

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

Boutures d'if canadien et japonais : Études de nutrition

**PAR
ISABELLE CARON**

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès science (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation :

Examineur externe	Jean Archambeault, Ph.D., Phytobiotech Inc.
Examineur interne	Alain Fournier, Ph.D. Centre de recherche en santé humaine
Directeur de recherche	Lolita Zamir, Ph.D., Centre de recherche en santé humaine

À mes parents,
Mes modèles de toujours

« les enseignants sont ceux qui jettent des ponts sur lesquels ils invitent les élèves à passer; une fois les élèves de l'autre côté, le pont s'écroule gaiement, incitant ceux qui viennent de le traverser à construire leurs propres ponts »

Nikos Kazantzakis

TABLE DES MATIÈRES

	Page
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xvi
AVANT-PROPOS.....	xvii
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	8
1.0 Taxanes et Taxol®.....	9
2.0 Biogénèse et biosynthèse du Taxol® chez l'if du Pacifique et l'if d'Europe	9
2.1 Formation et fonctionnalisation du diterpène.....	10
2.2 Formation et attachement de la chaîne latérale.....	22
3.0 Facteurs influençant la biosynthèse du Taxol®.....	26
4.0 Biogénèse et biosynthèse du Taxol® chez l'if du Canada.....	27
5.0 Taxanes de l'if du Japon.....	32
APPROCHE EXPÉRIMENTALE ET RÉSULTATS.....	35
1.0 Extraction et purification des taxanes des boutures de <i>T. canadensis</i> et <i>T. cuspidata</i>	35
1.1 Extraction à partir des tissus frais.....	35
1.2 Séparation et purification des taxanes d'intérêt.....	36
2.0 Purification des taxanes des boutures de <i>T. canadensis</i>	38
3.0 Purification des taxanes des boutures de <i>T. cuspidata</i>	52
4.0 Expériences de nutrition des tissus à partir de broyats d'aiguilles de <i>T. canadensis</i>	60
4.1 Récolte et entreposage des tissus.....	60

4.2 Nettoyage des tissus sélectionnés.....	61
4.3 Préparation des tissus.....	61
4.4 Expérience de nutrition des tissus à partir de broyats d'aiguilles de <i>T. canadensis</i>	62
4.4.1 Essai 1.....	63
4.4.2 Essai 2.....	64
4.4.3 Essai 3.....	65
4.5 Lavage des tissus nourris.....	66
4.6 Extraction des taxanes d'intérêt.....	67
4.7 Purification des taxanes d'intérêt.....	68
4.7.1 Purification de la 10-désacétylbaccatine III.....	68
4.7.2 Purification de la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III et du canadensène.....	70
4.7.3 Purification de la céphalomannine et du Taxol®.....	73
5.0 Expériences de nutrition des tissus à partir de plants bouturés de <i>T.</i> <i>canadensis</i> et <i>T. cuspidata</i>	78
5.1 Préparation des plants.....	78
5.2 Préparation de la solution nutritive et des montages.....	79
5.3 Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive.....	81
5.4 Lavage des tissus nourris.....	82
5.5 Extraction des taxanes d'intérêt.....	82
5.6 Purification des taxanes d'intérêt.....	83
DISCUSSION.....	90
1.0 Comparaison du contenu en taxanes des tissus matures de <i>T. canadensis</i> et de <i>T. cuspidata</i>	91
2.0 Comparaison du contenu en taxanes des boutures de <i>T. canadensis</i> et de <i>T. cuspidata</i>	91
3.0 Contenu en taxanes des boutures en comparaison aux tissus matures.....	94
4.0 Expériences de nutrition des tissus.....	96
4.1 Avec les broyats d'aiguilles de <i>T. canadensis</i>	96
4.2 Avec les boutures de <i>T. canadensis</i> et de <i>T. cuspidata</i>	97
CONCLUSION.....	101
REMERCIEMENTS.....	104
ANNEXES.....	106
Annexe 1.....	106
Annexe 2.....	120
Annexe 3.....	131

Annexe 4.....	132
Annexe 5.....	134
Annexe 6.....	136
Annexe 7.....	138
Annexe 8.....	140
Annexe 9.....	142
Annexe 10.....	145
Annexe 11.....	147
Annexe 12.....	149
Annexe 13.....	151
Annexe 14.....	153
Annexe 15.....	155
Annexe 16.....	157
Annexe 17.....	159
Annexe 18.....	160
Annexe 19.....	162
Annexe 20.....	165
Annexe 21.....	168
Annexe 22.....	171
Annexe 23.....	172
 BIBLIOGRAPHIE.....	 174

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Standards utilisés à des fins comparatives lors du processus de purification	37
Tableau 2 : Poids des 22 sous-fractions issues de la seconde séparation par chromatographie flash	42
Tableau 3 : Résultats des comparaisons de la sous-fraction 3 avec des standards de <i>T. canadensis</i>	48
Tableau 4 : Résultats des comparaisons sur CCM des fractions 4.2 et 4.3 avec des standards de <i>T. canadensis</i>	50
Tableau 5 : Résultats des comparaisons sur CCM des fractions 5.1 et 5.2 avec des standards de <i>T. canadensis</i>	51
Tableau 6 : Abondance des taxanes retrouvés au sein des boutures de <i>T. canadensis</i> et <i>T. cuspidata</i>	59
Tableau 7 : Fractions d'intérêt combinées suite à l'injection des extraits bruts d'aiguilles de <i>T. canadensis</i>	67

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Éleuthérobine et Taxol®	2
Figure 2 : L'if du Pacifique (<i>Taxus brevifolia</i>)	5
Figure 3 : L'if du Canada (<i>Taxus canadensis</i>)	6
Figure 4 : Système à trois cycles des taxanes	9
Figure 5 : Voie biosynthétique classique du pyrophosphate d'isopentényle et du pyrophosphate de diméthylallyle via l'acide mévalonique	12
Figure 6 : Voie biosynthétique de Rhomer menant à la formation du pyrophosphate d'isopentényle et du pyrophosphate de diméthylallyle	13
Figure 7 : Cyclisation du GGPP en taxa-4(5),11(12)-diène via un cation verticillène	15
Figure 8 : Diterpènes pouvant être biogénétiquement reliés aux taxanes	16
Figure 9 : Hydroxylation du taxa-4(5),11(12)-diène en taxa-4(20),11(12)-dièn-5 α -ol via une enzyme de type cytochrome P450	17
Figure 10 : Acétylation du taxa-4(20),11(12)-dièn-5 α -ol en son ester correspondant	18
Figure 11 : Taxusine	18
Figure 12 : Premier mécanisme suggéré par Della Casa de Mercano et ses collaborateurs pour la formation du cycle oxétane du paclitaxel	20
Figure 13 : Formation du cycle oxétane via la migration d'un acétate intramoléculaire tel que suggéré par Swindell et Britcher	20

Figure 14 :	Formation du cycle oxétane tel que suggéré par Potier et ses collaborateurs	21
Figure 15 :	Structure du diterpène de base du Taxol® (Baccatine III)	21
Figure 16 :	Voie biogénétique de la formation de la chaîne latérale du paclitaxel via l'acide cinnamique	23
Figure 17 :	Voie biogénétique de la formation de la chaîne latérale du paclitaxel via la β -phénylalanine	24
Figure 18 :	Formation et attachement de la chaîne latérale	26
Figure 19 :	Structure de la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III	28
Figure 20 :	Structure des nouveaux taxanes #1 et #2	29
Figure 21 :	Structure du canadensène, du 5-épi-canadensène et du 5-épi-cinnamoyl canadensène	29
Figure 22 :	Voies de biogénèse du canadensène	31
Figure 23 :	Schéma de purification des taxanes d'intérêt de l'extrait brut de boutures de <i>T. canadensis</i>	41
Figure 24 :	Schéma de purification des taxanes d'intérêt de l'extrait brut de boutures de <i>T. cuspidata</i>	54
Figure 25 :	Montage pour les expériences de nutrition des tissus à partir de broyats d'aiguilles d'if du Canada	61
Figure 26 :	Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour l'essai 1 des expériences de nutrition des tissus avec des broyats d'aiguilles de <i>T. canadensis</i>	64
Figure 27 :	Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour l'essai 3 des expériences de nutrition des tissus avec des broyats d'aiguilles de <i>T. canadensis</i>	66

Figure 28 :	10-désacétylbaccatine III purifiée lors de l'essai de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	69
Figure 29 :	10-désacétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	69
Figure 30 :	9-dihydro-13-acétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 1 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	71
Figure 31 :	9-dihydro-13-acétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	71
Figure 32 :	Canadensène purifié lors de l'essai 1 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	72
Figure 33 :	Canadensène purifié lors de l'essai 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	73
Figure 34 :	Taxol® purifié lors de l'essai 1 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	74
Figure 35 :	Taxol® purifié lors de l'essai 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	75
Figure 36 :	Céphalomannine purifiée lors de l'essai 1 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T.</i>	

	<i>canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	75
Figure 37 :	Céphalomannine purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de <i>T. canadensis</i> sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	76
Figure 38 :	Incorporations relatives obtenues lors de l'essai 1 de nutrition des tissus avec des aiguilles broyées de <i>T. canadensis</i>	77
Figure 39 :	Incorporations relatives obtenues lors de l'essai 3 de nutrition des tissus avec des aiguilles broyées de <i>T. canadensis</i>	78
Figure 40 :	Schématisation des montages utilisés pour les expériences de nutrition des tissus avec des boutures d'if	79
Figure 41 :	Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour les essais de nutrition avec des boutures de <i>T. canadensis</i>	81
Figure 42 :	Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour les essais de nutrition avec des boutures d'if de <i>T. cuspidata</i>	82
Figure 43 :	Taxol® purifié à partir des boutures de <i>T. canadensis</i> utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	84
Figure 44 :	Céphalomannine purifiée à partir des boutures de <i>T. canadensis</i> utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	85
Figure 45 :	10-désacétylbaccatine III purifiée à partir des boutures de <i>T. canadensis</i> utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	86
Figure 46 :	Canadensène purifié à partir des boutures de <i>T. canadensis</i> utilisées lors des expériences de	

	nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	86
Figure 47 :	9-dihydro-13-acétylbaccatine III purifiée à partir des boutures de <i>T. canadensis</i> utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	87
Figure 48 :	Taxanes cibles purifiés à partir des boutures de <i>T. cuspidata</i> utilisées lors des expériences de nutrition des tissus utilisant le mévalonate comme précurseur sur HPLC préparative (Binary LC Pump, Programme A, Annexe 3)	88
Figure 49 :	Incorporations relatives obtenues suite aux expériences de nutrition des tissus avec des boutures de <i>T. canadensis</i> . L'incorporation obtenue pour le Taxol® est utilisée comme point de référence	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% :	Pourcent
μCi :	Microcurie(s)
μL :	Microlitre(s)
μm :	Micromètre(s)
^{14}C :	Carbone 14
$^{14}\text{CO}_2$:	Gaz carbonique marqué au carbone 14
^3H :	Tritium
Ac :	-CO-CH ₃
AcOEt :	Acétate d'éthyle
ADT :	N-acétyl-N-débenzoyltaxol
BCTV :	Baccatine V
BDDB :	15-benzoyl-2-débenzoyl-7,9-diacétyl-abéobaccatine VI
Bz :	-CO-C ₆ H ₅
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CDN :	Canadensène
CEP :	Céphalomannine
CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
CH ₃ CN :	Acétonitrile
cm :	Centimètre(s)
CPM :	Comptes par minutes
DAB :	10-Désacétylbaccatine III
DBVI :	7,9-désacétylbaccatine VI
DCP :	2,10-diacétyl-5-cinnamoylphototaxicine II
DHB :	9-dihydro-13-acétylbaccatine III
DMAPP :	Diméthylallyldiphosphate
DTJ :	2-désacétoxytaxine J
DTN :	9-désacétyltaxinine E
DTT :	Dithiothréitol

DTX :	10-désacétyltaxol
EDTA :	Acide éthylènediamine tétraacétique
EtOH :	Éthanol
ETX :	7-épitaxol
FPP :	Farnésyl diphosphate
g :	Gramme(s)
g/L :	Gramme(s)/Litre
GD :	Distillé sous verre
GGPP :	Géranylgéranyl diphosphate
GPP :	Géranyl diphosphate
H ₂ SO ₄ :	Acide sulfurique
HAB :	10-hydroxyacétylbaccatine VI
HDB :	1β-hydroxy-7,9-désacétylbaccatine III
HPLC :	Chromatographie liquide de haute performance
hre :	Heure(s)
SM-FAB :	Spectométrie de masse de type FAB (Fast atom bombardment)
IPA :	Isopropanol
IPP :	Isopentényl diphosphate
L :	Litre(s)
MeOH :	Méthanol
mg :	Milligramme(s)
mg/L :	Milligramme(s) par litre
MgSO ₄ :	Sulfate de magnésium
min :	Minute(s)
mL :	Millilitre(s)
mm :	Millimètre(s)
mM :	Millimolaire(s)
Na ₂ SO ₄ :	Sulfate de sodium
NaCl :	Chlorure de sodium
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

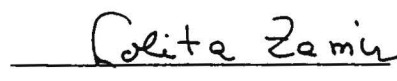
nm :	Nanomètre
°C :	Degré(s) Celsius
O ₂ :	Oxygène
Ph :	-C ₆ H ₅
R _f :	Rapport frontal
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SM :	Spectométrie de masse
TAB :	9,10,13-tridésacétyl-abéo-baccatine VI
TNB :	Taxine B
TNE :	Taxinine E
TNM :	Taxinine M
TNN :	Taxinine
TNO :	Taxinine-11,12-oxide
TP :	Température de la pièce
t _R :	Temps de rétention
TXC :	Taxcultine
TXL :	Taxol
TZG :	Taxézopidine G
UV :	Ultraviolets

RÉSUMÉ

L'analyse du contenu en taxanes de boutures de deux espèces d'ifs (*T. canadensis* et *T. cuspidata*) a été réalisée. Quatre taxanes dont deux sont majeurs (*O*-cinnamoyltaxicine I et 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I) ont été extraits pour la première fois de l'if du Japon. Des différences importantes dans les proportions de taxanes présents dans les plants bouturés, par rapport aux plants matures, ont également été observées chez les deux espèces étudiées. Il s'est avéré que le taxane majoritaire des boutures de l'if du Canada est la 10-désacétylbaccatine III (0,009%) et non la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III (0,008%) comme c'est le cas pour les tissus matures. Ces résultats donnent un appui supplémentaire à l'hypothèse selon laquelle les voies biosynthétiques des taxanes pourraient varier selon l'espèce et l'âge des tissus utilisés. Il devient donc d'autant plus important d'approfondir nos connaissances de ces voies et particulièrement, l'implication controversée du mévalonate en tant que précurseur.

Plusieurs expériences de nutrition des tissus ont été réalisées. Parmi celles-ci, une nouvelle méthode misant sur l'utilisation de plants bouturés a été testée. Cette dernière permet une absorption directe du précurseur via les racines et constitue un modèle beaucoup plus représentatif de l'environnement naturel entourant la biosynthèse des taxanes chez les ifs. Des incorporations similaires à celles obtenues via l'utilisation des techniques conventionnelles ont pu être observées. L'optimisation éventuelle de cette méthode laisse donc entrevoir la possibilité d'obtenir des taux d'incorporation supérieurs à ceux mesurés jusqu'à maintenant. Quant au mévalonate, bien qu'il semble être utilisé de façon préférentielle par l'if du Canada, des expériences supplémentaires seront essentielles pour s'assurer de la fiabilité de la nouvelle technique et ainsi pouvoir interpréter sans erreur les résultats obtenus.


Isabelle Caron


Lolita Zamir

AVANT-PROPOS

Le Taxol® (Paclitaxel) est un métabolite secondaire de l'if et présente des propriétés anticancéreuses surprenantes. Il est aujourd'hui grandement utilisé dans le traitement des cancers réfractaires du sein et des ovaires. De plus, on lui a découvert une activité significative contre plusieurs autres types de cancer. Étant donné cette utilisation grandissante du Taxol® dans les traitements de chimiothérapie, la demande pour ce produit naturel ne cesse de s'accroître. Or, comme ce taxane complexe n'est présent qu'en concentrations infimes dans les tissus de l'if (0,01% du poids sec de l'écorce), l'industrie pharmaceutique est présentement confrontée à d'importants problèmes d'approvisionnement. Cette rareté du produit contribue donc à en faire gonfler le prix de telle sorte qu'à peine un gramme du composé est aujourd'hui évalué à plus de 10 000\$.

Bien que des méthodes de semi-synthèse aient été mises au point et soient présentement utilisées pour pourvoir aux besoins médicaux en Taxol®, les rendements de production qu'elles permettent demeurent limités. En effet, ceux-ci sont totalement dépendants des quantités naturelles du taxane précurseur qu'ils impliquent et qu'il est possible d'extraire directement des tissus des ifs (0,01 à 0,12%)⁴⁷. Il est donc impératif d'élaborer de nouvelles méthodes d'approvisionnement qui permettraient une production rentable, à grande échelle et indépendante de la disponibilité naturelle d'un quelconque taxane. Or, cela passe nécessairement par une compréhension détaillée des voies de biosynthèse des taxanes au sein des tissus de l'if, des connaissances qui jusqu'à maintenant, demeurent malheureusement plus qu'incomplètes.

INTRODUCTION

Le Taxol® est un agent anticancéreux qui a été découvert au milieu des années soixante. C'est l'identification du pouvoir cytotoxique d'extraits d'écorce d'if du Pacifique par Arthur Barclay en 1962 qui conduisit à l'isolement du composé actif puis, à l'élucidation de sa structure¹⁴³. La découverte du Taxol® a révolutionné le traitement du cancer. Celui-ci permit en effet l'identification d'une nouvelle famille d'agents anticancéreux. Contrairement aux agents conventionnels qui eux, empêchent l'assemblage de la tubuline en microtubules, le Taxol® favorise la formation d'un fuseau mitotique hyperstable qui devient, par le fait même, incapable de se désassembler¹⁰⁷. Il a en effet la capacité de détruire les cellules cancéreuses en provoquant un arrêt de leur cycle cellulaire en phase G₂/M^{50,51,84}. Comme les cellules cancéreuses ont un taux de division beaucoup plus rapide que les cellules saines, le composé attaque principalement les tumeurs. La puissance de l'action antitumorale du Taxol® conduisit même le National Cancer Institute (États-Unis) à entreprendre, vers la fin des années soixante-dix, une série d'essais cliniques^{62,96,145,103}. Le mode d'action du Taxol® pourrait toutefois être moins unique que les scientifiques ne l'ont cru jusqu'à maintenant. L'éléuthérobine, un produit naturel récemment extrait de coraux mous marins⁷², aurait une action cytotoxique similaire (figure 1). Cette activité anti-tumorale est cependant beaucoup moins puissante⁷².

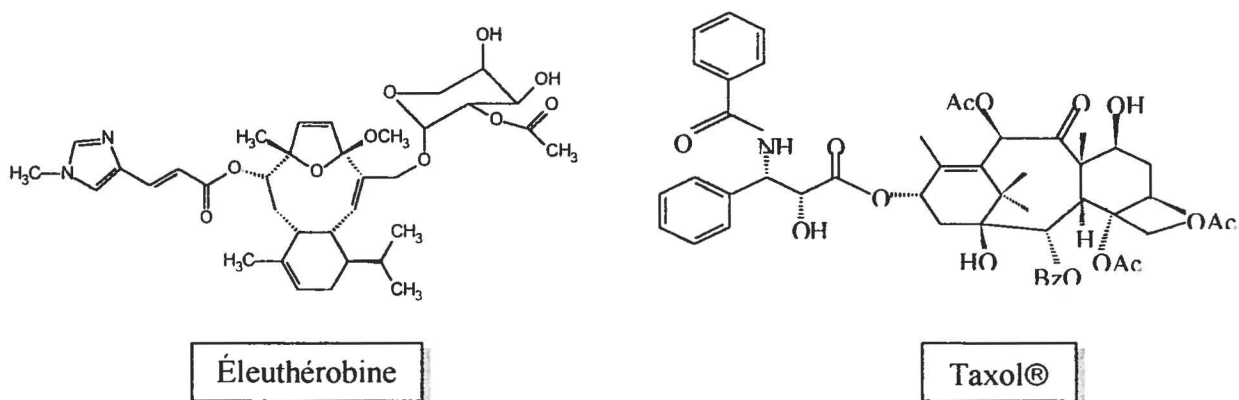


Figure 1. Éleuthérobine et Taxol®

L'efficacité du Taxol® lui serait conférée par son mode d'action à niveaux multiples. En effet, Heinstein *et al.* (1994) ont rapporté qu'il serait en mesure de mimer l'effet de polysaccharides en stimulant la sécrétion du facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNF- α) ainsi que d'interleukine-1 (IL-1)^{8,18,56,88}. Il régulerait également à la baisse le nombre de récepteurs du facteur nécrosant des tumeurs 2 (TNF-2). Finalement, le Taxol® pourrait être impliqué dans le déclenchement des mécanismes d'apoptose puisqu'il semble en effet, interagir de façon directe avec le récepteur cellulaire Bcl-2⁹⁸.

C'est principalement pour le traitement des cancers réfractaires du sein et des ovaires que le Taxol® a jusqu'à présent été utilisé^{104,122}. Toutefois, des applications de plus en plus étendues lui sont découvertes d'années en années de telle sorte que la demande pour ce médicament ne cesse de s'accroître^{92,121}. Il est donc devenu primordial de trouver des alternatives aux méthodes conventionnelles de production (synthèse totale, semi-synthèse). L'if est un conifère à croissance extrêmement lente. L'extraction à partir de l'écorce de l'arbre est très destructrice et met en péril la disponibilité de la ressource naturelle. Malheureusement, les méthodes de synthèse totale mises au point se sont révélées bien peu rentables quoique très élégantes^{48,74,85,86,87,105,140}. Elles nécessitent beaucoup trop d'étapes ce qui rend le processus très long et très coûteux. On parvient maintenant à produire le Taxol® par semi-synthèse à partir d'un composé majoritaire extrait des aiguilles de l'if d'Europe (*Taxus baccata*), la 10-désacétylbaccatine III (DAB)³⁸. De plus, Zamir *et al.* ont aussi isolé un composé majoritaire, la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III (DHB) de l'if Canadien et l'ont transformée en Taxol®¹⁵⁷. Cependant, les rendements de production demeurent limités par l'abondance naturelle de ces précurseurs.

Une optimisation de la production doit nécessairement passer par la mise au point d'un procédé complètement indépendant de la plante elle-même. L'élaboration d'une telle méthode implique toutefois une compréhension détaillée des voies biosynthétiques des taxanes chez l'if. Malheureusement, bien peu d'informations

sont actuellement disponibles sur le sujet. Il est donc essentiel d'entreprendre de telles études. Celles-ci permettront éventuellement l'identification de chacun des intermédiaires de la voie et de chacune des enzymes impliquées dans leurs transformations. Les gènes codant pour ces enzymes pourront à leur tour être identifiés et étudiés en détail. Cela permettra, éventuellement, l'utilisation de notions de génie génétique pour la maximisation de la production du Taxol®^{19,108,134,43}.

L'if appartient à la famille des *Taxacées*. Ceux-ci, avec les *Pinacées* (pin, mélèze, sapin...) et les *Cupressacées* (genévrier, thuija...) forment une sous-division appelée « Gymnospermes »³⁵. Il s'agit, au Québec, du groupe de plantes vasculaires (environ 700 espèces) le plus souvent résineuses qui demeurent vertes tout au long de l'année. Les Gymnospermes sont souvent désignés sous le vocable de « conifères ». Les *Taxacées* sont pour leur part des arbres ou des arbustes généralement peu ou pas résineux. Cette famille comprend 11 genres divisés en 95 espèces et ce, dans les deux hémisphères du globe. Les ifs ont une croissance très lente de telle sorte qu'ils peuvent facilement mettre une centaine d'années à atteindre la maturité. Certains sont particulièrement imposants comme l'if du Pacifique (figure 2) (26 mètres de hauteur) alors que d'autres sont plutôt chétifs (2 mètres de hauteur) comme par exemple, l'if du Canada (figure 3).

