum maximum</i>	Fleurs et graines
#7. Pain de perdrix	<i>Rubiaceae</i>	<i>Mitchella repens</i>	Feuillage

#8a. Bouleau blanc	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula papyrifera</i>	Feuillage
#8b. Bouleau blanc	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula papyrifera</i>	Brindilles et branches
#8c. Bouleau blanc	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula papyrifera</i>	Phloème
#9a. Bouleau jaune	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula alleghaniensis</i>	Feuillage
#9b. Bouleau jaune	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula alleghaniensis</i>	Brindilles et branches
#9c. Bouleau jaune	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula alleghaniensis</i>	Brindilles et branches
#10a. Sumac vinaigrier	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Rhus typhina</i>	Feuillage
#10b. Sumac vinaigrier	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Rhus typhina</i>	Baies
#10c. Sumac vinaigrier	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Rhus typhina</i>	Baies
#11. Frêne rouge d'Amérique	<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	Feuillage
#12. Frêne blanc	<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus Americana</i>	Feuillage
#13. Frêne noir	<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus nigra</i>	Feuillage
#14. Frêne bleu	<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus quadrangulata</i>	Feuillage
#15. Frêne pubescent	<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus profunda</i>	Feuillage
#16. Frêne mandschurica	<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus mandschurica</i>	Feuillage

Tableau 2

Liste de composés testés pour leur activité antimicrobienne

Composé	Source
#1. Acide benzoïque	B-3250, Sigma
#2. Acide 4-Hydroxy-3-methoxybenzoïque	H36001, Aldrich
#3. Acide 2, 6-Dihydroxybenzoïque	D10, 960-6, Aldrich
#4. Acide 4-Methoxycinnamique	M1, 380. 7, Aldrich
#5. Acide 3, 4-Dihydroxybenzoïque	P-5630, Sigma
#6. 4-Hydroxy-3-methoxy-cinnalamaldehyde	382051-1G, Aldrich
#7. Acide ellagique	E-2250, Sigma
#8. Acide gallique	G-7384, Sigma
#9. Méthyl gallate	G-1140, Sigma
#10. Éthyl Gallate	48640, Fluka
#11. Acide cafféique	C-0625, Sigma
#12. Acide férulique	Sigma
#13. Acide o-Coumarique	C-4400, Sigma
#14. Acide m-Coumarique	C-5017, Sigma
#15. Acide p-Coumarique	Sigma
#16. Acide sinapique	78867, Fluka
#17. Acide gentisique	G-5254, Sigma
#18. Vanillal	V1104-2G, Aldrich
#19. Acide chlorogénique	C-3686, Sigma

Tableau 3
Activité antimicrobienne des fractions contre les microorganismes

Fractions des extraits (1 000 µg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Fraction 1 de l'extrait 3	-	+	-	-
Fraction 2 de l'extrait 3	+	+	-	+
Fraction 3 de l'extrait 3	-	+	-	+
Fraction 4 de l'extrait 3	-	+	-	-
Fraction 2 de l'extrait 8	-	+	-	-
Fraction 3 de l'extrait 8	-	+	-	-

Tableau 4
Activité antimicrobienne des extraits contre les microorganismes

Extrait (10 000 µg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
#4. Chimaphile à ombelles	+	+	+	+
#8b. Bouleau blanc	-	+	-	+
#8c. Bouleau blanc	-	+	-	+
#10b. Sumac vinaigrier	+	+	+	-
#10c. Sumac vinaigrier	+	+	+	-
#11. Frêne rouge de l'Amérique	-	+	-	+

Tableau 5
Activité antimicrobienne des composés contre les microorganismes

Composés (1 000 µg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. phlei</i>	<i>S. lactis</i>	<i>S. octosporus</i>
#8. Acide gallique	-	+	-	-	+	-	
#10. Éthyl Gallate	-	+	-	-	-	-	
#11. Acide cafféique	-	+	-	-	-	-	
#16. Acide sinapique	-	-	-	+			+
#17. Acide gentisique	-	-	-	+			+
#19. Acide chlorogénique	-	-	-	+			+

Tableau 6
CMI ($\mu\text{g/mL}$) des fractions contre les microorganismes

Fractions des extraits (1 000 $\mu\text{g/mL}$)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Fraction 1 de l'extrait 3	-	1 000	-	-
Fraction 2 de l'extrait 3	1 000	250	-	1 000
Fraction 3 de l'extrait 3	-	250	-	1 000
Fraction 4 de l'extrait 3	-	1 000	-	-
Fraction 2 de l'extrait 8	-	500	-	-
Fraction 3 de l'extrait 8	-	62. 5	-	-