Le choix de l'if du Canada pour la réalisation des études de biosynthèse apparaît plus que justifié. En effet, cette espèce est très particulière, autant du point de vue morphologique que dans son contenu en taxanes (Zamir *et al.*, 1999 et autres références citées dans cet ouvrage). Contrairement à ses cousins du Pacifique et d'Europe, l'if du Canada est un petit arbuste rampant et non un arbre mesurant plusieurs mètres de hauteur. Par contre, malgré cette particularité morphologique peu commune chez les ifs, il renferme un éventail beaucoup plus diversifié de composés de même que des taxanes qui lui sont tout à fait uniques.

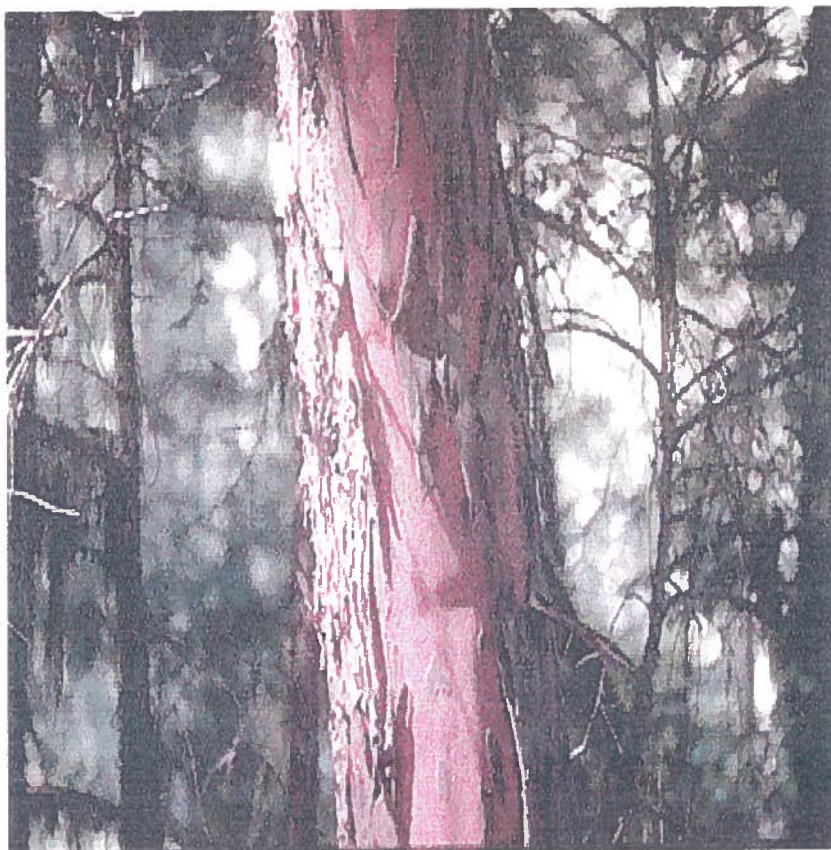


Figure 2. L'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*)

Les *Taxacées* pourraient toutefois ne pas être les seuls à produire du Taxol®. En effet, des études récentes ont permis de découvrir que les noisetiers seraient en mesure de produire ce métabolite secondaire complexe dans leurs feuilles, leurs tiges et leurs fruits¹¹. Un champignon endophyte retrouvé chez le noisetier serait également capable de synthétiser le Taxol®.

Il est donc essentiel de déterminer les principales étapes de la biosynthèse des taxanes chez l'if du Canada. De façon plus spécifique, il s'agit d'abord de déterminer si le contenu en taxanes majeurs des boutures est identique à celui des tissus matures. Il faut également déterminer si les taxanes majeurs propres à l'if du Canada sont identiques à ceux de l'if d'Europe.

Cela passe également par la mise au point une méthode efficace de nutrition des tissus qui permettra l'étude subséquente des voies de biosynthèse. Celle-ci peut se faire en adaptant les informations présentement disponibles dans la littérature sur les cultures cellulaires d'ifs.



Figure 3. L'if du Canada (*Taxus canadensis*)

Ces études de la biosynthèse des taxanes passent aussi par la réalisation d'essais sur différents systèmes tissulaires et cellulaires (sections de plants, plants entiers, suspensions cellulaires, différentes espèces d'ifs, etc.). C'est la comparaison des résultats obtenus au sein de ces différents systèmes qui pourra permettre une compréhension précise et globale de la dynamique entourant ces voies.

Bien que de telles expériences de nutrition des tissus n'aient jusqu'à maintenant été que très peu utilisées chez les ifs, elles sont toujours fondées sur l'utilisation

de précurseurs marqués radioactivement. En effet, l'utilisation de la radioactivité permet l'usage d'une quantité de matériel extrêmement petite ce qui facilite grandement la détection des composés synthétisés *de novo*. Connaissant les faibles taux d'incorporation obtenus chez les végétaux (soit au maximum 0,1 à 0,2 %), de telles caractéristiques s'avèrent très avantageuses. Les résultats obtenus lors de ces multiples études de nutrition des tissus pourront permettre d'apporter des précisions importantes sur les mécanismes de biosynthèse du Taxol® et des taxanes chez l'if du Canada.

REVUE DE LITTÉRATURE

1.0 Taxanes et Taxol®

Les taxanes constituent une famille de composés naturels comprenant au-delà de 350 membres^{11,16,77,113,114,115,116}. Ceux-ci sont caractérisés par la présence d'un système à trois cycles (figure 4) et diffèrent les uns des autres par leur patron d'oxygénation, la nature de leur chaîne latérale ainsi que par leur environnement aux carbones 4 et 20³.

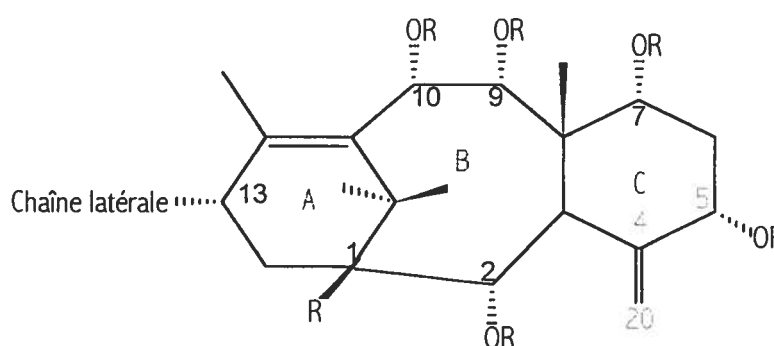


Figure 4. Système à trois cycles des taxanes

Le Taxol®^{39,52,57,90} est, à ce jour, le membre le plus complexe de cette famille¹³⁵. Bien que peu d'informations soient présentement disponibles sur la biosynthèse des taxanes chez les ifs, le Taxol® demeure le composé sur lequel la majorité des travaux de ce type ont été réalisés^{33,46,63}.

2.0 Biogénèse et biosynthèse du Taxol® chez l'if du Pacifique et l'if d'Europe

Le peu d'informations aujourd'hui disponibles sur la biosynthèse des taxanes provient majoritairement de modèles théoriques. Ceux-ci ont été élaborés selon l'état actuel de nos connaissances générales en matière de biosynthèse au sein de l'ensemble du règne végétal^{4,6,36,61,65,66,67,73,132}. Quelques études expérimentales ont toutefois été réalisées, *in vivo*, à l'aide de marqueurs radioactifs comme le tritium (³H) et le carbone 14 (¹⁴C) ou encore d'isotopes stables (deutérium; ²H et

carbone 13; ^{13}C)¹⁵⁰. De plus, des sections précises, des suspensions ou encore des cultures cellulaires de ces végétaux ont été utilisées pour la réalisation de plusieurs études^{1,7,12,27,31,45,76,79,91,94,95}. Cependant, l'utilisation de cultures cellulaires conduit le plus souvent à l'obtention de taxanes distincts de ceux généralement obtenus suite à des extractions sur du matériel frais. Il semble donc probable que les voies biosynthétiques favorisées dans ce type de milieu diffèrent de celles prévalant en milieu naturel. Ce phénomène pourrait d'ailleurs s'expliquer par l'utilisation de milieux de culture divers souvent adaptés aux fins précises des travaux de recherche effectués^{30,28,127}. De plus, les cultures cellulaires ne permettent l'obtention que de quantités minimales de taxanes. Toutefois, certaines équipes de recherche sont récemment parvenues à obtenir des rendements plus intéressants en modifiant les systèmes de culture⁷⁸. De faibles concentrations sont aussi une problématique fréquente à laquelle il faut également faire face lors de l'utilisation de microorganismes producteurs de Taxol®^{20,68,83,124,125,126,129,162}.

La biosynthèse du Taxol® peut être divisée en trois grandes avenues:

- 1) La formation et la fonctionnalisation du diterpène (corps de la molécule)
- 2) La formation de la chaîne latérale
- 3) L'assemblage des deux fragments pour former la molécule finale

2.1 Formation et fonctionnalisation du diterpène

Le géranylgéranyl diphosphate (GGPP) étant le précurseur universel des diterpènes, il est, par conséquent, à l'origine de la charpente hydrocarbonée des taxanes⁴⁶. Celui-ci est formé selon le modèle de biosynthèse des isoprénoïdes. Ces molécules sont des unités à cinq carbones qui pourraient être synthétisées via deux voies biosynthétiques distinctes^{69,70,75}. La première (figure 5) est la voie classique via l'acide mévalonique. Selon cette voie, le GGPP serait synthétisé par

l'association de plusieurs molécules d'isopentényl diphosphate (IPP) et de diméthylallyldiphosphate (DMAPP). Ces deux composés sont en équilibre isomérique et sont produits à partir de l'acétate via l'acide mévalonique¹⁰². L'implication du mévalonate comme bloc de construction du Taxol® a d'ailleurs été démontrée en 1992¹⁵⁰. L'association de plusieurs molécules d'IPP conduirait à la formation de géranyl diphosphate (GPP) et de farnésyl diphosphate (FPP) qui, une fois fusionnés, engendreraient le GGPP.

La seconde voie de biosynthèse est celle de Rhomer^{24,106,112} (figure 6). Selon cette voie alternative, l'IPP et le DMAPP seraient formés via un aldéhyde acétique activé par la thiamine ainsi qu'un hydroxyacétone phosphate^{99,100,101}. L'aldéhyde acétique impliqué serait formé au cours de la décarboxylation de molécules de pyruvate¹⁰².

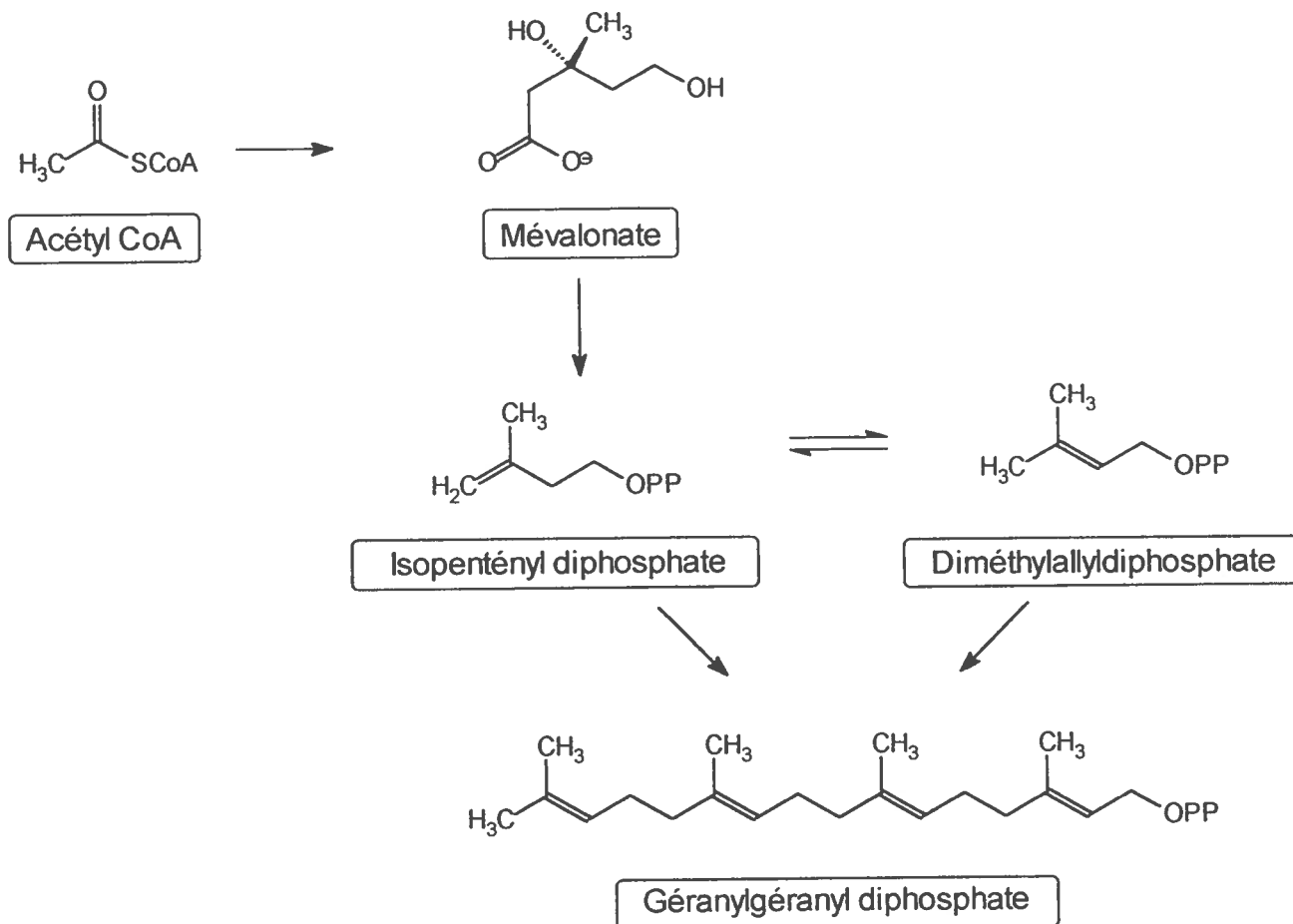


Figure 5. Voie biosynthétique classique de l'isopentényl diphosphate et du diméthylallyldiphosphate via l'acide mévalonique.

Le mécanisme de la dernière étape menant à la formation du DMAPP selon la voie de Rhoderic n'est toutefois pas très claire. Suite à leur formation, les molécules d'IPP et de DMAPP seraient combinées pour former le GGPP, comme dans la voie classique via l'acide mévalonique⁵³. Le GGPP subirait ensuite une cyclisation menant à la production du taxa-4(5),11(12)-diène et à la formation du squelette tricyclique du Taxol®^{37,105}.

Cette cyclisation a été étudiée en détail et la taxadiène synthase, l'enzyme catalysant la réaction, a été très bien caractérisée^{51,64}. Son étude a même permis de découvrir que cette catalyse se fait de façon très lente et que cette transformation ralentie du GGPP jouerait un rôle important dans le contrôle du flux de la voie de biosynthèse⁴⁷. De plus, cette étape semble être limitante car il a été démontré qu'elle était progressivement inhibée par une accumulation de paclitaxel dans les tissus.

L'étude approfondie du mécanisme de la cyclisation n'a cependant pas permis la détection d'intermédiaires libres au cours de la formation du taxadiène. Cette cyclisation pourrait donc être réalisée directement mais elle impliquerait le transfert intramoléculaire d'un hydrogène, à partir du C11 d'un cation verticillène intermédiaire vers le cycle C du taxadiène (figure 7)¹³¹. Il résulterait de ce transfert la fermeture des anneaux B et C, suivie d'une déprotonation en C5 menant au taxa-4(5),11(12)-diène⁷¹. La durée de vie de l'intermédiaire «cation verticillène» serait cependant si courte qu'il pourrait être impossible de le détecter. Il est par contre à noter que l'existence d'un tel intermédiaire n'a encore jamais été prouvée et que ces allégations demeurent tout à fait hypothétiques.

Plusieurs autres hypothèses quant à la possible formation d'intermédiaires lors de la cyclisation du GGPP ont été émises (figure 8). Certaines stipulent que le cembreène ou le verticillol, des composés naturellement retrouvés chez les conifères, pourraient être produits au cours de la cyclisation. Le verticillol résulterait de la formation d'une seconde liaison entre les C15 et C10³⁷. Une déshydratation du verticillol conduirait pour sa part au verticillène. Le casbène, a aussi été proposé comme intermédiaire possible. Aucune de ces substances n'a toutefois été détectée lors des études de biosynthèse visant à prouver leur existence. Ces expérimentations ont même échoué dans leurs tentatives à démontrer le rôle de précurseur de tels composés dans la biosynthèse du Taxol®. Ces résultats négatifs ne permettent cependant pas de conclure que l'existence de ces intermédiaires est totalement impossible⁴⁶.

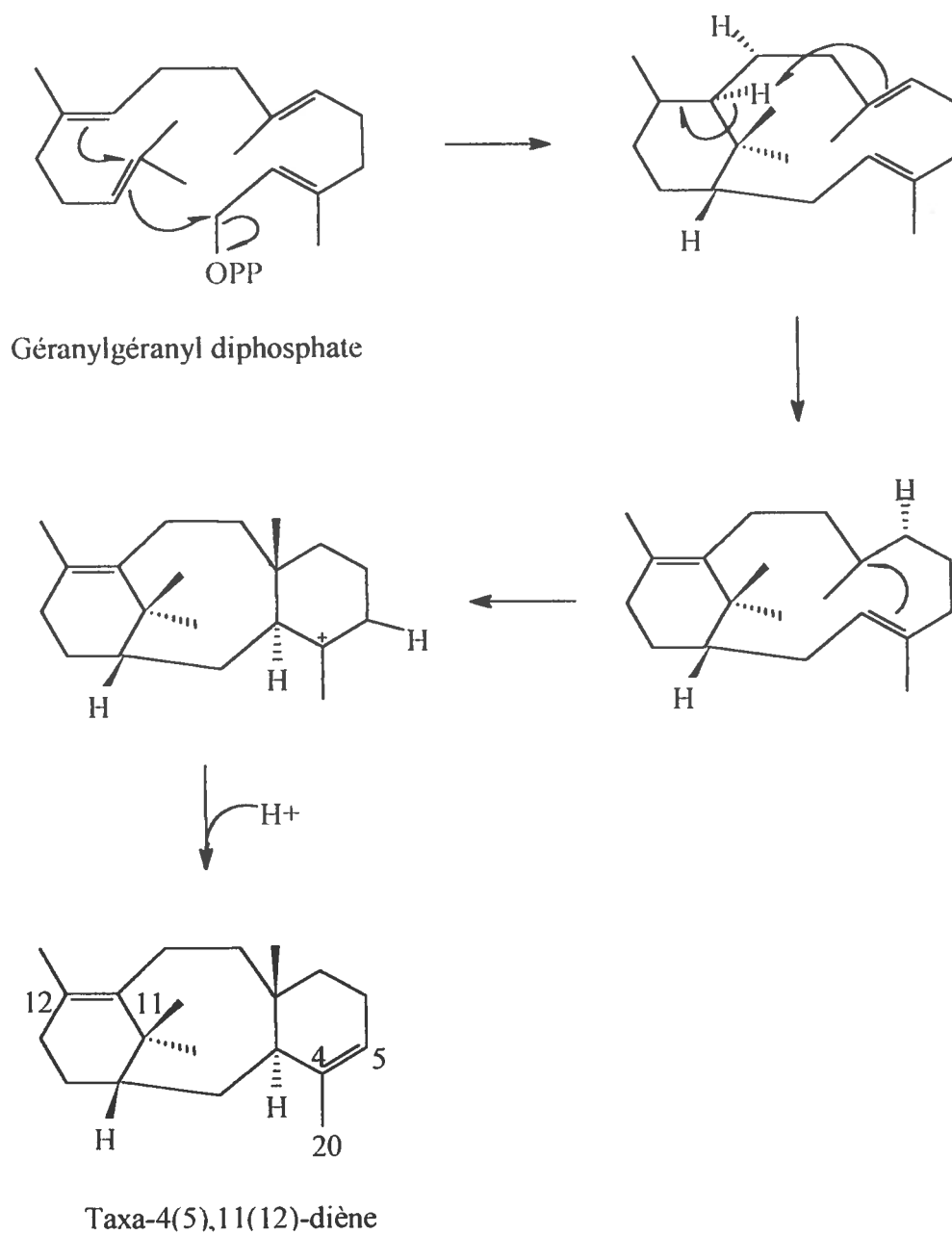


Figure 7. Cyclisation du GGPP en taxa-4(5),11(12)-diène via un cation
Verticillène⁴⁶

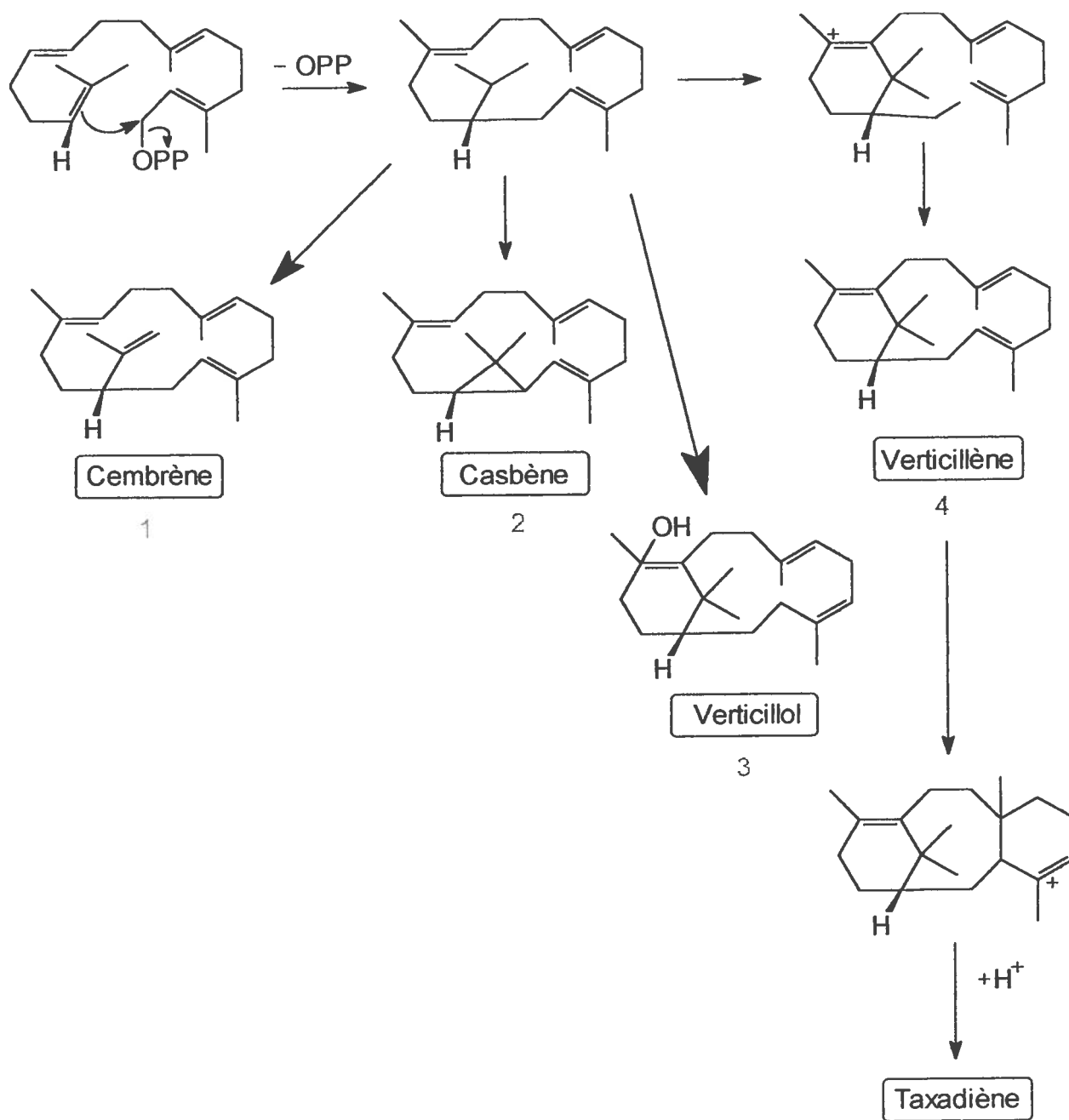


Figure 8. Diterpènes pouvant être biogénétiquement reliés aux taxanes³⁷

Suite à sa formation, le taxa-4(5),11(12)-diène est transformé en un alcool par une hydroxylase, la taxa-4(5),11(12)-dièn-5 α -hydroxylase^{42,102}. Cette réaction est nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et oxygène (O₂) dépendante. L'enzyme impliquée serait de type cytochrome P450 (figure 9). Bien que cette conversion soit connue dans ses grandes lignes, il n'a pas été prouvé qu'elle soit réalisée via la formation d'un intermédiaire époxyde ou via l'insertion directe d'un oxygène en C5⁴⁶. Il apparaît que lors de cette hydroxylation surviendrait une migration de la double liaison de l'intérieur vers l'extérieur du cycle. De plus, un équilibre pourrait exister entre les deux composés ainsi obtenus.

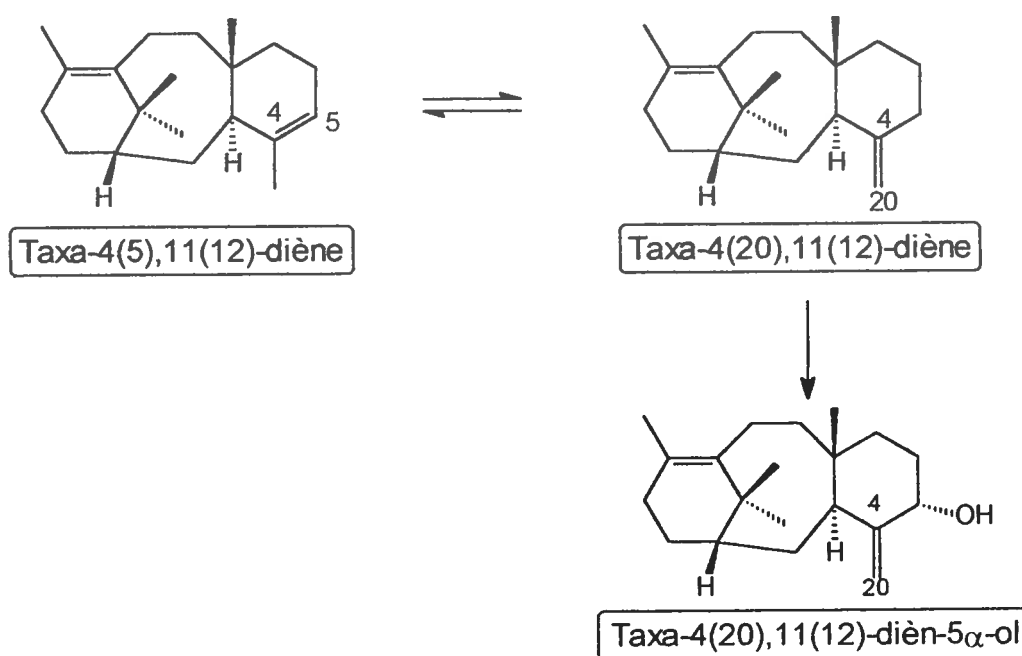


Figure 9. Hydroxylation du taxa-4(5),11(12)-diène en taxa-4(20),11(12)-dièn-5 α -ol via une enzyme de type cytochrome P450⁴²

L'abondance en taxanes acétylés suggère qu'une réaction d'acétylation surviendrait (figure10) par la suite¹⁶¹. De plus, le groupement acétate du taxa-4(20),11(12)-ène-5 α -acétate formé pourrait jouer un rôle dans la formation du

cycle oxétane selon le mécanisme illustré à la figure 12⁴⁰. C'est une acétyltransférase qui semble catalyser cette conversion acétyl Coenzyme A dépendante du taxa-4(20),11(12)-diène-5 α -ol en son ester correspondant (figure 10)^{42,138,139}.

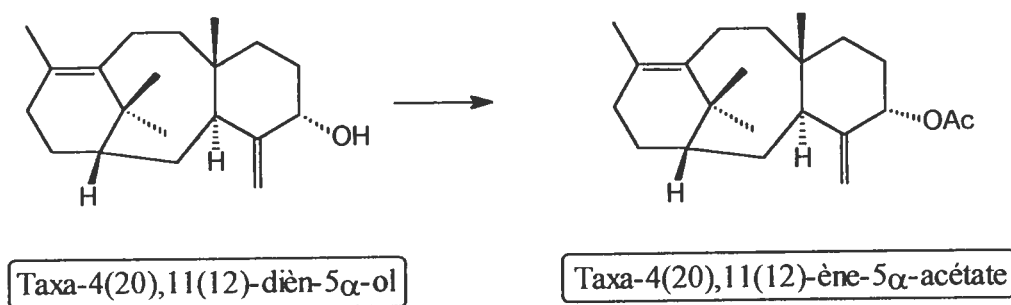


Figure 10. Acétylation du taxa-4(20),11(12)-diène-5 α -ol en son ester correspondant¹³⁹

La voie de biosynthèse implique ultérieurement, l'avènement de réactions additionnelles permettant la transformation du taxa-4(20),11(12)-ène-5 α -acétate en baccatine III. Ces réactions subséquentes sont une série d'oxygénations, d'acétylations de groupements hydroxyles, d'oxydations de cétones ainsi que la formation du cycle oxétane, un élément

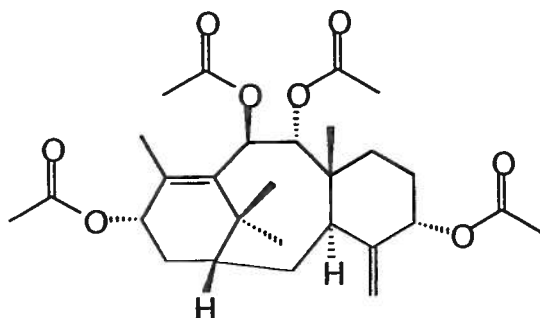


Figure 11. Taxusine

essentiel à l'activité de la molécule. L'ordre dans lequel surviendraient ces transformations demeure toujours non élucidé. Des hypothèses ont par contre été

émises suite à la comparaison de la structure des taxanes naturels oxygénés les plus abondants³⁷.

Des études de nutrition des tissus ont aussi été réalisées avec de l'écorce de l'if du Pacifique afin d'identifier des précurseurs formés au début de la série d'oxygénations. Pour ce faire, la taxusine (figure 11) a été transformée en tétraol renfermant du ^{13}C et du ^2H sur le groupement exométhylène en C20. Cependant, aucun enrichissement n'a pu être détecté au cours des analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN)³⁷. Des expériences supplémentaires sont donc actuellement tentées par Floss et ses collaborateurs afin d'enlever de façon sélective les fonctions oxygénées de la taxusine et ainsi obtenir des composés apparaissant plus tôt dans la voie de biosynthèse. Ces composés seront par la suite utilisés, toujours par le même groupe de recherche, pour des expériences de nutrition similaires à celles réalisées avec le tétraol³⁷.

Selon les modèles théoriques élaborés, il y aurait d'abord oxygénation en C10 puis, en C2, en C9 et en C13. Cette série d'oxygénations serait suivie de l'acétylation de certains des oxygènes introduits sur le squelette de carbone soit, les oxygènes en C2 et C10¹⁰². Suite à cela, il y aurait introduction de nouveaux oxygènes en C7 et C1. L'oxygénation au niveau de ce dernier carbone serait probablement l'une des dernières étapes de la biosynthèse du Taxol® et pourrait même survenir après la formation du cycle oxétane. Une fois ces substitutions complétées, il y aurait époxidation de la molécule et formation du cycle oxétane^{37,102}.

Trois mécanismes ont été suggérés quant à la formation de ce quatrième cycle. Une première voie de biosynthèse (figure 12) propose l'ouverture de l'époxide en un triol. Celui-ci serait par la suite cyclisé pour former le cycle oxétane connu des taxanes¹⁷.

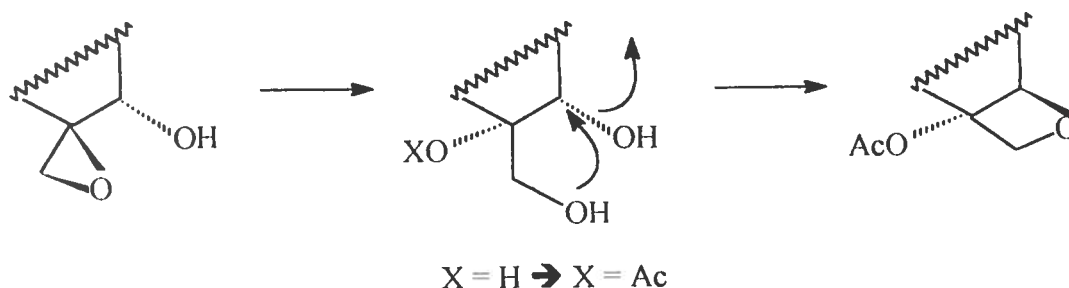


Figure 12. Premier mécanisme suggéré par Della Casa de Mercano et coll. pour la formation du cycle oxétane du Taxol®¹⁷

Swindell et Britcher ont quant à eux proposé un second modèle suggérant pour sa part un réarrangement direct de l' α -hydroxyépoxide (figure 13). Ils ne sont toutefois pas parvenus à observer cette transformation en laboratoire. Ils ont plutôt obtenu une α -hydroxyméthylcétone³⁷.

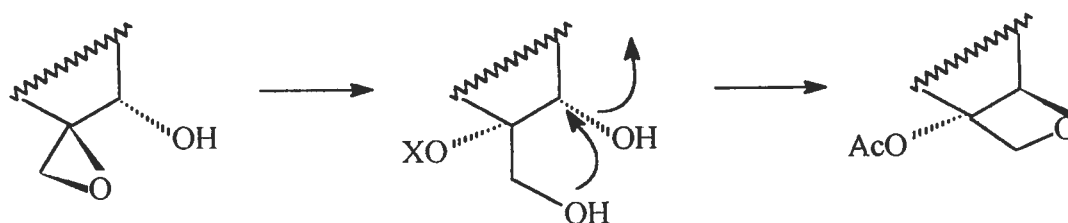


Figure 13. Formation du cycle oxétane via la migration d'un acétate intramoléculaire tel que suggéré par Swindell et Britcher³⁷

Finalement, Potier et ses collaborateurs ont avancé un troisième mécanisme de formation du cycle oxétane (figure 14). Selon ce dernier modèle, il y aurait réarrangement de l'acétoxyépoxide via la migration d'un groupement acétate du carbone 5 au carbone 4⁴⁰.

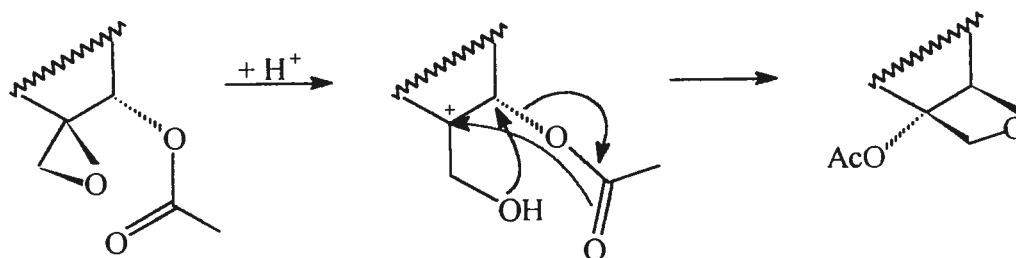


Figure 14. Formation du cycle oxétane tel que suggéré par Potier et coll.³⁷

Bien que le premier mécanisme soit désormais exclu, les deux autres modèles avancés demeurent toujours plausibles¹⁰².

La formation du cycle oxétane constitue l'une des dernières étapes de la biosynthèse du diterpène. Cependant, deux réactions supplémentaires surviendraient après sa formation soit, une acétylation en C13 et finalement, une oxydation en C9 menant à la formation d'une cétone (figure 15)³⁷.

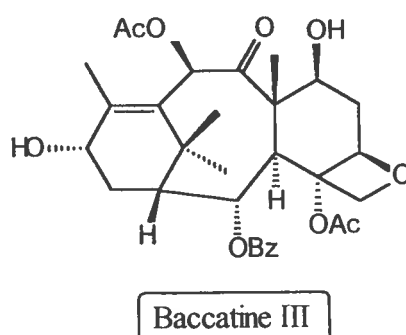


Figure 15. Structure du diterpène de base du Taxol®³⁷

2.2 Formation et attachement de la chaîne latérale

Les chercheurs ayant travaillé sur la biosynthèse de la chaîne latérale sont relativement peu nombreux et c'est principalement à Flemming^{32,33,34}, Floss^{36,37} et Mocek³⁷ que l'on doit l'état actuel de nos connaissances sur le sujet.

La chaîne latérale du taxol dérive entièrement de blocs de construction de phénylalanine^{9,32,150}. Elle peut prendre plusieurs formes au sein des différents taxanes:

- 1) Chaîne N,N-diméthyl-β-phénylalanine (C3')
- 2) Chaîne d'acide cinnamique
- 3) Chaîne de phénylisosérine N-acétylée (C2' et C3')

La chaîne latérale du Taxol® se présente sous la forme d'une phénylisosérine N-acétylée et constitue un élément essentiel à l'activité anti-tumorale de la molécule³². Toutefois, il s'est avéré que certains taxanes dépourvus de chaîne latérale en C13 jouissent quand même d'une activité anti-tumorale significative¹⁴⁷.

Au départ, plusieurs hypothèses ont été proposées quant à l'origine de la chaîne latérale du Taxol®. Leete et Bodem suggérèrent les premiers, en 1966, que la taxine était sans doute dérivée de l'acide de Winterstein. Cette affirmation fut d'ailleurs confirmée par des études de biosynthèse réalisées par le groupe du Dr. Zamir¹⁵⁰. Ces expérimentations furent faites à partir de phénylalanine (³H) et de mévalonate (¹⁴C) incorporés par nutrition dans de jeunes aiguilles de l'if du Canada. Or, le ratio (³H/¹⁴C) obtenu suite à l'hydrolyse du Taxol® produit confirme la théorie de l'acide de Winterstein¹⁵⁰.

Leete et Bodem émirent donc une hypothèse selon laquelle la chaîne latérale tirerait son origine de la phénylalanine et serait formée via l'acide cinnamique (figure 16). Selon cette hypothèse, la phénylalanine serait aminée par une réaction phénylalanine ammonia-liase³⁷. Des études ultérieures réalisées par Haslam et ses collaborateurs ont toutefois démontré qu'une telle réaction n'avait pas lieu. En effet, la chaîne latérale serait formée par une perte de l'hydrogène pro-3R ainsi qu'une rétention de l'hydrogène pro-3S de la phénylalanine. Or, cela ne concorde pas avec la théorie de Leete et Bodem où il devrait théoriquement y avoir formation de la chaîne latérale par perte de l'hydrogène pro-S de la phénylalanine³⁷.

Il a également été proposé que la chaîne latérale puisse être formée à partir de la phénylalanine mais via l'acide cinnamique ou son époxyde. Cependant, des expériences de nutrition sur du cambium de l'if du Pacifique n'a permis la détection d'aucune incorporation autant de l'acide cinnamique que de son époxyde. Au contraire, la β -phénylalanine et la phénylisosérine furent grandement incorporées^{28,32}. Il a donc été établi que l'acide cinnamique n'était pas un précurseur de la chaîne latérale.

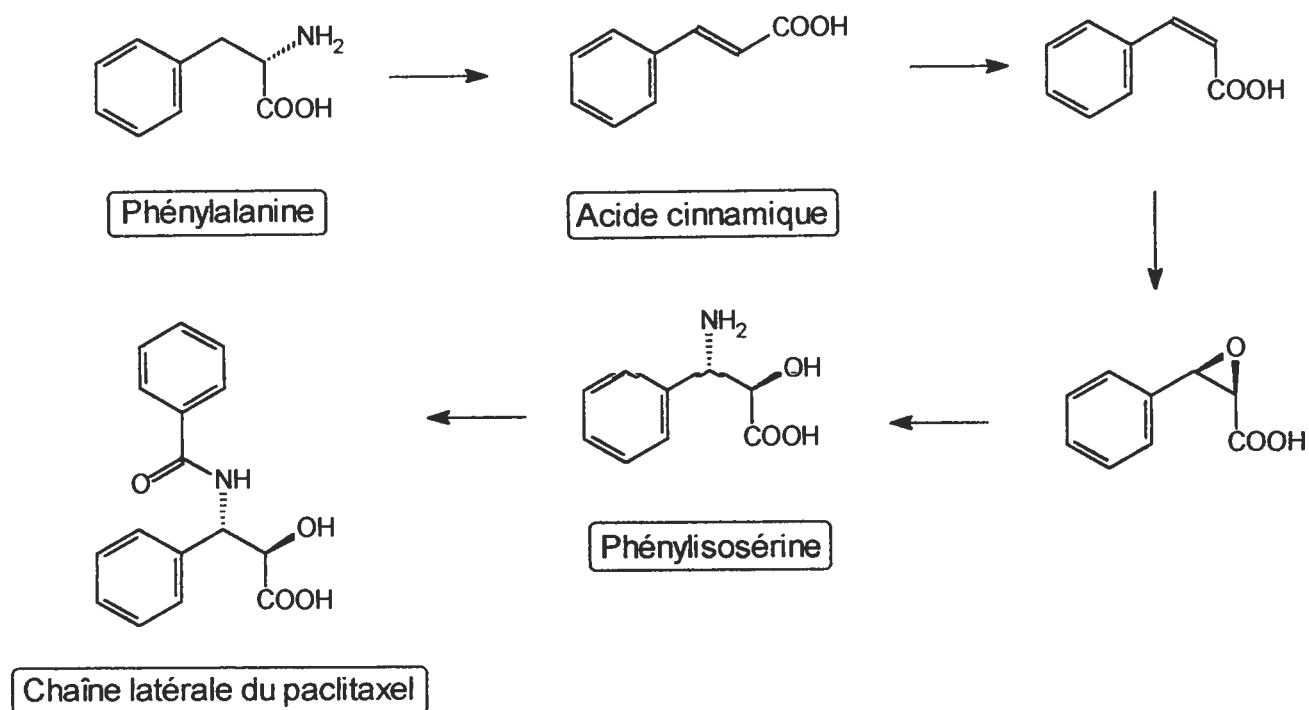


Figure 16. Voie biogénétique de la formation de la chaîne latérale du Taxol® via l'acide cinnamique¹⁰²

Un troisième mécanisme de formation a ainsi été suggéré, celui-ci impliquant la migration du groupement amine de la phénylalanine de façon à créer un réarrangement menant à la chaîne latérale³². Il a ainsi été établi, suite à la réalisation de plusieurs études de nutrition visant à confirmer cette dernière théorie, que la chaîne latérale est formée à partir de la phénylalanine et ce, via la β -phénylalanine (figure 17). C'est une phénylalanine aminomutase qui joue le rôle clef de catalyseur dans la réaction transformant la phénylalanine de départ en

β -phénylalanine. Cette première transformation est suivie d'une hydroxylation en C2' puis, d'une acétylation du groupement amide.

Flemming et ses collaborateurs ont également proposé que la chaîne latérale était synthétisée sous la forme d'un précurseur, attachée à la baccatine III puis, complétée. En effet, lors d'études de nutrition des tissus à partir de précurseurs marqués tel la N-benzoyl-phénylisosérine ($^2\text{H}_{10}$) le groupement benzoyle de ce précurseur n'a pas été incorporé dans la chaîne latérale du Taxol® mais clivé avant l'attachement de celle-ci³⁴.

Des études supplémentaires, cette fois au ^{14}C , ont par la suite démontré que cette absence d'incorporation n'était pas la résultante d'une hydrolyse trop rapide du benzoyle. De plus, des essais d'incorporation de N-débenzoyltaxol se sont révélés fructueux, démontrant cette fois que ce précurseur est utilisé intact³³.

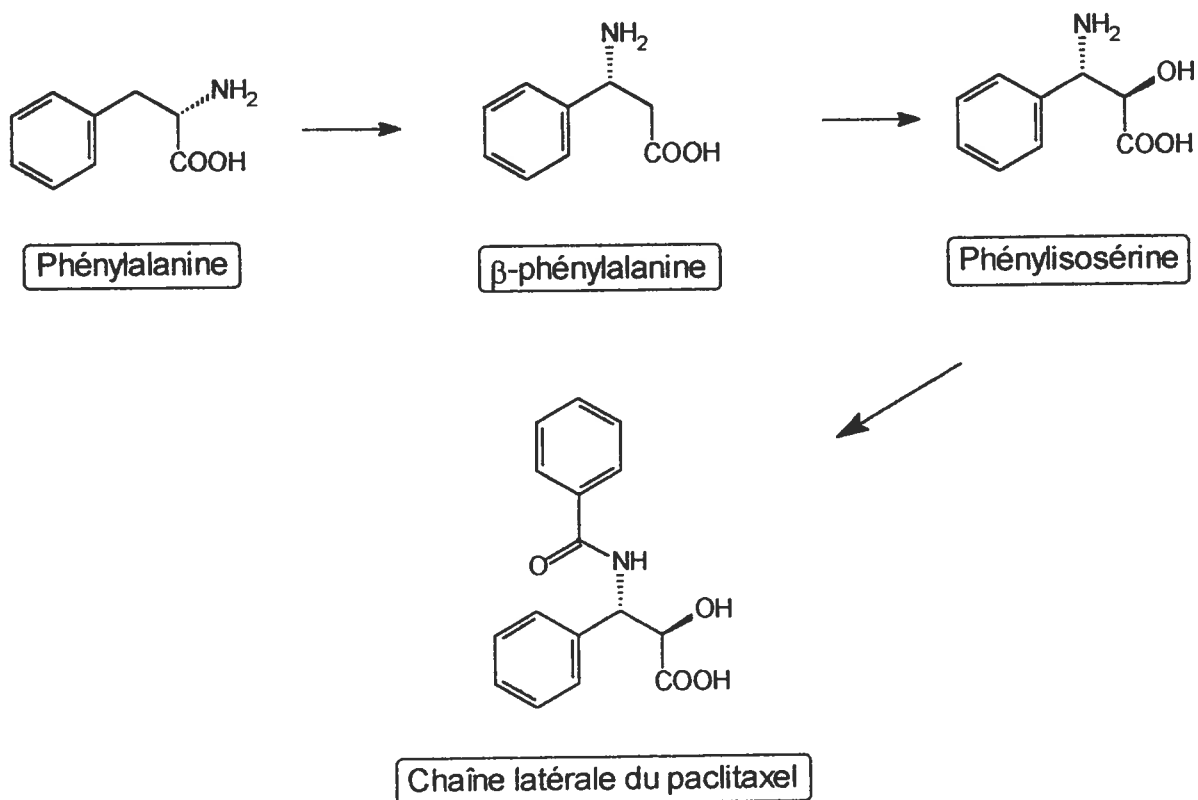


Figure 17. Voie biogénétique de la formation de la chaîne latérale du paclitaxel via la β -phénylalanine³².