Tableau 7
CIM ($\mu\text{g/mL}$) des extraits contre les microorganismes

Extrait (10 000 $\mu\text{g/mL}$)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
#1. Sapin baumier	-	2 500	-	-
#2. Pin gris	-	2 500	-	-
#3a. Pruche du Canada	-	10 000	-	-
#3b. Pruche du Canada	-	5 000	-	-
#3c. Pruche du Canada	-	5 000	-	-
#4. Chimaphile à ombelles	2 500	310. 25	10 000	2 500
#5. Chiogène hispide	-	10 000	-	-
#6a. Berce très grande	-	10 000	-	-
#6b. Berce très grande	-	5 000	-	-
#7. Pain de perdrix	-	2 500	-	-
#8a. Bouleau blanc	-	620. 5	-	-
#8b. Bouleau blanc	-	10 000	-	10 000
#8c. Bouleau blanc	-	10 000	-	10 000
#9a. Bouleau jaune	-	10 000	-	-
#9b. Bouleau jaune	-	10 000	-	-
#9c. Bouleau jaune	-	2 500	-	-
#10a. Sumac vinaigrier	-	1 250	-	-
#10b. Sumac vinaigrier	5 000	1 250	5 000	-
#10c. Sumac vinaigrier	5 000	1 250	10 000	-
#11. Frêne rouge d'Amérique	-	10 000	-	10 000
#12. Frêne blanc	-	10 000	-	-
#13. Black Ash	-	2 500	-	-
#14. Frêne bleu	-	5 000	-	-
#15. Frêne pubescent	-	5 000	-	-
#16. "Manchurian Ash"	-	2 500	-	-

Tableau 8
CIM ($\mu\text{g/mL}$) des composés contre les microorganismes

Composés (1, 000 $\mu\text{g/mL}$)	<i>S.</i> <i>E. coli</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>M.</i> <i>phlei</i>	<i>S. lactis</i>	<i>S.</i> <i>octosporus</i>
#8. Acide gallique	-	500	-	-	1 000	-	
#10. Éthyl Gallate	-	1 000	-	-	-	-	
#11. Acide cafféique	-	1 000	-	-	-	-	
#16. Acide sinapique	-	-	-	1 000			1 000
#17. Acide gentisique	-	-	-	1 000			1 000
#19. Acide chlorogénique	-	-	-	1 000			1 000

Références

Abou-Zaid, M. M. , Helson, B. V. , Beringer, C. W. et de Groot, P. (2000). “Phenolics from Deciduous Leaves and Coniferous Needles as Sources of Novel Control Agents for Lepidopteran Forest Pests”. In Shahidi, F. , Ho, C-T. *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, Champaign, IL, USA, AOCS Press, p. 398-417.

Ahn, Y-J. , Lee, C-O. , Kweon, J-H. , Ahn, J-W. et Park, J-H. (1998). “Growth-inhibitory effects of *Galla Rhois*-derived tannins on intestinal bacteria”, *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 84 no 3, p. 439-443.

Andersen, O. M. et Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, CRC Press.

Arnason, J. T. , Hebda, R. , Richard, J. et Johns, T. (1981). “Use of plants for food and medicine by native peoples of eastern Canada”, *Canadian Journal of Botany*. Vol. 59, p. 2189-2325.

Ayaz, F. , Hayirlioglu-Ayaz, S. , Alpay-Karaoglu, S. , Gruz, J. , Valentova, K. , Ulrichova, J. et Strnad, M. (2008). “Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities”, *Food Chemistry*, Vol. 107, no 1, p. 19-25.

Barah, F. et Gonçalves, V. (2010). “Antibiotic use and knowledge in the community in Kalamoon, Syrian Arab Republic : a cross-sectional study”, *East Mediterranean Health Journal*, vol. 16 no 5, p. 16-21.

Borchardt, J. R. , Wyse, D. L. , Sheaffer, C. C. , Kauppi, K. L. , Fulcher, R. G. , Ehlke, N. J. , Biesboer, D. D. et Bey, R. F. (2008). “Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin”, *Journal or Medicinal Plants Research*, vol. 2, no 4, p. 81-93.

Buckwold, F. J. et Ronald, A. R. (1979). “Antimicrobial misuse – effects and suggestions for control”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 5, p. 129-136.