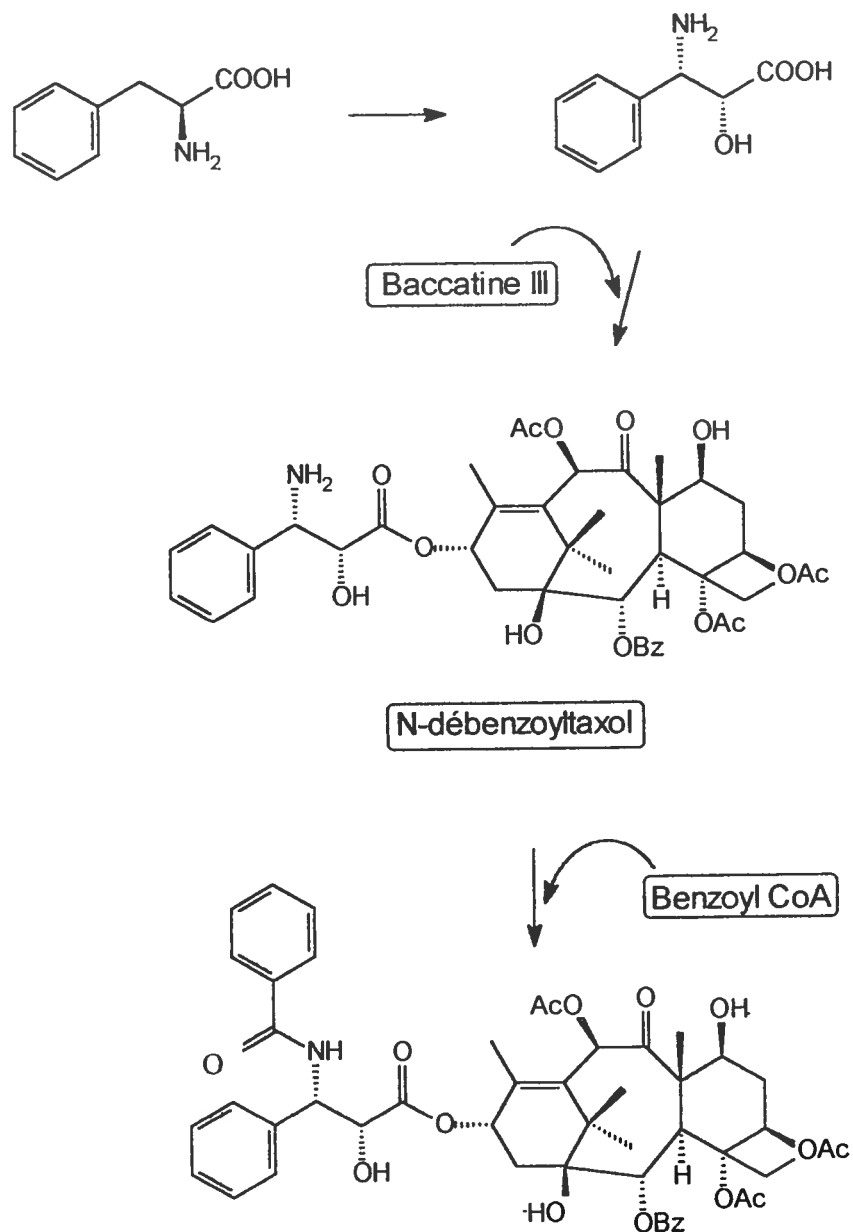


Figure 18. Formation et attachement de la chaîne latérale du Taxol®³³

3.0 Facteurs influençant la biosynthèse du Taxol®

La dynamique entourant la biosynthèse du Taxol® est encore aujourd'hui relativement mal connue. Les scientifiques pensent que la production de Taxol® aurait lieu en réponse à une situation de stress, sans pour autant être en mesure

d'identifier celles-ci de façon précise. Étant donné la toxicité élevée de ce composé naturel pour les différents organismes vivants, il est possible que la production de ce métabolite secondaire constitue un mécanisme de défense. Il pourrait par exemple permettre la lutte aux attaques d'insectes ou encore l'élimination d'un stress provoqué par le phénomène de broutage. Différents facteurs ont aussi été identifiés comme influençant la production de Taxol® par l'if^{29,128,144}. Parmi ceux-ci, l'âge et la nature des tissus^{26,92,137,146}, la période de l'année¹³³, la présence de jasmonates^{14,15,25,54,78,110,123,148}, le manque d'eau, une exposition accrue aux rayons lumineux, la température, le séchage^{21,22,23} et les conditions de cultures^{30,55,93,97,109,142}, etc.

4.0 Biogénèse et biosynthèse du Taxol® chez l'if du Canada

Il a récemment été établi, par Hezari *et al.* (1997) que la voie de biosynthèse via le taxadiène, déjà identifiée chez l'if du Pacifique et l'if d'Europe (*Taxus baccata*), serait également présente chez l'if du Canada. En effet, une production de taxadiène synthase, l'enzyme catalysant la première étape de la biosynthèse du Taxol®, a été identifiée au sein d'une suspension de cellules des tissus de cet if. Toutefois, la découverte de nombreux taxanes spécifiques à l'if du Canada porte à croire qu'il pourrait exploiter des voies de biosynthèse différentes de celles identifiées jusqu'à maintenant^{151,152,153,156}.

En effet, deux équipes de chercheurs ont découvert presque simultanément en 1992, un composé majoritaire à l'intérieur des aiguilles de l'if du Canada, la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III (DHB) (figure 19)^{41,150}. Or, bien que ce composé soit majoritaire chez cet if, il n'a été isolé chez aucune autre espèce exception faite de l'if de Chine (*Taxus chinensis*), où il est par contre présent à l'état de traces et uniquement au niveau de l'écorce¹⁶².

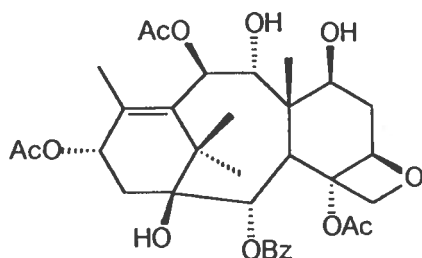


Figure 19. Structure de la 9-Dihydro-13-acétylbaccatine III¹⁵⁰

La structure de ce composé étant très similaire à celle de la baccatine III, il y a de fortes raisons de croire qu'il pourrait lui aussi être un précurseur du Taxol®¹⁵⁰. Cela constitue un fait particulièrement intéressant étant donné son caractère unique et son abondance à l'intérieur des aiguilles de l'if du Canada.

Deux nouveaux taxanes (figure 20) ont aussi été récemment isolés des aiguilles de l'if du Canada par le groupe du Dr Zamir. Ces deux taxanes sont à ce point similaires qu'ils ne diffèrent que par un seul élément soit, la présence ou l'absence d'une liaison entre les carbones 3 et 11¹⁵⁴. Cette grande similarité des deux composés laisse croire qu'ils pourraient faire partie d'une même voie de biosynthèse d'un taxane quelconque, taxane qui pourrait d'ailleurs s'avérer tout aussi ou même plus actif que le Taxol® mais avec moins d'effets secondaires. De plus, le passage du nouveau taxane 1 au nouveau taxane 2 constituerait une seule étape de cette voie biosynthétique. Cette étape devient donc particulièrement intéressante puisque relativement facile à démontrer en marquant radioactivement le présumé précurseur au niveau de sa chaîne latérale de cinnamate.

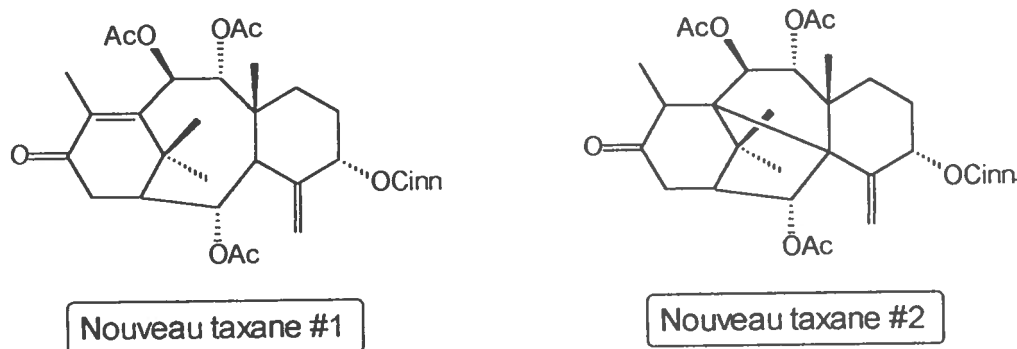


Figure 20. Structure des nouveaux taxanes #1 et #2¹⁵⁴

Trois membres particulièrement intéressants d'une nouvelle famille de taxanes bicycliques (figure 21), ont aussi été isolés par l'équipe du Dr Zamir, toujours à partir des aiguilles de *T. canadensis*^{9,152,154}. Encore une fois, ces taxanes semblent être propres à l'if du Canada puisqu'il n'ont été retrouvés chez aucun autre if, même l'if de Chine. En effet, chez ce dernier, des taxanes bicycliques oxygénés ont été isolés mais aucun ne correspond aux canadensènes^{9,154}.

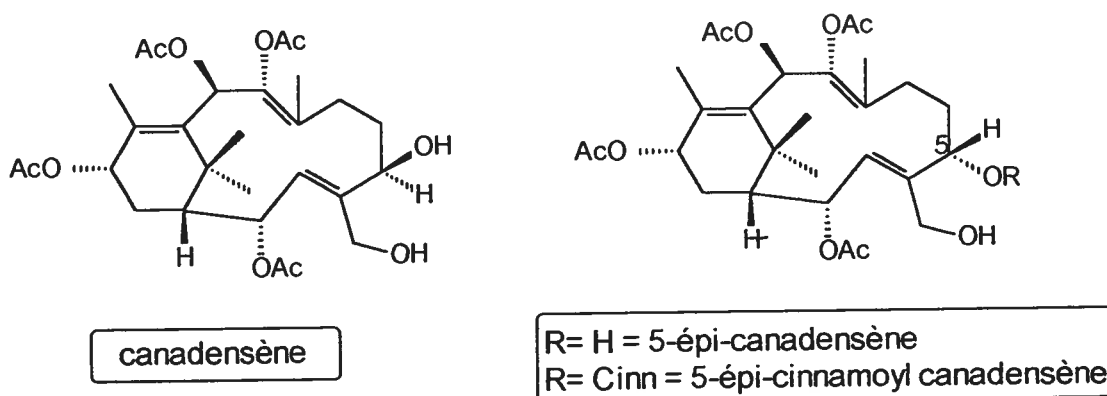


Figure 21. Canadensène, 5-épi-canadensène et 5-épi-cinnamoyl canadensène¹⁵⁴

La présence du canadensène (CDN) est particulièrement troublante puisqu'elle ne concorde d'aucune façon avec la voie de biosynthèse via le taxadiène, déjà établie¹⁵⁴. La présence de composés bicycliques tels les canadensènes permet de croire que chez certaines espèces d'ifs, comme l'if du Canada par exemple, il

pourrait y avoir d'abord oxygénation du corps de la molécule puis fermeture des cycles¹⁵⁴.

D'après l'hypothèse émise par le Dr Zamir⁹, la découverte du canadensène pourrait s'expliquer par trois voies biogénétiques distinctes (figure 22):

- 1) Selon la première voie, le CDN proviendrait d'un précurseur hydrocarboné bicyclique. Celui-ci mènerait d'une part au taxadiène puis au Taxol®, et, d'autre part, au CDN. Celui-ci serait donc un produit «cul-de-sac» engendré par une série de réactions secondaires d'oxygénation survenant sur le précurseur. Ces réactions secondaires seraient la résultante de la grande stabilité du CDN et de la présence naturelle, dans les tissus de l'if, des oxygénases requises pour catalyser ces réactions.
- 2) Selon la seconde voie biogénétique, le canadensène pourrait être le fruit d'une ouverture de cycle d'un précurseur déjà oxygéné, probablement le taxadiène (figure 22). Cette hypothèse semble toutefois peu probable puisqu'une ouverture de cycle chez un précurseur tricyclique déjà oxygéné afin d'obtenir un noyau bicyclique n'a jamais été observée chez les ifs jusqu'à maintenant⁹.
- 3) La dernière voie biogénétique stipule quant à elle que le CDN pourrait être impliqué dans une voie alternative de biosynthèse du Taxol®. Ainsi, deux voies de biosynthèse seraient présentes dans les tissus des ifs, l'une via le taxadiène, l'autre via le CDN (figure 22). Ces deux voies seraient présentes chez toutes les espèces d'ifs mais tout dépendant de l'espèce, l'une des deux voies pourrait être prédominante. Ceci expliquerait que certains taxanes retrouvés chez l'if du Canada n'aient pu être retrouvés chez certains autres ifs⁹. Toutefois, bien que cette dernière voie de biogénèse semble la plus plausible, aucune preuve de l'existence de l'une ou l'autre des voies ci-haut mentionnées n'a pour le moment été obtenue.

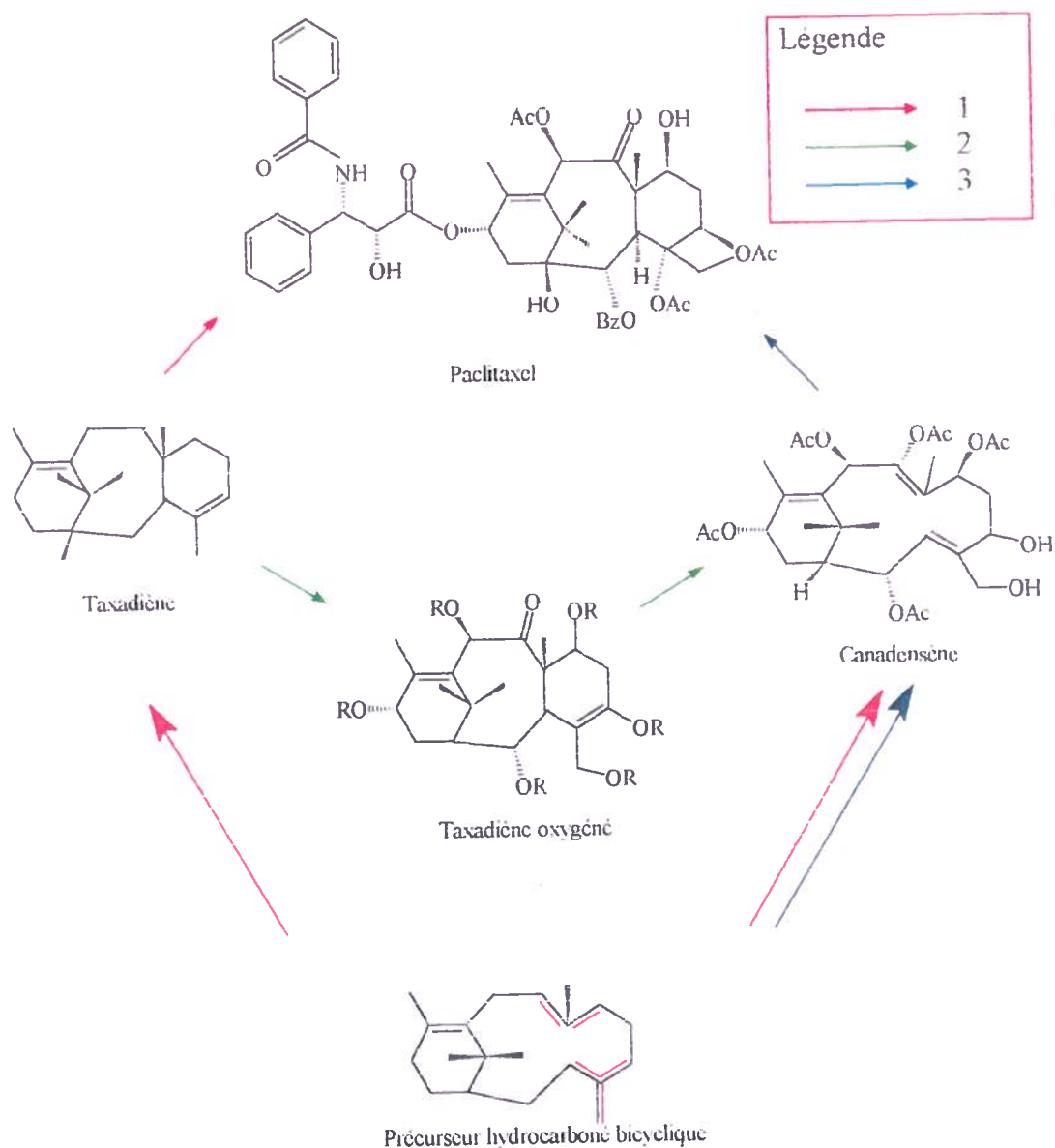


Figure 22. Voies de biogénèse du canadensène⁹

Finalement, des taxanes comme la taxuspine D, isolée pour la première fois de l'if japonais⁵⁸, la taxinine (TNN) et la taxinine E (TNE) ont été isolés de l'if du Canada¹⁵⁵. La taxuspine D, bien que dépourvue de chaîne latérale, possède une activité fort intéressante variant de 1/3 à 1/2 de l'activité du Taxol®. Le débat sur l'identité des éléments essentiels au maintien de l'activité des taxanes est donc ouvert à nouveau¹⁴⁷. La chaîne latérale est-elle oui ou non une structure

réellement indispensable? Quoi qu'il en soit, l'ensemble des taxanes isolés des aiguilles de l'if du Canada démontre clairement le caractère unique de cette espèce. La présence de la taxinine ainsi que de la taxinine E en tant que taxanes majeurs chez *T. canadensis* suggère, encore une fois, l'existence de voies biosynthétiques uniques au sein desquelles diffèrent les séquences de cyclisations et d'oxygénations.

5.0 Taxanes majeurs de l'if du Japon

Les problèmes de disponibilité du Taxol® ont menés à la réalisation de nombreuses analyses du contenu en taxanes de différentes espèces d'if. L'if japonais n'a pas échappé à ces études détaillées étant donné le contenu considérable de ses aiguilles en taxanes. Il a ainsi été possible d'isoler une soixantaine de composés que ce soit des aiguilles, de l'écorce ou des tiges de cette espèce bien précise^{2,5,13,26,59,80,81,82,117,118,119,120,130,141}. L'annexe 1 regroupe l'ensemble des taxanes ayant été jusqu'à présent retrouvés chez l'if japonais.

LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS

[1,2-¹⁴C]-Acide acétique, forme sodique (Amersham-Pharmacia Biotech)

L-Phénylalanine-[RING-2,6-³H (N)] (Sigma)

Acétate d'éthyle (Anachemia)

Acétone (Anachemia)

Acétonitrile : CH₃CN (Anachemia)

Acide borique : H₃BO₃ (J.T. Baker Chemical Co)

Acide éthylènediamine tétraacétique : EDTA (Sigma)

Acide chlorhydrique : HCl (Fisher)

Acide sulfurique : H₂SO₄ (Allied Chemical Canada Ltd.)

Adénosine 5'-triphosphate: ATP (Sigma)

Butanol (Anachemia)

Chlorure de sodium : NaCl (Anachemia)

Chlorure de magnésium : MgCl₂ (Fisher)

D-[U-¹⁴C]-glucose (ICN)

Dichlorométhane : CH₂Cl₂ (Anachemia)

Dithiothréitol : DTT (Sigma)

Hypochlorite de sodium 5,25% (Eau de Javel JAVEX)

Eau distillée

Eau Milli-Q (Waters)

Engrais fertilisant 10-52-10 (Plantex)

Éthanol (Anachemia)

Hexane (Anachemia)

Hyamine (Sigma)

Hydroxyde de potassium : KOH (Anachemia)

Hydroxyde de sodium : NaOH (Fisher)

Isopropanol (EM Science)

Kinétine (Sigma)

Liquide à scintillation (Packard)

L-Phénylalanine (Aldrich)

Méthanol (Anachemia)

Méthyl jasmonate (Aldrich)

Molybdate d'ammonium : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

Nitrate de calcium : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

Nitrate de potassium : KNO_3 (Fisher)

Phosphate d'ammonium : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Fisher)

Phosphate de potassium monobasique : KH_2PO_4 (Fisher)

R-[2- ^{14}C]-acide mévalonique lactonisé (Amersham-Pharmacia Biotech)

Sucrose (Anachemia)

Sulfate cuivrique : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

Sulfate ferreux : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

Sulfate de magnésium : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

Sulfate de magnésium anhydre : MgSO_4 anhydre (Fisher)

Sulfate de sodium : Na_2SO_4 (Anachemia)

Sulfate de zinc : $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

Sulfate manganoux : $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

Tris (Fisher)

Tween 20 (Sigma)

APPROCHE EXPÉRIMENTALE ET RÉSULTATS

Les boutures de *T. canadensis* et de *T. cuspidata* utilisées pour réaliser les expériences ont été produites par la pépinière Cramer (Les Cèdres, Québec). De jeunes pousses de plants adultes d'if du Canada et d'if du Japon ont été récoltées au mois de février 1999 et 2000. Elles ont par la suite été traitées avec des mélanges d'hormones de croissance végétales afin de stimuler leur production de racines.

Les boutures de conifères sont difficiles à produire comparativement aux boutures de plantes herbacées. Plusieurs espèces, dont certains *Taxacées*, sont particulièrement laborieuses à faire raciner. C'est le cas de l'if du Canada. Peu de pépinières possèdent l'expertise nécessaire au bouturage de cette espèce très capricieuse. Celle-ci requiert en effet des concentrations très précises d'hormones ainsi que des conditions environnementales parfaitement définies. L'if du Japon est quant à lui beaucoup plus facile à manipuler mais le maintien des plants se fait de façon beaucoup plus aisée au sein d'un environnement contrôlé. C'est pour l'ensemble de ces raisons que les plants ont été produits chez Cramer plutôt que dans nos propres installations.

1.0 Extraction et purification des taxanes des boutures de *T. canadensis* et *T. cuspidata*

1.1 Extraction à partir des tissus frais

Les boutures ont été nettoyées avec de l'eau milli-Q et ont été mises à sécher à 25 degrés celsius (°C) dans une pièce sombre, pendant 2 semaines. Lorsque les tissus ont été parfaitement secs, ils ont été pesés (Mettler PC2000, Fisher Scientific) et broyés à l'aide d'un robot culinaire commercial (Robot Coupe USA inc, model BX3) jusqu'à l'obtention d'une poudre brune; 75,0 grammes (g) de *T. cuspidata* (environ 35 plants) et 38,6 g de *T. canadensis* (environ 40 plants). Tous les solvants utilisés ont été distillés sous verre (GD). Les taxanes ont été extraits à quatre reprises au CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Le mélange de solvant a été

ajouté à raison de 8,8 millilitres (mL) par gramme de tissus. Chaque extraction de 24 heures (h) a été réalisée à la noirceur, à 25°C et sous agitation mécanique constante. Le solvant d'extraction a été récupéré par filtration à travers huit épaisseurs de gaze et évaporé sous pression réduite avec un évaporateur rotatif (Büchi RE121 Rotavapor), couplé à un bain d'eau à température contrôlée ajusté à 32 °C (Büchi 441, Brinkmann). L'extrait obtenu a été suspendu à nouveau dans 200 mL d'eau chaude distillée (environ 100°C) puis extrait à l'hexane afin de procéder au retrait des lipides. Trois extractions consécutives à l'hexane (200 mL) ont été réalisées. La suspension aqueuse (phase inférieure) a été conservée, saturée en chlorure de sodium (NaCl) puis, extraite à nouveau au dichlorométhane (CH₂Cl₂) (200 mL). Trois extractions au CH₂Cl₂ ont été réalisées. Les phases organiques (phases inférieures) ont été récoltées et combinées puis, séchées sur sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄). L'extrait ainsi obtenu a été à nouveau évaporé sous pression réduite, pesé (Mettler H51AR, Fisher Scientific) et conservé à - 20°C jusqu'aux analyses subséquentes.

1.2 Séparation et purification des taxanes d'intérêt

Le système de solvant optimal pour la séparation des différents taxanes de l'extrait a été déterminé par chromatographie sur couche mince (CCM). L'extrait obtenu a été déposé sur plaques de silice (Silica gel 60, 250 micromètres (µm), EM Science) et séparé dans quatre systèmes de solvants: 1) acétate d'éthyle (AcOEt) 100%, 2) AcOEt:hexane 8:2, 3) CH₂Cl₂:méthanol (MeOH) 9:1, 4) acétone:hexane 8:2. Les plaques ont par la suite été développées par vaporisation d'une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) 10% dans l'éthanol (EtOH), suivie d'un chauffage.

La première séparation a été effectuée sur une colonne de gel de silice (Silica gel 60, 230-400 mesh, SiliCycle) de 21 centimètres (cm) de hauteur et 1,8 cm de diamètre. La quantité de silice utilisée était de 50:1 par rapport au poids de l'échantillon. L'extrait a été déposé sur la colonne (dilution dans 2 mL de CH₂Cl₂) et la séparation a été réalisée par éluations successives de 400 mL de chacun des

différents mélanges de solvants suivants : hexane:CH₂Cl₂ (4:1), hexane:CH₂Cl₂ (2:1), hexane:CH₂Cl₂ (1:1), hexane:CH₂Cl₂ (1:2), hexane:CH₂Cl₂ (1:4), CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂:MeOH (98:2), CH₂Cl₂:MeOH (95:5), CH₂Cl₂:MeOH (9:1) et CH₂Cl₂:MeOH (7:3).

Lors du processus de purification, plusieurs standards ont été utilisés afin d'identifier les fractions pouvant renfermer des taxanes d'intérêt. Ces standards ont été isolés de tissus matures de *T. canadensis* par des membres du laboratoire du Dr Zamir^{150,151,152,153,154,155,156,159,160}. Leur structure a été confirmée par des analyses en spectrométrie de masse (SM) ainsi qu'en RMN. La structure de certains d'entre eux n'a toutefois pas encore été élucidée de telle sorte que ceux-ci seront désignés, dans cette section, sous le vocable d'inconnus et qu'ils seront numérotés. Le tableau 1 présente la liste des standards utilisés ainsi que leurs temps de rétention (t_R) au Programme A (Annexe 3). Les structures de ces mêmes standards apparaissent à l'Annexe 2.

Tableau 1. Standards utilisés à des fins comparatives au cours du processus de purification

STANDARD	ABRÉVIATION	T _R (MIN)	R _F
Inconnu #1	INC1	19,613	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,46
Inconnu #2	INC2	19,807	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,47
Inconnu #3	INC3	23,383	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,51 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3) = 0,31
Inconnu #4	INC4	11,694	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,17 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,46
Inconnu #5	INC5	24,760	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,60
10-désacétylbaccatine III	DAB	21,032	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,25 EtOAc 100% = 0,58
Taxol®	TXL	36,557	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,57 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3) = 0,13
Céphalomannine	CEP	35,520	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,58 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,37
9-dihydro-13-acétylbaccatine III	DHB	30,120	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (99:1) = 0,5 EtOAc:Hex (8:2) = 0,34
Canadensène	CDN	29,892	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,38 EtOAc:Hex (8:2) = 0,26
Taxinine	TNN	52,160	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (99:1) = 0,39

			CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,69
Taxinine E	TNE	52,033	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (99:1) = 0,33 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,69
7-épitaxol	ETX	40,246	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,76 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,41
10-désacétyltaxol	DTX	32,068	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,20 CH ₂ Cl ₂ :But (8:2) = 0,75
Taxcultine	TXC	33,890	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,25 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,22
9-désacétyltaxinine E	DTN	47,268	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,48 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,69
Taxine B	TNB	35,888	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,71 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,76
9,10,13-tridésacétyl-abéo-baccatine VI	TAB	28,478	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,17 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,06
2,10-diacétyl-5-cinnamoyl-phototaxicine II	DCP	41,980	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,50 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,58
Taxézopidine G	TZG	47,788	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,50 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,66
10-hydroxyacétyl-baccatine VI	HAB	33,950	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,27 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,28
1β-hydroxy-7,9-désacétylbaccatine I	HDB	22,813	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,46 Acétone:Hex (8:2) = 0,20
N-acétyl-N-débenzoyltaxol	ADT	29,802	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3) = 0,10
Taxinine-11,12-oxide	TNO	49,678	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3) = 0,41
7,9-désacétylbaccatine VI	DBVI	20,106	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,44 CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1) = 0,53
15-benzoyl-2-débenzoyl-7,9-diacétyl-abéo-baccatine VI	BDDDB	28,425	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5) = 0,23 CH ₂ Cl ₂ :Acétone (8:2) = 0,11

2.0 Purification des taxanes des boutures de *T. canadensis*

Dix fractions (1 à 10) de 400 mL chacune ont ainsi été récoltées lors de cette première séparation par chromatographie flash. Elles ont été évaporées sous pression réduite (figure 23), pesées et transférées dans des flacons de verre de 20 mL. La fraction 6 a été dissoute dans 3 mL d'acétonitrile (CH₃CN):MeOH (1:1) puis, analysée par CCM (CH₂Cl₂:MeOH, 95:5) avec le standard INC3. La mise

en évidence du produit sur la plaque a été réalisée par vaporisation d'une solution de H_2SO_4 10% dans l'EtOH suivie d'un chauffage. Une correspondance des rapports frontaux (R_f) (0,50) et des changements de couleur au développement ont pu être établies entre la fraction étudiée et le standard. La fraction 6 a également été analysée par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) analytique (Waters 600 Controller couplé à un détecteur à arrangement de photodiodes Waters 996 Photodiode Array Detector, ajusté à 227 nanomètres (nm) et muni d'un injecteur automatique Waters 717plus Autosampler). Pour ce faire, le Programme A de l'Annexe 3 a été utilisé. Deux colonnes C18-Partisil (4,6 millimètres (mm) x 500 mm) y sont connectées en série et précédées d'une pré-colonne en Pelicular-ODS. Un pic unique avec un $t_R = 22,7$ min a été obtenu à raison de 3,11 milligrammes (mg) et identifié en RMN (Annexe 17). Il ne s'agit toutefois pas d'un taxane mais plutôt du 3,5-diméthoxyphénol. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le standard INC3 utilisé n'a pas encore été identifié. Il ne s'agit donc probablement pas d'un taxane mais plutôt du 3,5-diméthoxyphénol.

Les fractions 7 (99,2 mg), 8 (99,1 mg), 9 (48,5 mg) et 10 (16,7 mg) ont été injectées, à raison de 50 microlitres (μL), au HPLC analytique et conservées séparément pour les analyses subséquentes (figure 23). Les fractions 1 à 5 ont pour leur part été rejetées étant donné leur faible poids ainsi que leur contenu négligeable en taxanes d'intérêt suite à des analyses sur CCM.

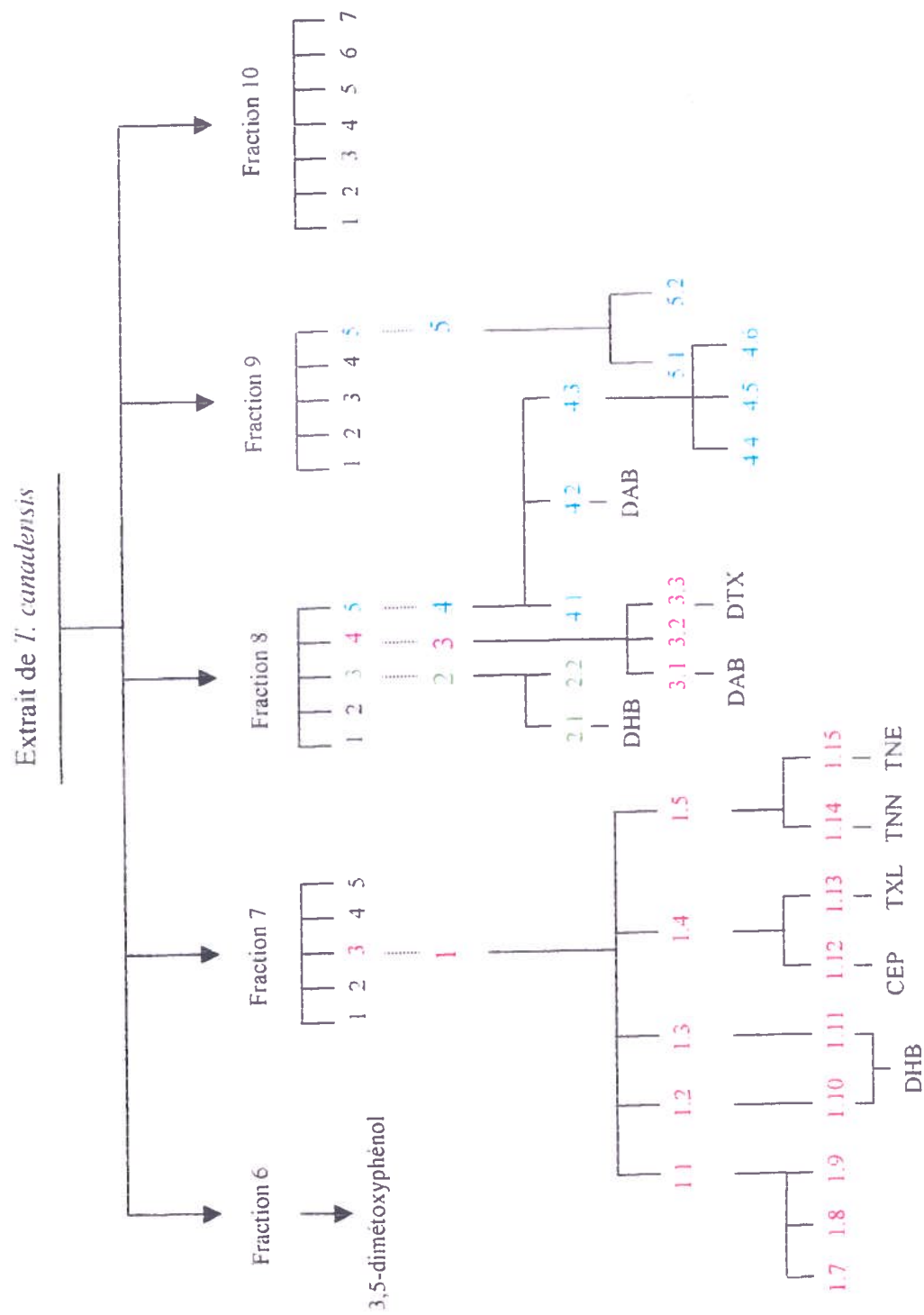


Figure 23. Schéma de purification des taxanes d'intérêt de l'extrait brut de boutures de *T. canadensis*.

Selon leur solubilité, les fractions 7 à 10 ont été dissoutes dans 500 à 1000 μL de CH_2Cl_2 et les flacons ont été rincés à deux reprises avec 200 μL du même solvant. Elles ont par la suite été séparées individuellement sur une seconde colonne de gel de silice (2,5 g) de 6,0 cm de hauteur et 1,3 cm de diamètre. L'élution a été réalisée à l'aide de 20 mL de 5 mélanges de solvants (CH_2Cl_2 100%, CH_2Cl_2 :MeOH 99:1, CH_2Cl_2 :MeOH 97:3, CH_2Cl_2 :MeOH 95:5 et CH_2Cl_2 :MeOH 9:1). Deux mélanges supplémentaires ont toutefois dû être utilisés pour permettre une séparation complète de la fraction 10 (CH_2Cl_2 :MeOH 8:2, CH_2Cl_2 :MeOH 7:3). Les 22 sous-fractions ainsi obtenues (figure 23) ont été dissoutes dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1). 100 μL de chacun des échantillons ont été injectés, individuellement, en HPLC analytique selon le Programme A (Annexe 3) afin d'analyser leur contenu potentiel en taxanes. Les poids des 22 sous-fractions issues de cette deuxième séparation par chromatographie flash apparaissent au tableau 2. Cinq de ces sous-fractions ont été conservées pour les analyses subséquentes (figure 23, tableau 2). Celles-ci ont été sélectionnées en comparant leur temps de rétention et leur profil de spectre ultraviolet (UV) avec ceux de standards isolés de tissus matures de *T. canadensis*. Les autres sous-fractions ont été retranchées étant donné leur faible contenu en taxanes d'intérêt.

Tableau 2. Poids des 22 sous-fractions issues de la seconde séparation par chromatographie flash

FRACTION		Poids (mg)
Fraction 7	1	0,89
	2	0,80
	3	86,13
	4	7,32
	5	2,25
Fraction 8	1	0,25
	2	0,00
	3	26,12
	4	43,62
	5	20,70
Fraction 9	1	0,00
	2	0,00
	3	0,13
	4	0,8

	5	33,85
Fraction 10	1	0,15
	2	0,23
	3	0,30
	4	0,15
	5	0,78
	6	3,11
	7	4,12

La sous-fraction 1 (figure 23) a été purifiée par HPLC préparative Waters Delta Prep 3000 couplé à un détecteur à longueur d'onde variable Waters 486 Tunable Absorbance Detector, ajusté à 227 nm. Une colonne Whatman Partisil 10 ODS-2 (22 mm x 500 mm) y est connectée ainsi qu'une pré-colonne Pelicular-ODS. Le débit pour cette colonne a été fixé à 18 mL/min. Le programme A de l'Annexe 3 a été utilisé. Cinq fractions ont été récoltées (1.1 à 1.5, figure 23). Celles-ci ont respectivement des t_R de 19 à 24,8 minutes (min), 24,8 à 27 min, 27 à 30,5 min, 32,6 à 36 min et 49,3 à 54 min.

La fraction 1.1 a été comparée au standard INC3 sur CCM éluee dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (97:3). Aucune correspondance n'a été obtenue. L'échantillon a été dilué dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1) et vérifié en HPLC analytique (Waters 600 Controller) selon le Programme A (Annexe 3). Deux pics présentant des t_R pouvant correspondre à des taxanes retrouvés dans les tissus matures (22,4 et 26,7 min) ont alors été observés. Ceux-ci ont été séparés par HPLC semi-préparative Waters Delta Prep 3000 couplé à un détecteur à longueur d'onde variable Waters 486 Tunable Absorbance Detector ajusté à 227 nm. Deux colonnes Whatman Partisil 10 ODS-2 (9,4 mm x 250 mm) y sont connectées ainsi qu'une pré-colonne Pelicular-ODS. Le débit pour cette colonne est fixé à 3 mL/min. Le Programme A (Annexe 3) a été utilisé et trois fractions (1.7 à 1.9, figure 23) ont été recueillies soit : de 7,5 à 24,9 min, de 24,9 à 31,0 min et de 31,0 à 40,0 min. Une analyse supplémentaire de chacune de ces fractions, par HPLC analytique (Waters 600 Controller) selon le Programme A (Annexe 3), a permis de déterminer que les pics désirés (t_R = 22 et 26 min) étaient bien présents dans

les fractions 1.7 et 1.8. Ceux-ci n'étaient toutefois pas suffisamment purs pour être analysés par RMN ou par SM et leur poids peu élevé (1.7 = 5,61 mg et 1.8 = 2,82 mg) ne permettait pas de poursuivre la purification. Quant à la fraction 1.9, elle ne renfermait aucun pic d'intérêt.

La fraction 1.2 a aussi été comparée au standard INC3 par CCM dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (95:5). Aucune correspondance n'a pu être déterminée. Elle a donc été diluée dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1) puis injectée sur HPLC analytique selon le Programme A (Annexe 3). Suite à cette injection, un pic possédant un $t_R = 30,0$ min, soit une valeur similaire à celle de la DHB, a été obtenu. Le pic récolté a été comparé à un standard de DHB sur CCM dans l'AcOEt 100%. Une similitude des R_f (0,44 pour le produit 1.2 et 0,45 pour le standard de DHB) ainsi que du changement de couleur au développement a été observée. La purification a donc été effectuée par CCM préparative sur une plaque de 10 cm x 20 cm et de 250 μm d'épaisseur. L'échantillon a été solubilisé dans 800 μL de CH_2Cl_2 :MeOH (95:5) et entièrement déposé sur la plaque parallèlement à un standard de DHB. L'élution a été réalisée dans l'AcOEt 100% et une fois asséchée, la plaque a été visualisée sous les UV. La bande correspondant au standard a été grattée, déposée sur un entonnoir de verre fritté puis, filtrée à l'acétone, au CH_2Cl_2 ainsi qu'à l'AcOEt. Le filtrat obtenu a été évaporé sous pression réduite, solubilisé dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1) et injecté sur HPLC analytique selon le Programme A (Annexe 3). Un composé pur (1.10, figure 23) au $t_R = 30,0$ min a été obtenu. Il a été combiné au composé 1.11 (purifié ultérieurement) étant donné leurs propriétés similaires. Les analyses en RMN ont démontré qu'il s'agissait de la DHB. (Annexe 11)

La fraction 1.3 a été comparée à trois standards soit, la DHB, le CDN et le ADT. La CCM a été réalisée dans un mélange de CH_2Cl_2 :isopropanol (IPA) (9:1). Une correspondance des R_f (0,44) a été obtenue uniquement pour la DHB. La purification a été réalisée de la même façon que pour la fraction 1.2 et un composé pur (1.11, figure 23) a été obtenu à raison de 0,89 mg. Celui-ci a été

combiné au composé 1.10 et identifié par RMN comme étant de la DHB (Annexe 11).

La fraction 1.4 a été comparée à un standard de TXL sur CCM dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (97:3). Une correspondance des R_f (0,13) et des changements de couleurs au développement a été observée. L'échantillon a été dilué dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1) et injecté sur HPLC analytique selon le Programme A (Annexe 3). Cette étape visait à vérifier s'il n'y avait pas également présence de CEP dans la fraction 1.4. Un premier pic au $t_R = 36,3$ min (TXL) a été obtenu et un second, pouvant correspondre à la CEP, ($t_R = 35,4$ min) a également pu être visualisé. Les deux pics ont été séparés par HPLC semi-préparative selon le Programme E (Annexe 3). Ce système consistait en deux colonnes analytiques Whatman Partisil-10 ODS-2 (4,6 mm x 250 mm) montées en série et reliées à un HPLC Perkin-Elmer Binary LC Pump 250 couplé à un détecteur à arrangement de photodiode Waters Photodiode Array Detector ajusté à 227 nm. Un ordinateur NEC APC IV PowerMate 2, connecté au système, a exécuté le traitement des données. Les deux pics obtenus suite à cette étape de purification ont été réinjectés individuellement sur HPLC analytique (Waters 600 Controller) selon le Programme A (Annexe 3). Deux produits purs (1.12 et 1.13, figure 23) ont été recueillis. Le composé 1.12 (1,98 mg) a un $t_R = 36,4$ min et le composé 1.13 (1,18 mg) a un $t_R = 35,4$ min. Les deux ont été identifiés par RMN comme étant de la CEP et du TXL (Annexes 15 et 16 respectivement).

La fraction 1.5 a été comparée à des standards de TNN, de TNE et de TNO. Les comparaisons ont été réalisées par CCM à l'aide d'un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (99:1). Une similitude des R_f (0,37 pour la TNN et 0,31 pour la TNE) ainsi que des changements de couleurs lors du développement a été obtenue avec les deux premiers standards. L'échantillon a été solubilisé dans 800 μL de CH_2Cl_2 :MeOH (95:5) puis, déposé sur une plaque de gel de silice de 10 cm x 20 cm et de 250 μm d'épaisseur. Des standards de TNN ainsi que de TNE ont été déposés en parallèle sur la plaque et l'élution a été effectuée dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH

(99:1). La plaque a été visualisée aux UV et les bandes correspondant aux standards ont été grattées séparément. La silice ainsi obtenue a été extraite sur un entonnoir de verre fritté, d'abord au CH_2Cl_2 puis, à l'AcOEt. Les filtrats ont été évaporés sous pression réduite et déposés sur CCM, selon les mêmes conditions que pour la purification. Cela a permis de vérifier si il y avait eu séparation adéquate des deux substances inconnues. La CCM du premier composé (1.14, figure 23) a révélé la présence du produit purifié. Toutefois, la CCM du deuxième composé (1.15, figure 23) a pour sa part révélé la présence résiduelle du produit 1.14. Une seconde séparation sur CCM, toujours selon les mêmes conditions, a donc été réalisée. Les bandes correspondant aux standards ont de nouveau été grattées puis, extraites individuellement. Les filtrats issus de cette étape de purification supplémentaire ont été combinés aux produits de la première séparation. Le composé 1.14 a été obtenu à raison de 2,18 mg alors que le composé 1.15 a été obtenu à raison de 1,71 mg. Les deux ont été identifiés par RMN. Le produit 1.14 s'est avéré être de la TNN (Annexe 10). Pour ce qui est de 1.15 (Annexe 14), il s'agit d'un mélange de quatre composés cinnamoylés très similaires soit : deux isomères *trans* (ratio de 45 et 30%) et deux *cis*. Seul le produit majoritaire (celui présent à 45%) a pu être identifié. Il s'agit de la TNE.

La sous-fraction 2 a été purifiée par HPLC semi-préparative Waters Delta Prep 3000 selon le Programme A (Annexe 3). Deux colonnes Whatman Partisil-10 ODS-2 (9,4 mm x 250 mm) y sont connectées ainsi qu'une pré-colonne Pelicular-ODS. Le débit pour cette colonne est fixé à 3 mL/min. Suite à cette séparation, trois fractions ont été récoltées soit : de 0 à 30,0 min, de 30,0 à 34,2 min et de 34,2 à 60 min. La séparation obtenue n'étant toutefois pas de qualité, la première et la dernière fraction ont été combinées puis repurifiées selon les mêmes conditions. Une seule fraction a cette fois été recueillie soit, de 25,2 à 35,5 min. Celle-ci semblait renfermer de la DHB. En effet, une CCM avec un standard de DHB a été réalisée avec comme solvant d'élution un mélange d'AcOEt:hexane (8:2). Une correspondance des R_f (0,35) et des changements de coloration au développement a été observée.

La deuxième fraction a été évaporée sous pression réduite puis solubilisée dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1). Elle a été injectée sur HPLC analytique (Waters 600 Controller) afin de procéder à l'analyse de son contenu. Celle-ci a permis de déceler la présence d'un pic au $t_R = 29,9$ min qui pourrait correspondre à la DHB. Étant donné leur possible contenu en DHB, les deux échantillons issus de la sous-fraction 2 ont été déposés sur CCM avec un standard de DHB ainsi qu'un standard de CDN. L'élution a été réalisée dans un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99:1). Une similitude des R_f (0,51) a été obtenue pour les deux fractions dans le cas de la DHB mais rien de concordant n'est ressortit pour le CDN. Une CCM préparative a été effectuée afin de purifier la DHB présente dans les deux fractions. Celles-ci ont donc été déposées sur une plaque de gel de silice de 10 cm x 20 cm et de 250 μm d'épaisseur en parallèle à un standard de DHB. L'élution a été réalisée dans l'AcOEt 100% et la CCM a été visualisée aux UV. Une petite portion de la plaque (1 cm) a été développée par vaporisation à l'acide sulfurique (10% dans l'EtOH). Cela a permis l'identification d'une bande rosée sous la DHB pouvant correspondre au CDN. Cette bande, de même que celle concordant à la DHB ont donc été grattées puis filtrées individuellement sur verre fritté au moyen d'acétone, d'AcOEt et de CH_2Cl_2 . Les filtrats ont finalement été évaporés sous pression réduite. Les bandes de la DHB ont été injectées sur HPLC analytique, Programme A-Annexe 3) afin d'en vérifier la pureté. Le composé purifié (2.1, figure 23, 1,90 mg) présentait un $t_R = 29,9$ min. Ces échantillons ont été combinés aux produits 1.10 et 1.11 purifiés précédemment puisque ceux-ci ont tous des propriétés chromatographiques identiques à la DHB. Un total de 3,10 mg a ainsi été obtenu. Pour ce qui est des filtrats semblant correspondre au CDN, ils ont été comparés sur CCM avec un standard. L'élution s'est faite à l'aide un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5) mais aucune similarité avec les standard de CDN n'a pu être établie. Ils ont tout de même été injectés sur HPLC analytique (Programme A-Annexe 3). Des composés purs aux $t_R = 27,1$ min ont été obtenus pour un total de 0,91 mg une fois les deux fractions combinées (composé 2.2, figure 23). Une analyse par RMN a été réalisée sur ce dernier composé. Deux signaux aldéhyde ont été obtenus dans des proportions 70:30. Il semble y avoir

un groupement O-Ac aux positions 9 et 10. La position 20 serait ouverte et nous croyons qu'un groupement hydroxyle est présent sur le carbone 2. Malheureusement, le composé s'est avéré être impur et présent en trop faibles quantités pour qu'il soit possible d'approfondir l'analyse et ainsi de déterminer sa structure avec certitude.

La sous-fraction 3 a été solubilisée dans 1 mL de CH₃CN:MeOH (1:1) et 100 µL ont été injectés sur HPLC analytique (Programme D-Annexe 3) afin de déterminer si ces conditions permettent une bonne séparation des pics d'intérêt. Cette sous-fraction a ensuite été injectée sur HPLC semi-préparative Waters Delta Prep 3000 selon le même programme. Deux colonnes Whatman Partisil-10 ODS-2 (9,4 mm x 250 mm) y sont connectées ainsi qu'une pré-colonne Pelicular-ODS. Le débit pour ces colonnes est ajusté à 3 mL/min. Trois fractions ont été récoltées soit : de 22,5 à 29,8 min, de 32,4 à 40,6 min (3.2, figure 23) et de 48,2 à 55,2 min. Celles-ci ont été évaporées sous pression réduite et comparées à des standards sur CCM (Tableau 3).