Caldecott, T. (2010). *Pipsissewa*. <<http://www.toddcalddecott.com/index.php/herbs/learning-herbs/319-pipsissewa>>(page consulté le 12 septembre 2011).

Cos, P. , Vlietinck, A. J. , Berghe, D. V. et Maes, L. (2006). “Anti-infective potential of natural products : How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 106, no 3, p. 290-302.

Cowan, M. C. (1999). “Plant Products as Antimicrobial Agents”, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, p. 564-582.

Curcio, D. (2010). “Resistant pathogen-associated skin and skin-structure infections : antibiotic options”, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol. 8, no 9, p. 1019-1036.

Daneshtalan, M. (2008). “Discovery of chlorogenic acid-based peptidomimetics as a novel class of antifungals. A success story in rational drug design”, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 11, no 2, p. 44-55.

Dey, P. M. et Harborne, J. B. (1989). *Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1 : Plant Phenolic*. London, Academic Press.

Escaich, S. (2010). “Novel agents to inhibit microbial virulence and pathogenicity”, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, vol. 20, no 10, p. 1401-1418.

Eppinger, M. , Mammel, M. K. , Leclerc, J. E. , Ravel, J. et Cebula, T. A. (2011). “Genomic anatomy of Escherichia coli O157 :H7 outbreaks”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no 50, p. 20142-20147.

Galvan, I. , Mir-Rashed, N. , Jessulat, M. , Atanya, M. , Golshani, A. , Durst, T. , Petit, P. , Amiguet, V. , Boekhout, T. , Summerbell, R. , Cruz, I. , Arnason, J. et Smith, M. (2008). “Antifungal and antioxidant activities of the phytomedicine pipsissewa, *Chimaphila umbellata*”, *Phytochemistry*. Vol. 69, no 3, p. 738-746.

Hamouche, E. et Sarkis, D. K. (2011). “Evolution of susceptibility of antibiotics of Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii, in a University Hospital Center of Beirut between 2005 and 2009”, *Pathologie – Biologie*, vol. 60, no 3, e15-20.

Hancock, R. E. W. , Lory, S. et Olsen, M. V. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen", *Letters to Nature*, vol. 406, p. 959-964.

Harborne, J. B. (1994). *The Flavonoids : advances in research since 1986*. London, Chapman and Hall.

Hopley, L. et Schalkwyk J. V. (2006). "Mechanism of resistance to antimicrobials. <<http://www.anaesthetist.com/icu/infect/Findex.htm#resist.htm>>(page retrouvée le 13 septembre 2010).

Howden, B. P. , McEvoy, C. R. , Allen, D. L. , Chua, K. , Harrison, P. F. , Bell, J. , Coombs, G. , Bennett-Wood, V. , Porter, J. L. , Robins-Browne, R. , Davies, J. K. , Seemann, T. et Stinear, T. P. (2011). "Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalKR", *PLoS Pathogens*, vol. 7, no 11, e1002359.

Jarvis, W. R. (1996). "Preventing the Emergence of Multidrug-Resistant Microorganisms through Antimicrobial Use Controls : The Complexity of the Problem", *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. 17, no 8, p. 490-495.

Jayaraman, P. , Sakharkar, M. , Lim, C. , Tang, T. et Sakharkar, K. (2010). "Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*", *International Journal of Biological Sciences*, vol. 6, no 6, p. 556-568.

Jones, N. P. , Arnason, J. T. , Abou-Zaid, M. , Akpagana, K. , Sanchez-Vindas, P. et Smith, M. L. (2000). "Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 73, no 1-2, p. 191-198.

Kim, J. H. , Campbell, B. C. , Mahoney, N. , Chan, K. L. , Molyneux, R. J. et May, G. S. (2007). "Enhancement of fludioxonil fungicidal activity by disrupting cellular glutathione homeostasis with 2, 5-hydroxybenzoic acid", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 270, no 2, p. 284-290.

Kostova, I. et Iossifova, T. (2007). "Chemical components of *Fraxinus* species". *Fitoterapia*, vol. 78, no 2, p. 85-106.

Lee, Y. S. , Han, S. H. , Lee, S. H. , Kim, Y. G. , Park, C. B. , Kang, O. H. , Keum, J. M. , Kim, S. B. , Mun, S. H. , Shin, D. W. et Kwon, D. Y. (2011). "Synergistic effect of tetrandrine and ethidium bromide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)", *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 36, no 5, p. 645-651.

Lowy, F. D. (1998). "*Staphylococcus aureus* Infections", *The New England Journal of Medicine*, vol. 339, p. 520-532.