Tableau 3. Résultats des comparaisons de la sous-fraction 3 avec des standards de *T. canadensis*

FRACTION	SOLVANTS	STANDARDS
3.1 (22,5 à 29,8 min)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)	DAB DBIV
3.2 (32,4 à 40,6 min)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)	INC3
3.3 (48,2 à 55,2 min)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)	DTX

Des correspondances ont été établies entre la fraction 3.1 et la DAB ainsi qu'entre la fraction 3.3 et le DTX. La fraction 3.1 a été diluée dans 1 mL de CH₃CN:MeOH (1:1) et 100 µL ont été injectés sur HPLC analytique (Waters 600 Controller, Programme D-Annexe 3). La présence d'un pic au temps de rétention de la DAB (26,0 min) à été observée.

La fraction 3.1 a été purifiée par CCM préparative sur une plaque de 10 cm x 13,5 cm et de 250 μm d'épaisseur. Un standard de DAB a également été déposé sur la plaque et l'élution a été réalisée dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (95:5). Deux éluions successives ont été effectuées pour permettre une bonne séparation des composés. La bande correspondant au standard a été grattée puis filtrée sur un entonnoir de verre fritté avec de l'acétone, du CH_2Cl_2 et de l'AcOEt. Après évaporation sous pression réduite, l'échantillon a été dissous dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1) et 100 μL ont été injectés sur HPLC analytique afin d'en vérifier la pureté. Le Programme A (Annexe 3) a été utilisé. Un composé pur (3.1, figure 23) au $t_R = 20,9$ min a été obtenu à raison de 3,1 mg. Des analyses en RMN (Annexe 13) ont été réalisées. Il s'agit de la DAB.

La purification de la fraction 3.2 n'a pas été poursuivie. Aucune correspondance n'a pu être établie avec le standard utilisé sur CCM (Tableau 3) et l'injection au HPLC analytique (Programme A-Annexe 3) n'a révélé la présence d'aucun taxane d'intérêt.

La fraction 3.3 a été purifiée par CCM préparative sur une plaque de gel de silice de 10 cm x 20 cm et de 250 μm d'épaisseur. La séparation a été effectuée au moyen des mêmes conditions que celles utilisées pour la fraction 3.1. Une seule élution a cependant été réalisée pour la fraction 3.3. Afin de vérifier la pureté du composé obtenu, celui-ci a été injecté (100 μL) au HPLC analytique (Programme A-Annexe 3). Un pic unique (composé 3.3, figure 23) au $t_R = 32,1$ min a été observé. 1,0 mg de cet échantillon a été recueilli et analysé en RMN. Il s'agit du DTX (Annexe 12).

La sous-fraction 4 a été purifiée par HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le Programme D (Annexe 3). Quatre fractions ont ainsi été récoltées soit : de 24,5 à 27,4 min, de 27,4 à 30,8 min, 30,8 à 31,7 min et 31,7 à 36,5 min. Étant donné son faible poids (moins de 1 mg) et la présence de nombreuses impuretés, la purification de la première fraction (4.1,

figure 23) n'a pas été poursuivie. Les deuxième et troisième fractions ont pour leur part été combinées étant donné leurs similarités de contenu. Après évaporation sous pression réduite, l'échantillon obtenu (4.2, figure 23) ainsi que la quatrième fraction récoltée (4.3, figure 23) ont été analysés par CCM avec des standards (tableau 4).

Tableau 4. Résultats des comparaisons sur CCM des fractions 4.2 et 4.3 avec des standards de *T. canadensis*

FRACTION	SOLVANTS	STANDARDS
4.2 (27,4 à 31,7 min)	AcOEt 100%	DAB INC3 DBIV
4.3 (31,7 à 36,5 min)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)	DAB INC3 DBIV

Suite à ces comparaisons sur CCM, seule une correspondance entre la fraction 4.2 et la DAB a pu être observée ($R_f = 0,38$). Plusieurs systèmes de solvant ont par la suite été utilisés afin de déterminer les meilleures conditions de séparation de la DAB. Une CCM préparative a été réalisée sur une plaque de 10 cm x 20 cm (250 μ m d'épaisseur) dans un mélange de CH₂Cl₂:acétone (1:1). Les conditions de séparation étaient les mêmes que pour la sous-fraction 3.1. Une seule élution a cependant été effectuée. La pureté du composé obtenu par CCM préparative a été vérifiée par injection sur HPLC analytique (Waters 600 Controller) selon le Programme A (Annexe 3). Le composé 4.2 purifié (0,27 mg, $t_R = 21,0$) a été combiné au produit 3.1 étant donné leurs propriétés chromatographiques identiques.

La fraction 4.3 a quant à elle été déposée sur CCM afin de déterminer les meilleures conditions de séparation de ses constituants. Le système de solvant optimal obtenu était le CH₂Cl₂:acétone (1:1). L'échantillon a été séparé par CCM préparative selon la même méthode que l'échantillon 4.2. Aucune similarité avec les standards n'ayant pu être établie, les bandes visualisées aux UV ont été

développées (par vaporisation au H_2SO_4 10% dans l'EtOH) sur une longueur d'environ 1 cm. Les changements de couleurs observés ont permis l'identification de trois bandes distinctes (4.4, 4.5, 4.6, figure 23). Celles-ci ont été diluées dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et 100 μL ont été injectés sur HPLC analytique au Programme A (Annexe 3). Le composé 4.4 obtenu (0,93 mg) semblait pur puisqu'un seul pic au $t_R = 22,907$ min a été observé. Celui-ci a été analysé en RMN. Malgré la présence d'un seul pic aux analyses en HPLC, il y a eu un phénomène de co-élution. En effet, le RMN révèle la présence d'un mélange de deux composés très similaires présents selon un ratio de 70:30. Une oléfine (région 5,8 ppm) a pu être identifiée ainsi qu'un groupement benzoyle et un oxétane au carbone 20. Toutefois, les analyses n'ont pu être complétées. Les composés trop faibles quantités n'ont pas permis de déterminer les structures avec certitude. Quant aux produits 4.5 et 4.6, l'analyse chromatographique a révélé qu'ils n'étaient pas purs. Le faible poids de ces échantillons (0,74 mg et 0,61 mg) n'a pas permis de poursuivre la purification.

La sous-fraction 5 a été diluée dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiée par HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le Programme D (Annexe 3). Cette première séparation a permis de recueillir deux fractions soit, la première (5.1, figure 23) de 27,6 à 30,7 min et la seconde (5.2, figure 23) de 30,7 à 35,3 min. Celles-ci ont été analysées sur CCM avec des standards (tableau 5).

Tableau 5. Résultats des comparaisons sur CCM des fractions 5.1 et 5.2 avec des standards de *T. canadensis*

FRACTION	SOLVANTS	STANDARDS
5.1 (27,0 à 30,7 min)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1)	DAB INC1 INC2
5.2 (30,7 à 35,3 min)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1)	INC5

Aucune correspondance n'a pu être établie avec les standards utilisés, et ce, pour les deux échantillons. Ceux-ci ont été injectés sur HPLC selon le Programme A (Annexe 3). L'analyse du mélange 5.1 a permis de détecter la présence d'un composé pur au $t_R = 20,8$ min. Celui-ci a été obtenu à raison de 3,21 mg. L'étude de l'échantillon 5.2 a pour sa part révélé la présence d'un pic pur au $t_R = 22,6$ min. 8,40 mg de ce composé ont été recueillis et l'échantillon a été analysés en RMN pour identification. Ce composé s'est révélé avoir une structure non conventionnelle mais tout de même apparentée à celle du Taxol®. Un proton oléfinique ainsi que 2 méthyles couplés à un CH ont été observés. Trois méthyles sur des carbones quaternaires ont pu être identifiés pour un total de 5 groupements méthyle. Plusieurs groupements CH_2 ont aussi été observés dans la partie cachée du spectre de même que de nombreux signaux diffus dans la région 3-4 ppm. Malheureusement, la présence d'impuretés dans l'échantillon a engendré un biais qui n'a pas permis l'identification du composé. Pour ce faire, des étapes de purification supplémentaires seront donc nécessaires.

3.0 Purification des taxanes des boutures de *T. cuspidata*

La première séparation par chromatographie flash de l'extrait de *T. cuspidata* a été réalisée tel que décrit à la section 1.2. Les quatre fractions (7 à 10) qui ont été conservées sont illustrées à la figure 24. Celles-ci avaient des poids respectifs de 24,9 mg, 614,6 mg, 93,4 mg et 102,3 mg. La seconde séparation a quant à elle été effectuée de la même façon que pour l'extrait de *T. canadensis* (section 2.0). Le contenu de chacune des 20 sous-fractions ainsi obtenues a été analysé par CCM avec des standards de même que par HPLC analytique (Waters 600 Controller). Les spectres UV des différents pics chromatographiques ont également été comparés à des standards de taxanes. Suite à cela, 5 de ces sous-fractions ont été sélectionnées pour poursuivre la purification (figure 24).

Après comparaison sur CCM avec un standard de TXL ainsi qu'un standard de CEP, il est apparu que la sous-fraction 1 était susceptible de contenir ces deux taxanes d'intérêt. L'échantillon a été dilué dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifié sur HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le Programme B de l'annexe 3. Une seule fraction a été récoltée soit, de 37,7 à 40,5 min. Celle-ci a été évaporée sous pression réduite et pesée (0,51 mg). Une comparaison sur CCM avec des standards de TXL et de CEP a de nouveau été effectuée. L'élution a été faite dans un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1)

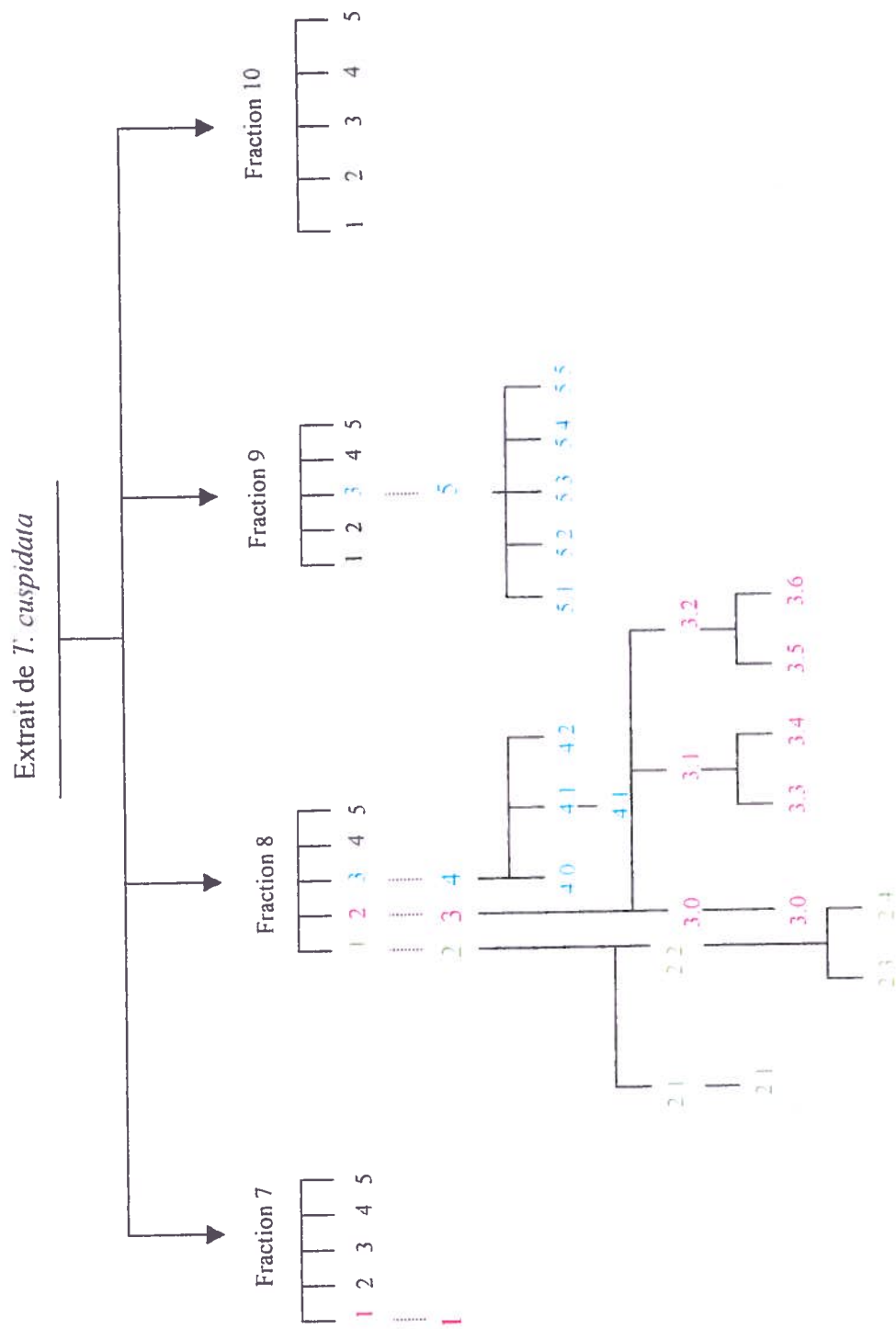


Figure 24. Schéma de purification des taxanes d'intérêt de l'extrait brut de boutures de *T. cuspidata*.

mais aucune concordance n'a pu être établie. La fraction a alors été diluée dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et 50 μL ont été injectés sur HPLC analytique (Waters 600 Controller) selon le Programme C (Annexe 3) afin d'en vérifier la pureté. La présence d'un produit pur au $t_R = 42,0$ min a été observée. Celui-ci a été envoyé en RMN pour identification. Toutefois, trop peu de matériel étant disponible pour les analyses, aucune donnée sur la structure de ce composé n'a pu être obtenue.

La sous-fraction 2 semblait quant à elle pouvoir contenir de la TNN, de la TNE et du ETX suite aux comparaisons sur CCM avec des standards de ces mêmes taxanes (tableau 1). Elle a été diluée dans 3 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiée sur HPLC semi-préparative (Waters Delta Prep 3000, 2 colonnes de 9,4 mm x 250 mm) selon le Programme B (Annexe 3). Deux fractions (2.1 et 2.2) ont alors été récoltées soit de 40,0 à 45,0 min et de 55,0 à 64,0 min. La purification de la fraction 2.1 a été poursuivie sur HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le Programme D (Annexe 3). Deux fractions (de 62,0 à 68,0 min et de 68,0 à 75,0 min) ont été récoltées. La fraction 68,0 à 75,0 min a été comparée à un standard de ETX par CCM. L'élution a été réalisée dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1). La purification de cette fraction a été arrêtée car aucune correspondance n'a été trouvée entre le standard et l'échantillon. La fraction 62,0 à 68,0 min a pour sa part été repurifiée sur HPLC (Programme D-Annexe 3) afin d'être fractionnée en trois. Seule la fraction récoltée de 61 à 65,5 min a été identifiée comme pouvant contenir des taxanes potentiels autres que le TXL, la CEP et le ETX. Les différents composés présents dans cette fraction ont été séparés par CCM sur une plaque de gel de silice de 10 cm x 20 cm et de 250 μm d'épaisseur. L'élution de la plaque a été réalisée dans un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1). Quatre bandes ont ainsi été obtenues, grattées et filtrées sur un entonnoir de verre fritté avec du CH_2Cl_2 ainsi que de l'AcOEt. Le filtrat issu de chacune des bandes a été injecté sur HPLC analytique (Waters 600 Controller, Programme A de l'Annexe 3). Seulement deux échantillons ont alors été conservés, les deux autres ne présentant que de trop faibles quantités de produits

pour poursuivre la purification. Selon le chromatogramme, le premier renfermait un produit unique et pur (2.1, figure 24) au $t_R = 38,6$ min. Il a été pesé (4,10 mg) et analysé en RMN. Ce composé s'est toutefois avéré être un mélange (60:40) de deux isomères soit, la *O*-cinnamoyltaxicine I et la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I (Annexe 9). Le second échantillon ($t_R = 38,0$ min) a quant à lui été de nouveau séparé par CCM (plaque de 10 cm x 20 cm) dans l'AcOEt:MeOH (8:2) et deux bandes ont pu être obtenues. Elles ont toutes deux été injectées sur HPLC analytique (Programme A-Annexe 3). Toutefois, les produits obtenus se sont avérés impurs et en quantités insuffisantes pour poursuivre la purification.

La purification de la fraction 2.2 (figure 24) a été poursuivie au moyen d'une CCM (10 cm x 20 cm et 250 μ m d'épaisseur) dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (99:1). Chacune des deux bandes obtenues a été grattée, filtrée sur entonnoir de verre fritté et injectée sur HPLC analytique (Programme A-Annexe 3). Les deux produits purs (2.3 et 2.4, figure 24) aux $t_R = 52,1$ min ont été pesés (respectivement 0,7 mg et 1,9 mg) et analysés par CCM avec des standards de TNN et de TNE. L'élution a été faite dans le CH_2Cl_2 :MeOH (99:1). Les R_f obtenus (0,36 pour la TNN et 0,28 pour la TNE) étaient concordants. La structure des deux composés a été déterminée par RMN. Les résultats des analyses ont permis de confirmer que le produit 2.3 était bel et bien de la TNN. Quant au produit 2.4, il s'est avéré être de la DTJ et non de la TNE. Les résultats des RMN sont présentés aux Annexes 4 et 5.

La sous-fraction 3 a été comparée sur CCM à des standards de DTX, de TXL et de CEP. Une correspondance a pu être établie pour chacun des taxanes utilisés (R_f DTX = 0,25, R_f TXL = 0,51, R_f CEP = 0,54). L'échantillon a donc été dilué dans 1 mL de CH_3CN :MeOH (1:1) et purifié par HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le programme B (Annexe 3). Suite à cette séparation, 3 fractions ont été récoltées (3.0, 3.1 et 3.2, figure 24). La fraction 3.0 (32,0 à 34,5 min) a été déposée sur CCM et éluée dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (95:5) avec un standard de DTX. Aucune similarité n'a

cependant pu être observée. L'échantillon a alors été dilué dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et 50 μL ont été injectés sur HPLC analytique (Waters 600 Controller) selon le Programme C (Annexe 3). Le produit pur (3.0, figure 24) au $t_R = 37,8$ min a été récolté, pesé (2,0 mg) et identifié en RMN comme étant de la TNM (Annexe 7).

La fraction 3.1 (36,5 à 40,0 min) a été de nouveau purifiée sur HPLC semi-préparative (Waters Delta Prep 3000, 2 colonnes de 9,4 mm x 250 mm) selon le Programme E (Annexe 3). Deux pics (3.3 et 3.4, figure 24) ont été obtenus à 137,2 min et à 177,2 min. Le produit 3.3 a été déposé sur CCM préparative de 10 cm x 20 cm (250 μm d'épaisseur) et élué dans un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5). Cinq bandes distinctes ont ainsi été obtenues, grattées, filtrées sur entonnoir de verre fritté (CH_2Cl_2 et AcOEt) et injectées individuellement sur HPLC analytique (Waters 600 Controller, Programme A-Annexe 3). L'échantillon 3.3 (0,38 mg) a été analysé par RMN afin d'y confirmer la présence de CEP (Annexe 8). Malgré la présence de quelques impuretés, le produit 3.3 a pu être identifié comme étant de la CEP. Quand au produit 3.4, il a été injecté sur HPLC analytique (Programme A-Annexe 3), pesé (0,20 mg) et analysé en FAB- SM . Celui-ci s'est avéré être du TXL.

La fraction 3.2 (40 à 44 min) a quant à elle été séparée par CCM (10 cm x 20 cm et 250 μm d'épaisseur). L'élution a été réalisée dans un mélange de CH_2Cl_2 :acétone (8:2). Chacune des deux bandes obtenues a été injectée sur HPLC analytique (Waters 600 Controller, Programme A-Annexe 3). Les produits 3.5 au $t_R = 38,7$ min et 3.6 au $t_R = 32,1$ min ont ainsi été obtenus et pesés (respectivement 1,41 mg et 0,15 mg). Le composé 3.5 a été analysé en RMN (Annexe 21) mais le composé 3.6 était présent en trop faibles concentrations pour pouvoir être identifié. Suite à l'analyse en RMN, il s'est avéré que 3.5 était un mélange de deux isomères identiques à ceux retrouvés dans la fraction 2.1 soit, la *O*-cinnamoyltaxicine I et la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I. Deux impuretés ont été décelées dans le mélange. Celles-ci étant minoritaires, elles n'ont pas

empêché l'identification des deux isomères principaux. Les quatre composés sont présents selon des proportions de 43:37:11:9.

La sous-fraction 4 a été solubilisée dans 2 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiée sur HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le Programme A (Annexe 3). Trois fractions ont été récoltées soit 4.0 de 23,0 à 25,0 min, 4.1 de 28,0 à 31,0 min et 4.2 de 31,0 à 33,0 min (figure 24). Les trois fractions ont été tour à tour déposées sur CCM avec des standards de BCTV, de HAB et de TXC afin d'évaluer leur contenu potentiel en taxanes. L'élution a été effectuée dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5). Seule une correspondance entre la fraction 4.1 et la TXC a pu être établie ($R_f = 0,27$). Les fractions 4.0, 4.1 et 4.2 ont été fractionnées une à une sur CCM préparative (10 cm x 10 cm, 250 μm d'épaisseur) en utilisant comme éluant un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5). Deux éluions successives ont été réalisées pour obtenir une bonne séparation des bandes. Celle-ci a permis l'obtention de 5 bandes pour la fraction 4.0, 4 pour la fraction 4.1 et 5 pour la fraction 4.2. Chacune des bandes a été grattée et filtrée avec du CH_2Cl_2 ainsi que de l'AcOEt sur entonnoir de verre fritté. Après évaporation sous pression réduite, elles ont été déposées sur CCM avec des standards mais seule une correspondance entre la bande 3 de la fraction 4.1 et le standard de TXC a pu être observée. Celle-ci a été injectée sur HPLC analytique (Waters 600 Controller, Programme A-Annexe 3). Un produit pur (4.1, figure 24) au $t_R = 32,1$ min a été obtenu, pesé (1,4 mg) et analysée en RMN. Il ne s'agit pas de la TXC mais plutôt de la TNM (Annexe 18).

La sous-fraction 5 a été solubilisée dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiée sur HPLC préparative (Waters Delta Prep 3000, colonne de 22 mm x 500 mm) selon le Programme B (Annexe 3). Deux fractions d'intérêt (A :16 à 20,5 min et B :40 à 44,5 min) ont ainsi été récoltées. La fraction A, renfermant un composé pur, a été comparée à un standard de DAB sur CCM. L'élution s'est faite dans un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1) et une similarité entre les deux taxanes a été

observée ($R_f = 0,24$). Le produit pur (5.1, figure 24) a été dissous dans 1 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et 50 μL ont été injectés sur HPLC analytique (Waters 600 Controller, Programme A-Annexe 3). Un pic au $t_R = 20,9$ min a été obtenu. Celui-ci a été évaporé sous pression réduite, pesé (0,81 mg) puis, identifié en RMN (Annexe 6) comme étant de la DAB. La fraction B a été fractionnée par CCM préparative (10 cm x 20 cm, 250 μm d'épaisseur) éluée dans un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5). Trois bandes ont ainsi été obtenues, grattées, filtrées sur entonnoir de verre fritté (CH_2Cl_2 et AcOEt) et injectées sur HPLC analytique (Programme A-Annexe 3). Trois pics à 39,9 min (5.2), 38,6 min (5.3) et 38,2 min ont été visualisés. Selon leurs propriétés chromatographiques, les composés 5.2 et 5.3 semblaient purs. Ils ont été évaporés sous pression réduite et pesés (5.2 = 1,00 mg, 5.3 = 1,44 mg). Ces deux taxanes ont été analysés en RMN. Il s'est toutefois avéré y avoir eu un phénomène de co-élution puisque 5.2 a été identifié comme étant un mélange de deux isomères soit, la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine II et la 5-cinnamoyl-9-acétyltaxicine II (Annexe 19). Il n'a cependant pas été possible de déterminer le ratio de ces deux composés. Quant à 5.3, il s'est avéré être aussi un mélange de deux isomères et d'une impureté. Ces isomères sont identiques à ceux déjà identifiés dans 2.1 et 3.4 (Annexe 20). Les trois composés sont présents selon des proportions de 69:18:13. Quand au pic à 38,2 min, il a de nouveau été purifié par CCM (10 cm x 20 cm, 250 μm d'épaisseur) dans l'AcOEt:hexane (8:2). Deux bandes (5.4 et 5.5, figure 24) ont été obtenues. Leurs trop faibles concentrations n'ont cependant pas permis de poursuivre les analyses. Le tableau 6 présente une récapitulation des différents taxanes retrouvés au sein des boutures d'if du Canada et d'if du Japon.

Tableau 6. Abondance des taxanes retrouvés au sein des boutures de *T. canadensis* et *T. cuspidata*

Taxane	<i>T. cuspidata</i> Figure 24	<i>T. canadensis</i> Figure 23
9-dihydro-13-acétylbaccatine III	-	0,008% (1.10, 1.11, 2.1)
10-désacétylbaccatine III	0,001%	0,009%

	(5.1)	(3.1, 4.2)
Paclitaxel	0,0002% (3.4)	0,005% (1.13)
Céphalomannine	0,0005% (3.3)	0,005% (1.12)
Taxinine	0,003% (2.2)	0,006% (1.14)
Taxinine E	-	0,002% (1.15)
Taxinine M	0,003% (3.0, 4.1)	-
2-désacétoxytaxine J	0,0009% (2.3)	-
O-cinnamoyltaxicine I	0,005% (2.1, 3.5, 5.3)	-
5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I	0,003% (2.1, 3.5, 5.3)	-
5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine II	0,001%* (5.2)	-
5-cinnamoyl-9-acétyltaxicine II	0,001% (5.2)*	-
10-désacétyltaxol	-	0,003% (3.3)

*Ces pourcentages sont extrapolés puisque le ratio des isomères présents dans le mélange n'a pu être déterminé

4.0 Expériences de nutrition des tissus à partir de broyats d'aiguilles de *T. canadensis*

4.1 Récolte et entreposage des tissus

Des branches d'if du Canada d'environ 60 à 70 cm de longueur ont été récoltées à Blainville (Québec) au début du mois de juin 1998. Les tiges ainsi obtenues ont été entreposées à 4°C dans un mélange à proportions égales de terre et de sable. L'entreposage s'est déroulé à l'obscurité ainsi qu'à une humidité relative de 85 pourcent (%). Un arrosage hebdomadaire du sol a été réalisé.

4.2 Nettoyage des tissus sélectionnés

Pour la réalisation des essais de nutrition à partir d'aiguilles d'if du Canada, seules des pousses d'un an et moins ont été utilisées. Ces pousses ont d'abord été nettoyées à l'aide d'une solution hypochlorite 2% et ce, pendant 3 min sous agitation constante. Elles ont par la suite été rincées à l'eau distillée pendant 3 min, toujours sous agitation. Un second rinçage à l'eau distillée a été effectué. Les pousses propres ont été déposées sur 5 épaisseurs de gaze et mises à 4°C jusqu'à élimination du surplus d'eau.

4.3 Préparation des tissus

Les aiguilles nettoyées ont d'abord été détachées des tiges puis déposées dans un bécher stérile préalablement pesé. Celles-ci ont par la suite été découpées en pièces de 0,5 à 0,8 cm à l'aide de ciseaux stériles. Environ 15 g d'aiguilles ont été utilisés pour chaque échantillon. Ceux-ci ont été transférés dans un flacon Erlenmeyer stérile de 250 mL selon le montage illustré à la figure 25.

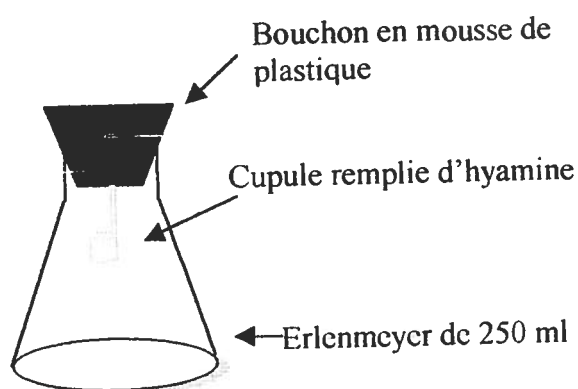


Figure 25. Montage pour les expériences de nutrition des tissus à partir de broyats d'aiguilles d'if du Canada

Une cupule de plastique renfermant 500 μ L d'hyamine 1 millimolaire (mM) a été ajoutée à chacun des montages. La mesure du gaz carbonique radioactif ($^{14}\text{CO}_2$) absorbé par l'hyamine a été prise quotidiennement afin de s'assurer de la survie

des tissus tout au long de l'expérience. Dans des conditions stériles, la cupule d'hyamine renfermant le gaz carbonique radioactif absorbé a été retirée et remplacée par une nouvelle. La vieille cupule a été déposée dans un flacon à scintillation. Deux millilitres de liquide à scintillation ont été ajoutés et après avoir été vigoureusement agité, le flacon scellé a été déposé dans le compteur à scintillation (Tracor Analytic Delta 300, 6891 Liquid Scintillation System) pour une lecture de 20 min (2 Sigma = 0,25%).

La mesure de la radioactivité résiduelle dans le tampon a aussi été mesurée. Trois aliquots de 10 µL de tampon ont été prélevés tous les deux jours dans chaque échantillon et déposés dans des flacons à scintillation. La mesure a été prise selon les mêmes paramètres que pour le $^{14}\text{CO}_2$.

4.4 Expériences de nutrition des tissus à partir de broyats d'aiguilles de *T. canadensis*

Plusieurs expériences ont été réalisées. Différentes conditions expérimentales ont été testées afin d'optimiser les taux d'incorporation obtenus. Deux précurseurs ont été utilisés soit, le D-[U- ^{14}C]-glucose et le R-[2- ^{14}C]-mévalonate. Le mévalonate a été préalablement hydrolysé selon la méthode de Zamir *et al.* (1987). Les expériences ont toutes été effectuées en duplicata ainsi qu'en présence de contrôles positifs et négatifs. Les contrôles négatifs utilisés sont identiques aux essais mais dépourvus de radioactivité donc, de toute source de carbone assimilable. Quant aux contrôles positifs, ils renferment une quantité de mévalonate et de glucose (selon le cas) équivalente à ceux des essais mais non radioactifs.

4.4.1 Essai 1

Le premier essai a été réalisé à l'aide d'un tampon phosphate 100 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) à pH 7,0. Celui-ci a été stérilisé à l'autoclave 20 min à 121 °C. Il a par la suite été complété à l'aide de DTT 10 mM et de kinétine 0,5 milligrammes par litre (mg/L). Ceux-ci ont été préalablement stérilisés par filtration (filtre Gelman Science, 0,45 μm). À chaque échantillon de 15 g d'aiguilles ont été ajoutés 100 mL de solution tampon. Lors de cette première série d'expériences l'utilisation de trois précurseurs a été testée soit: 1) le D-[U- ^{14}C]-glucose, 2) le R-[2- ^{14}C]-acide mévalonique hydrolysé et 3) une combinaison des deux produits. Entre 5 et 10 microcuries (μCi) ont été ajoutés à chaque échantillon pour l'essai avec du mévalonate, 20 à 25 μCi pour l'essai avec du glucose et 15 à 18 μCi pour la combinaison des deux précurseurs. Finalement, comme le montre la figure 25, les cupules de plastique insérées à l'intérieur des systèmes ont été remplies d'une solution stérile d'hyamine 1 mM (500 μL). Les montages ont été incubés pendant 14 jours à température de la pièce (TP) ainsi qu'à l'obscurité totale.

La figure 26 illustre les variations de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive tout au long de la période dite « d'alimentation ».

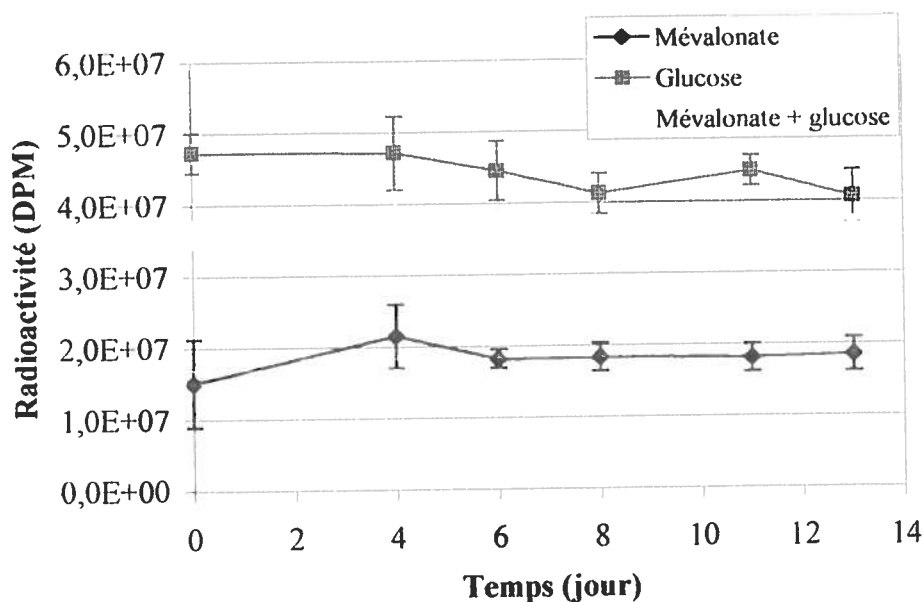


Figure 26. Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour l'essai 1 des expériences de nutrition des tissus avec des broyats d'aiguilles de *T. canadensis*

4.4.2 Essai 2

Pour le second essai de nutrition avec des broyats d'aiguilles de *T. canadensis*, un tampon 5 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) à pH 5,5 a été utilisé. Il a été préparé de la même façon que lors de l'essai 1 mais a été supplémenté de DTT (1 mM), de kinétine (0,5 mg/L), de phénylalanine (2 mM) et de Tween 20 (0,05%). Tous ces suppléments ont été stérilisés par filtration, comme lors de l'essai 1, avant leur ajout. Deux précurseurs ont été testés soit: le mévalonate seul (25 $\mu\text{Ci}/\text{échantillon}$) ainsi que le glucose seul (28 $\mu\text{Ci}/\text{échantillon}$). Les cupules de plastiques ont été remplies d'hyamine (1 mM) puis les montages ont été laissés à l'obscurité totale, à TP, pour 14 jours. Parallèlement à ces essais, des contrôles avec un tampon 5 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) à pH 7,0 supplémentés uniquement de Tween 20% ont été réalisés afin de tester l'effet de l'ajout de détergent sur la viabilité des tissus.

Pour cet essai, le suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive au cours de l'expérience de nutrition n'a pu être réalisé. En effet, le pH très acide du tampon de nutrition n'a pas permis de maintenir la viabilité des tissus pendant la période requise de 14 jours. Les aiguilles de même que la solution ont pris une coloration orangée dès les premiers jours de l'expérience et la très faible mesure du CO₂ radioactif produit a permis de déterminer une quasi absence de respiration cellulaire dans les systèmes. De plus, une analyse des échantillons sur HPLC n'a pas permis de mettre en évidence des concentrations supérieures de Taxol® dans les essais par rapport aux contrôles.

4.4.3 Essai 3

Le troisième essai a pour sa part été réalisé à l'aide d'un tampon 5 mM (KH₂PO₄/NaOH) à pH 7,0. Il a été préparé selon la même méthode que lors des essais précédents mais il a cette fois été supplémenté de DTT (1,0 mM), de phénylalanine (2 mM), de Tween 20 (0,05%), de sucrose (0,5 M), et de jasmonate de méthyle (200 µM). Le jasmonate de méthyle a été ajouté au 7^e jour d'incubation. Deux précurseurs ont été utilisés soit, le mévalonate seul (36 µCi/échantillon) ainsi que le glucose seul (68 µCi/échantillon). Les cupules de plastique ont encore une fois été remplies d'hyamine 1 mM. Les essais ont été réalisés à l'obscurité totale, à TP et pour 14 jours. Les fluctuations de la radioactivité présente dans la solution nutritive au cours de l'expérience de nutrition apparaissent à la figure 27.

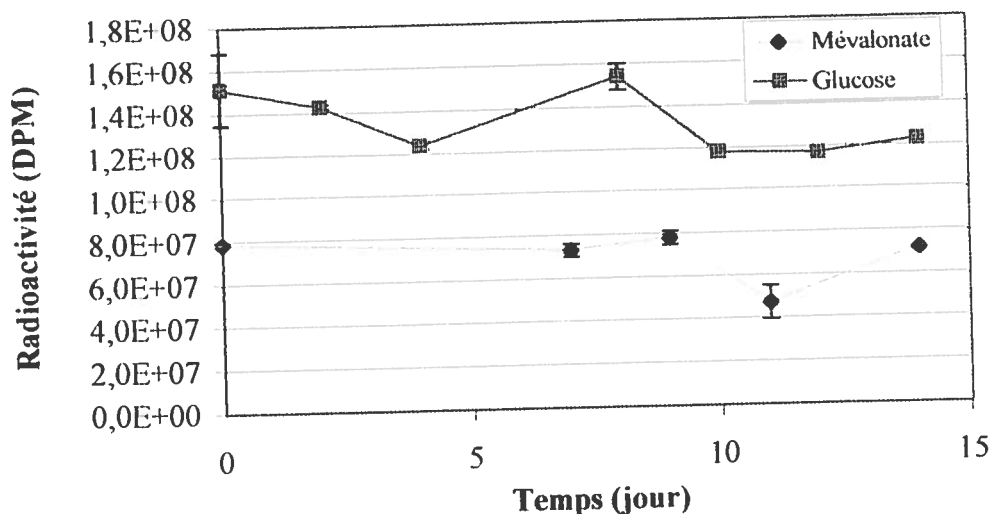


Figure 27. Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour l'essai 3 des expériences de nutrition des tissus avec des broyats d'aiguilles de *T. canadensis*

4.5 Lavage des tissus nourris

Afin de pouvoir subséquemment procéder à l'extraction des taxanes contenus dans les tissus utilisés pour les expériences de nutrition, les échantillons ont d'abord été filtrés sous vide (Whatman #1). Les broyats d'aiguilles ont par la suite été rincés à plusieurs reprises avec de l'eau distillée afin d'éliminer toute radioactivité résiduelle attribuable au tampon de nutrition. Les rinçages ont été arrêtés lorsque la radioactivité des eaux de filtration a atteint les 40 à 50 comptes par minute (CPM). Les aiguilles rincées ont été déposées dans des flacons Erlenmeyer propres de 125 mL.

4.6 Extraction des taxanes d'intérêt

Quatre extractions consécutives avec 50 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$ (9:1) ont été réalisées sous agitation mécanique constante pour une période de 24 h. Les solvants d'extraction obtenus pour un échantillon donné ont été combinés et

évaporés sous pression réduite. Les extraits bruts ont été suspendus dans 200 mL d'eau distillée chaude (environ 100°C) puis déposés dans une ampoule à décantation. Trois extractions à l'hexane (200 mL chacune) ont été réalisées. Les suspensions aqueuses (phases inférieures) ont été conservées, combinées et saturées en NaCl. Trois nouvelles extractions au CH_2Cl_2 (200 mL chacune) ont finalement été effectuées. Les phases organiques (phases inférieures) ont été conservées, combinées et séchées sur Na_2SO_4 anhydre. Les extraits ont été évaporés sous pression réduite et conservés à -20°C jusqu'aux analyses subséquentes.

4.7 Purification des taxanes d'intérêt

Cinq taxanes cibles ont été choisis pour le suivi des incorporations soit: la DAB, la DHB, le CDN, la CEP et le TXL. Les extraits bruts ont été purifiés par HPLC préparative. Ce système consistait en deux colonnes analytiques Whatman Partisil-10 ODS-2 (4,6 mm x 250 mm) montées en série et couplées à un système HPLC Perkin-Elmer Binary LC Pump 250 relié à un détecteur à arrangement de photodiode Waters Photodiode Array Detector ajusté à 227 nm. Un ordinateur NEC APC IV PowerMate 2 connecté au système a servi aux analyses. Afin d'obtenir des concentrations suffisantes pour permettre un suivi des taxanes choisis, 20 injections de 100 μL (Programme A-Annexe 3), de chacun des extraits bruts ont été effectuées. Des fractions de 1 mL ont été récoltées et combinées tel que décrit au tableau 7.

Tableau 7. Fractions d'intérêt combinées suite à l'injection des extraits bruts d'aiguilles de *T. canadensis*

TAXANE CIBLE	FRACTIONS COMBINÉES
DAB	17 à 22 min
DHB et CDN	25 à 31 min
CEP et TXL	31 à 36 min

4.7.1 Purification de la 10-désacétylbaccatine III

Les fractions 17 à 22 min ont été combinées puis évaporées sous pression réduite. L'extrait obtenu a été dissous dans 100 µL de CH₃CN:MeOH (1:1) et purifié par HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme F-Annexe 3). Les fractions éluant entre 33 et 40 min ont été récoltées, combinées, évaporées puis redissoutes dans 100 µL de CH₃CN:MeOH (1:1). Ce mélange a de nouveau été purifié sur HPLC préparative (Programme G-Annexe 3). Les fractions éluant entre 15 et 18 min ont été conservées, évaporées, solubilisées dans 100 µL de CH₃CN:MeOH (1:1) puis repurifiées sur HPLC préparative (Programme H-Annexe 3). Les fractions éluant entre 25 et 30 min ont été récoltées, combinées, évaporées sous pression réduite et diluées dans 100 µL de CH₃CN:MeOH (1:1). Le produit obtenu a été purifié une dernière fois, toujours sur HPLC préparative (Programme A-Annexe 3).

La figure 28 montre les chromatogrammes obtenus suite à la purification de la DAB issue de l'essai 1. Pour les trois sources de carbone, un pic aux dimensions très réduites a été obtenu à un temps de rétention correspondant au standard de DAB. Les produits purifiés ont été envoyés en spectrométrie de masse de type FAB (SM-FAB) afin de confirmer leur structure (Annexe 23). Les volumes extraits et purifiés sont identiques pour tous les taxanes cibles comme cela a été expliqué dans la méthode. Les contrôles négatifs ont montré des profils chromatographiques similaires. Cela s'explique par les faibles incorporations de précurseurs qu'il est possible d'obtenir chez les végétaux. En effet, comme peu de composés sont synthétisés *de novo*, les variations de la hauteur des pics ne sont pas significatives. Seul le suivi de la radioactivité l'est.

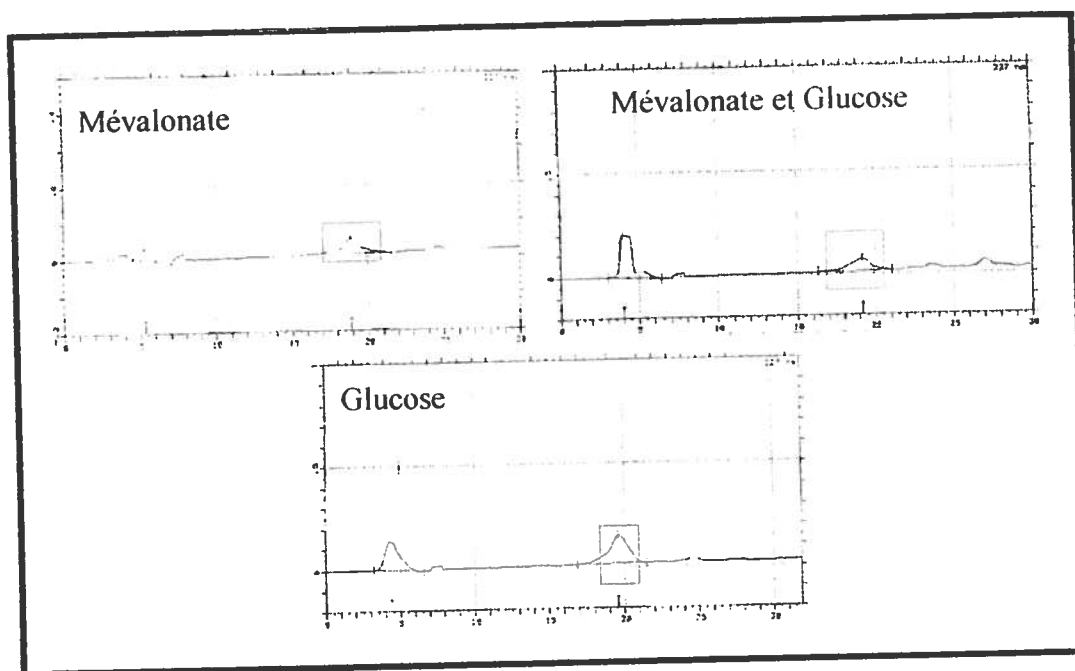


Figure 28. 10-désacétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 1 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

La figure 29 montre, pour sa part, la DAB purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus. Encore une fois, des pics aux dimensions réduites ont été obtenus au même temps de rétention que le standard et ce, pour les deux sources de carbone utilisées. La DAB purifiée a été analysée en SM-FAB pour en confirmer la structure (Annexe 23).

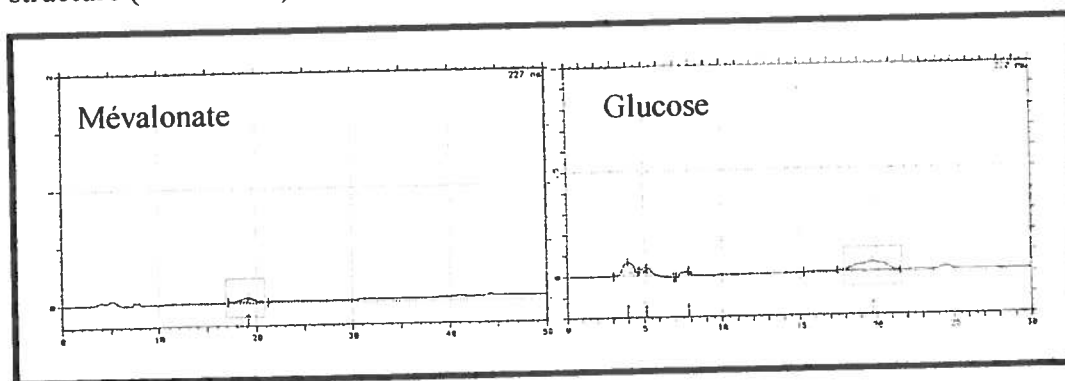


Figure 29. 10-désacétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

4.7.2 Purification de la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III et du canadensène

Les fractions éluant entre 25 et 30 min ont été combinées puis évaporées sous pression réduite. Après dissolution dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) l'extrait a été purifié sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme I-Annexe 3). Les fractions éluant entre 18 et 23 min ont été récoltées, combinées puis évaporées. Le produit ainsi obtenu a été solubilisé dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et il a été purifié sur HPLC préparatif (Programme J-Annexe 3). Les fractions éluant entre 12 et 16 min ont été récoltées, combinées puis évaporées. L'extrait partiellement purifié a par la suite été séparé par CCM préparative. Il a été solubilisé dans 100 μ L de CH_2Cl_2 et déposé sur une plaque de gel de silice de 20 cm x 20 cm et de 250 μ m d'épaisseur (Silica gel 60, EM Science). Le flacon contenant l'extrait a été rincé à deux reprises avec 50 μ L de CH_2Cl_2 et les produits de rinçage ont aussi été déposés sur la plaque. Un standard de CDN ainsi qu'un standard de DHB ont été déposés à chacune des extrémités de cette même plaque. Celle-ci a ensuite été éluée dans l'AcOEt 100% et visualisée sous les UV. Les standards ont été développés par vaporisation d'un mélange d' H_2SO_4 10% dans l'EtOH suivie d'un chauffage tandis que l'échantillon séparé a été recouvert d'une plaque de verre afin de ne pas être oxydé par l'agent de développement. La silice a été grattée aux R_f correspondant à ceux des standards. Les produits ont alors été extraits de la silice par passage sur une colonne de ouate de 3 cm avec 10 mL d'un mélange d'AcOEt:MeOH (8:2). Les deux fractions purifiées ont été évaporées sous pression réduite, solubilisées dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiées par HPLC préparative (Programme A-Annexe 3).