Madigan, M. T. , Martinko, J. M. and Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganism*, 8th Edition. US, Prentice Hall.

Mitscher, L. A. , Segaran, P. P. , Gentry, E. J. et Shankel, D. M. (1999). “Multiple Drug Resistance”. *Medicinal Research Reviews*, vol. 19, no 6, p. 477-496.

Moerman, D. E. (2004). *Native American Ethnobotany*. Portland, US, Timber Press Inc.

Nascimento, G. F. , Locatelli, J. Freitas, P. C. et Silva, G. L. (2000). “Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria”, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 31, p. 247-256.

Omar, S. , Lemonnier, B. , Jones, N. , Ficker, C. , Smith, M. L. , Neema, C. , Towers, G. H. N. , Goel, K. et Arnason, J. T. (2000). “Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 73, no 1-2, p. 161-170.

Pinheiro, L. , Nakamura, C. V. , Dias-Filho, B. P. , Ferreira, A. G. , Young, M. C. et Cortez D. A. (2003). “Antibacterial xanthenes from *Kielmeyera variabilis* mart. (Clusiaceae)”, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, no 4, p. 549-452.

Perna, N. T. , Plunkett, G. III. , Burland, V. , Mau, B. , Glasner, J. D. , Rose, D. J. , Mayhew, G. F. , Evans, P. S. , Gregor, J. , Kirkpatrick, H. A. , Posfai, G. , Hackett, J. , Klink, S. , Boutin, A. , Shao, Y. , Miller, L. , Grobeck, E. J. , Davis, N. W. , Lim, A. , Dimalanta, E. T. , Potamouisis, K. D. , Apocada, J. , Anantharaman, T. S. , Lin, J. , Yen, G. , Schwartz, D. C. , Welch, R. A. et Blattner, F. R. (2001). “Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*O157 :H7”, *Letters to Nature*, vol. 409, p. 529-533.

Rauha, J-P. , Remes, S. , Heinonen, M. , Hopia, A. , Kähkönen, M. , Kujala, T. , Pihlaja, K. , Vuorela, H. et Vuorela, P. (2000). “Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds”. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 56, no 1, p. 3-12.

Ressources Naturelles Canada. (2011). Ontario’s Natural Resources – Forests. http://www.ontario.ca/en/about_ontario/004464

Riddell, J. 4th. , and Kauffman, C. A. (2008). “The evolution of resistant *Candida* species in cancer centers : implications for treatment and prophylaxis”, *Cancer*, vol. 112, no 11, p. 2334-2337.

Sarker, K. D. , Nahar, L. et Kumarasamy, Y. (2007). “Microtitreplate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals”, *Methods*, vol. 42, no 2, p. 321-324.

Sato, Y. , Oketani, H. , Singyouchi, K. , Ohtsubo, T. , Kihara, M. , Shibata, H. et Higuti T. (1997). "Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of Terminalia chebula RETS, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 20. No 4, p. 401-404.

Stover, C. K. , Pham, X. Q. , Erwin, A. L. , Mizoguchi, S. D. , Warrenner, P. , Hickey, M. J. , Brinkman F. S. L. , Hufnagle, W. O. , Kowalik D. J. , Lagrou, M. , Garber, R. L. , Goltry, L. , Tolentino, E. , Westbrook-Wadmen, S. , Yuan, Y. , Brody, L. L. , Coulter, S. N. , Folger, K. R. , Kas, A. , Larbig, K. , Lim, R. , Smith, K. , Spencer, D. , Wong, G. K-S. , Wu, Z. , Paulsen, I. T. , Reizer, J. , Saier, M. H. , Sow, W. M. , Tzer Pin Lin, R. , Chu Sing Lim, L. , Sakharhar, K. R. et Sakharkar M. K. (2010). "In vitro drug interactions of gallates with antibiotics in Staphylococcus Aureus", *Frontiers in Bioscience*, vol. 2, p. 668-672.

Talaro-Park, K. (2008). *Foundations in Microbiology, Sixth Edition*. New York, New York, McGraw-Hill Companies, Incorporated.

Tenover, F. R. (2006). "Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria". *The American Journal of Medicine*, vol. 119, no 6, p. S3-S10.

Zhao, J. , Lou, J. , Mou, Y. , Li, P. , Wu, J. et Zhou, L. (2011). "Diterpenoid tanshinones and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activities", *Molecules*, vol. 16, no 3, p. 2259-2267.