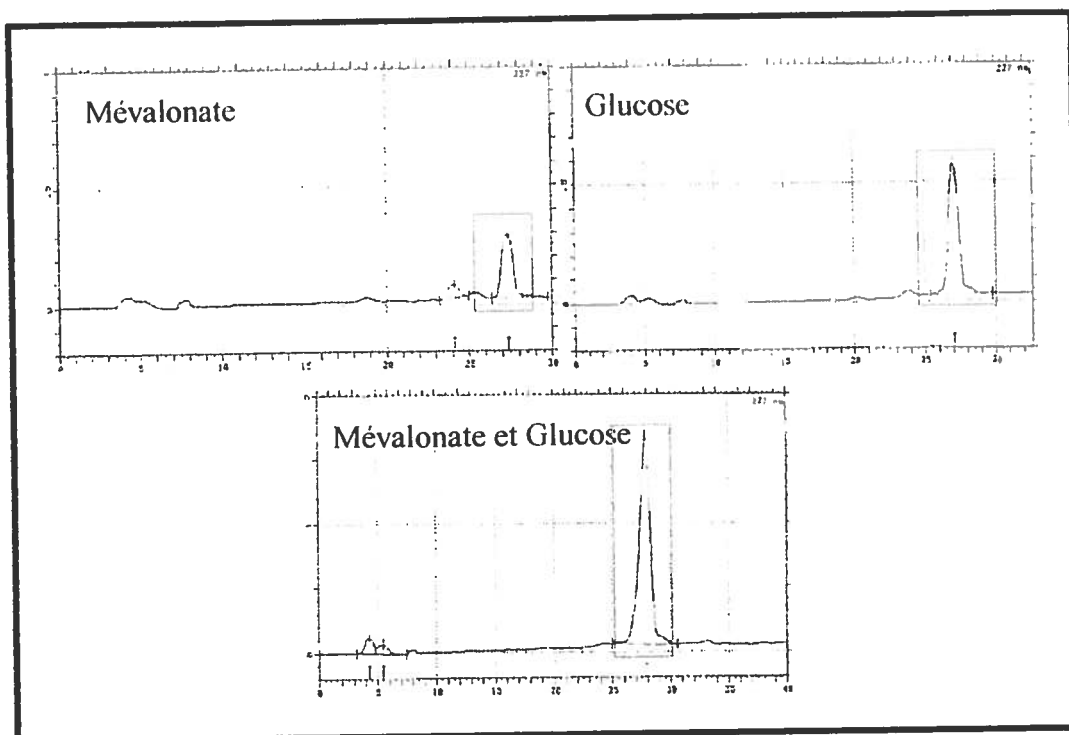


Figure 30. 9-dihydro-13-acétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 1 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

La figure 30 illustre les pics chromatographiques obtenus suite à la purification de la DHB issue de l'essai 1 de nutrition des tissus. Les temps de rétention de ces pics correspondent à celui du standard. La DHB purifiée a été analysée en SM-FAB afin d'en confirmer la structure (Annexe 23).

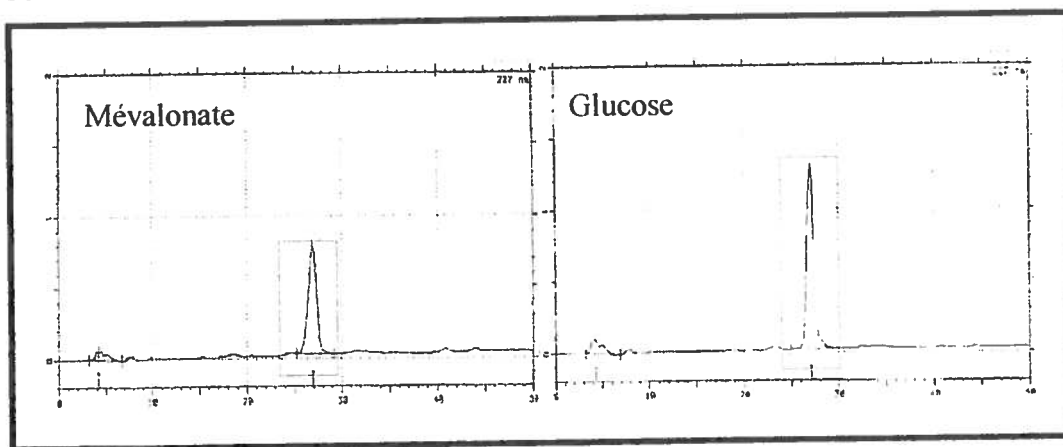


Figure 31. 9-dihydro-13-acétylbaccatine III purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

La DHB obtenue suite à la purification des extraits de l'essai 3 de nutrition des tissus apparaît à la figure 31. Deux pics similaires à ceux obtenus lors de l'essai 1 ont été observés pour les deux sources de carbone. La DHB issue de l'essai 3 a elle aussi été analysée en SM-FAB afin d'en confirmer la structure (Annexe 23).

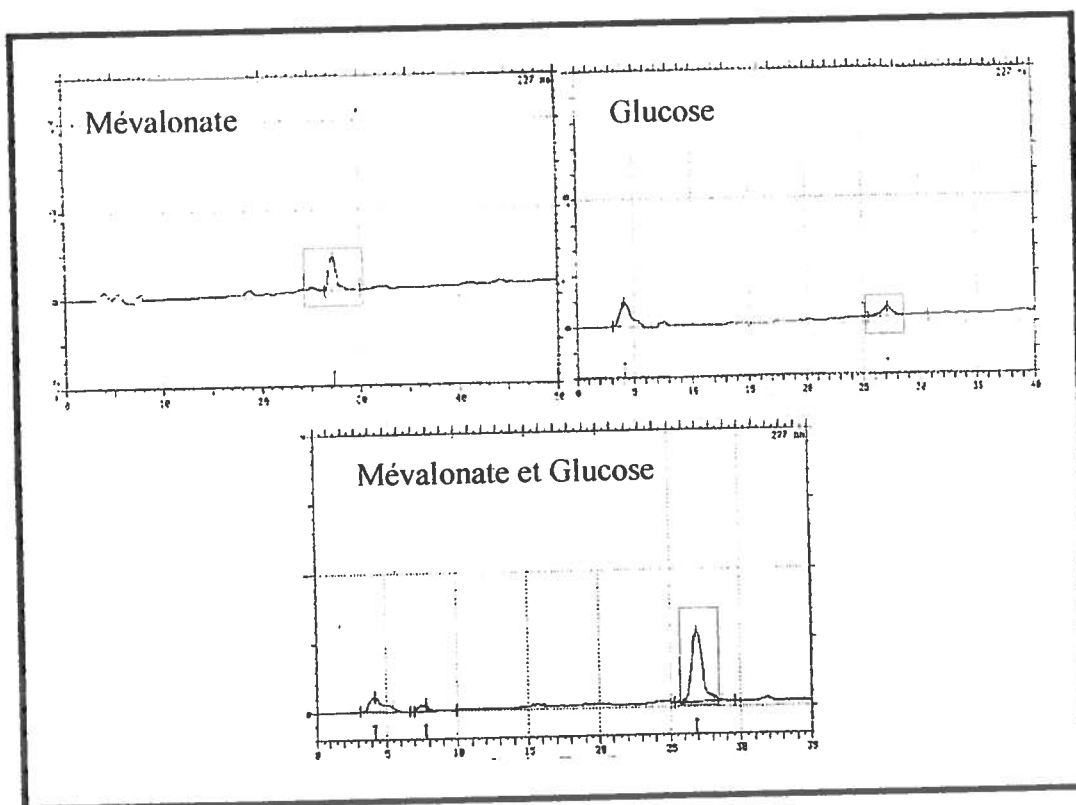


Figure 32. Canadensène purifié lors de l'essai 1 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

Les figures 32 et 33 présentent les chromatogrammes obtenus suite à la purification du CDN issu des essais 1 et 3. Bien que des pics réduits aient été obtenus à un temps de rétention correspondant à celui du standard, aucun pic de CDN n'a pu être observé pour l'essai 3. La structure du CDN obtenu n'a pas été confirmée par SM-FAB ce qui est peu surprenant puisque le canadensène doit généralement être purifié à partir de volumes d'extraction de plusieurs kilogrammes pour pouvoir être détecté.

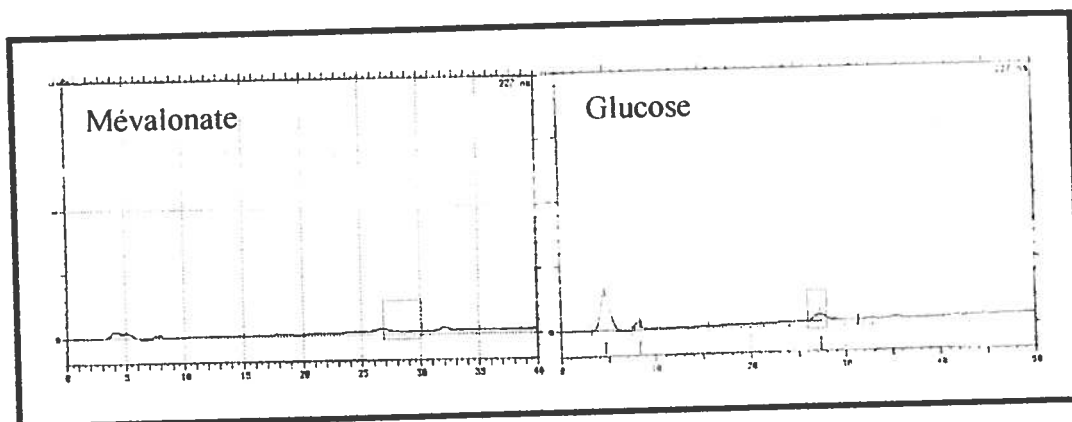


Figure 33. Canadensène purifié lors de l'essai 3 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

4.7.3 Purification de la céphalomannine et du Taxol®

Les fractions éluant entre 31 et 36 min, renfermant la CEP et le TXL, ont été combinées, évaporées puis solubilisées dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1). L'extrait partiellement purifié a été purifié par HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme J-Annexe 3). Les fractions éluant entre 21 et 28 min ont été récoltées, combinées, évaporées et dissoutes dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1). Le mélange a été repurifié sur HPLC préparative (Programme K-Annexe 3). Les fractions éluant entre 14 et 19 min de cette dernière injection ont été récoltées, combinées et évaporées sur évaporateur rotatif. Elles ont été solubilisées dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiées sur HPLC préparative (Programme E-Annexe 3). Les fractions éluant entre 155 et 164 min ont été combinées (CEP). Les fractions éluant entre 182 et 192 min ont également été combinées (TXL). Ces fractions ont été évaporées sous pression réduite, solubilisées dans 100 μ L de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1) et purifiées une dernière fois sur HPLC préparative (Programme A-Annexe 3).

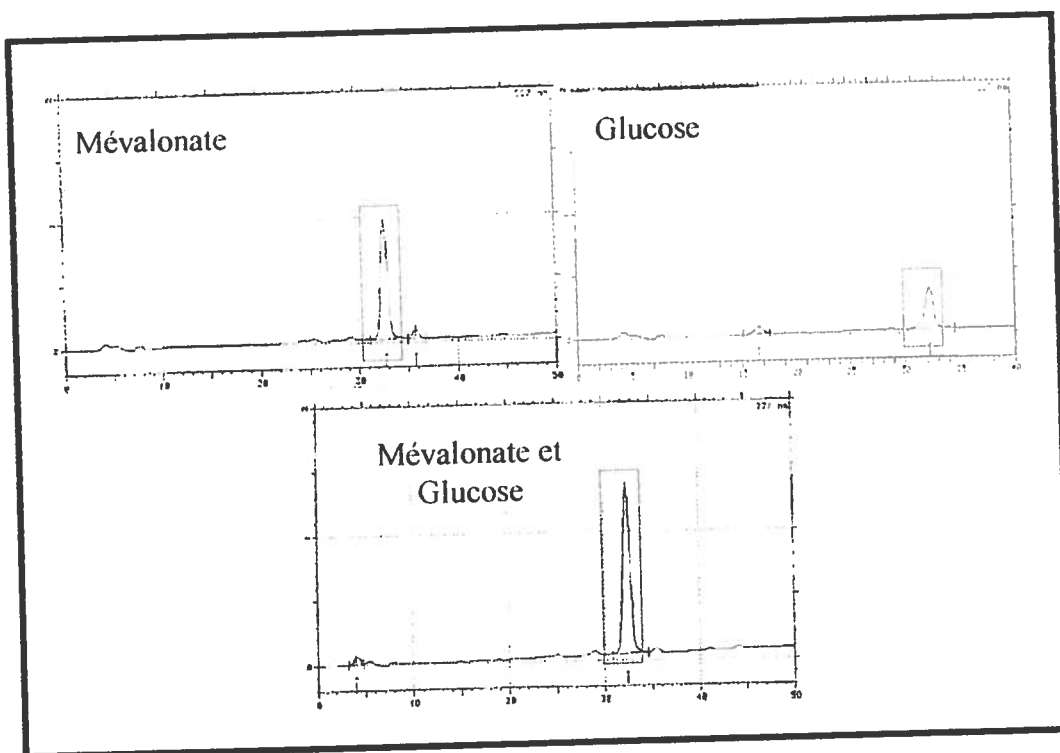


Figure 34. Taxol® purifié lors de l'essai 1 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

Les figures 34 et 35 présentent le TXL purifié des essais 1 et 3 de nutrition des tissus. Des pics aux dimensions supérieures à celles obtenues précédemment pour les autres taxanes ont été observés pour les deux essais de même que pour l'ensemble des sources de carbone utilisées. La structure du TXL purifié a été confirmée par SM-FAB (Annexe 23).

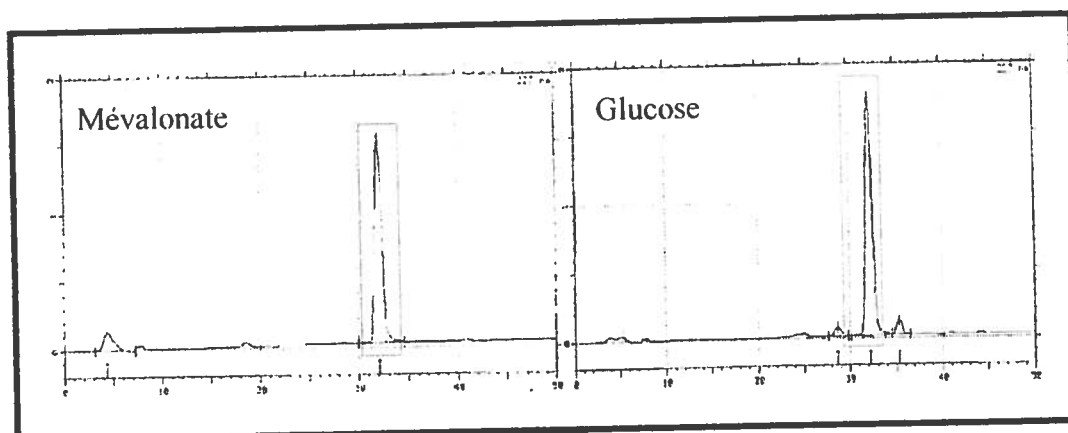


Figure 35. Taxol® purifié lors de l'essai 3 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

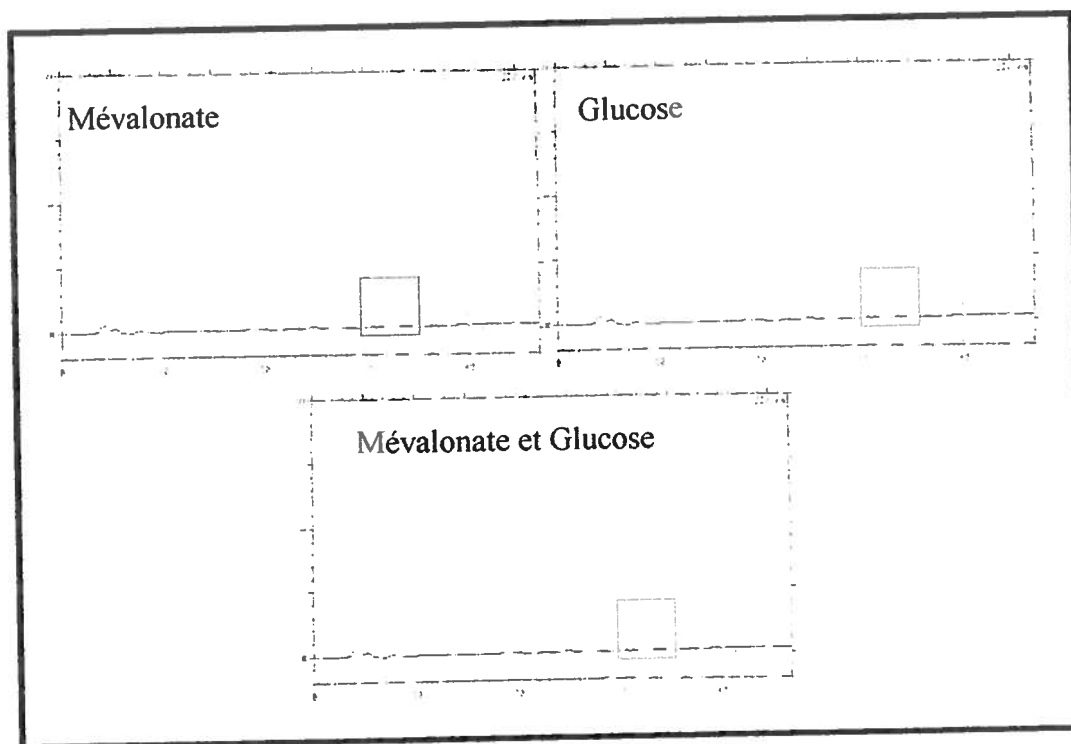


Figure 36. Céphalomannine purifiée lors de l'essai 1 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

Les figures 36 et 37 illustrent les pics de CEP obtenus suite à la purification des extraits des essais 1 et 3. La figure 36 montre bien qu'aucune CEP n'a pu être purifiée lors de l'essai 1 et ce, peu importe la source de carbone utilisée. Des pics de faible taille ont cependant été obtenus lors de l'essai 3. La structure de la CEP issue de l'essai 3 a été confirmée par des analyses en SM-FAB (Annexe 23).

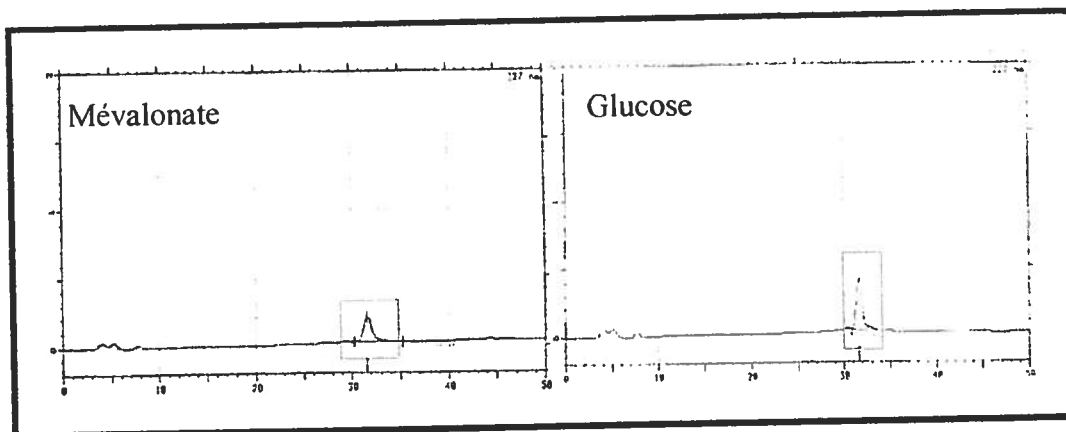


Figure 37. Céphalomannine purifiée lors de l'essai 3 de nutrition des tissus avec des aiguilles de *T. canadensis* sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

La radioactivité de chaque produit purifié, issu des essais 1 et 3 de nutrition des tissus à partir d'aiguilles de *T. canadensis* a été réalisée. Celle-ci a été mesurée au moyen d'un compteur de radiations (Tracor Analytic Delta 300, 6891 Liquid Scintillation System). À chaque échantillon ont été ajoutés 2 mL de liquide à scintillation et le comptage a été effectué pendant 20 minutes (2 sigma = 0,25%). Les figures 38 et 39 illustrent les incorporations relatives obtenues pour les essais 1 et 3. Ces incorporations relatives sont des données en pourcentages. Celles-ci permettent la comparaison, les uns par rapport aux autres, des incorporations de précurseurs obtenues pour les taxanes cibles observés. Les incorporations obtenues pour la CEP n'apparaissent pas à la figure 38 puisque, comme illustré à la figure 36, aucune CEP n'a pu être purifiée lors de l'essai 1.

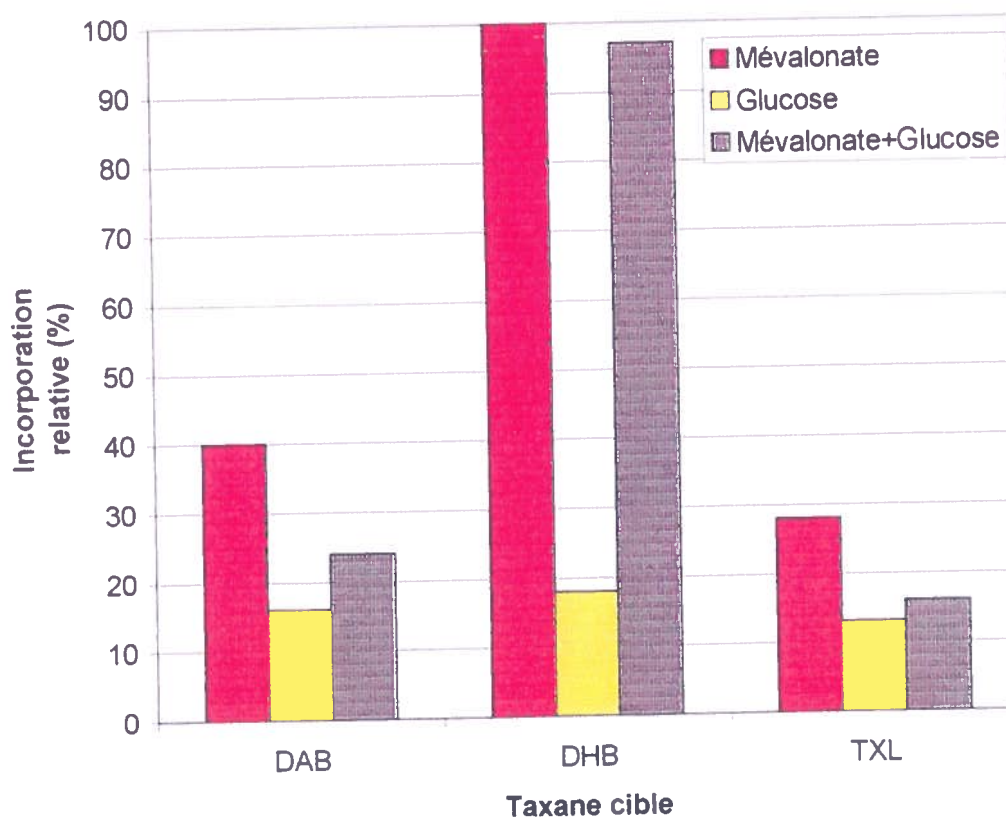


Figure 38. Incorporations relatives des différents taxanes cibles obtenues lors de l'essai 1 de nutrition des tissus avec des aiguilles broyées de *T. canadensis*.

Les incorporations obtenues ont été transformées en incorporations relatives afin de permettre la comparaison, les unes par rapport aux autres, des données obtenues pour chaque taxane. Cela s'est fait selon la méthode suivante : Imaginons deux valeurs d'incorporation x et y . L'incorporation la plus élevée (x) a été ramenée à 100%. Les valeurs d'incorporation des autres taxanes cibles (y) ont par la suite été converties de façon à les exprimer par rapport à cette nouvelle valeur de x . Ainsi si x correspond maintenant à 100%, à quel pourcentage de x la valeur y correspond-t-elle. Cela s'est fait selon une simple règle de trois.

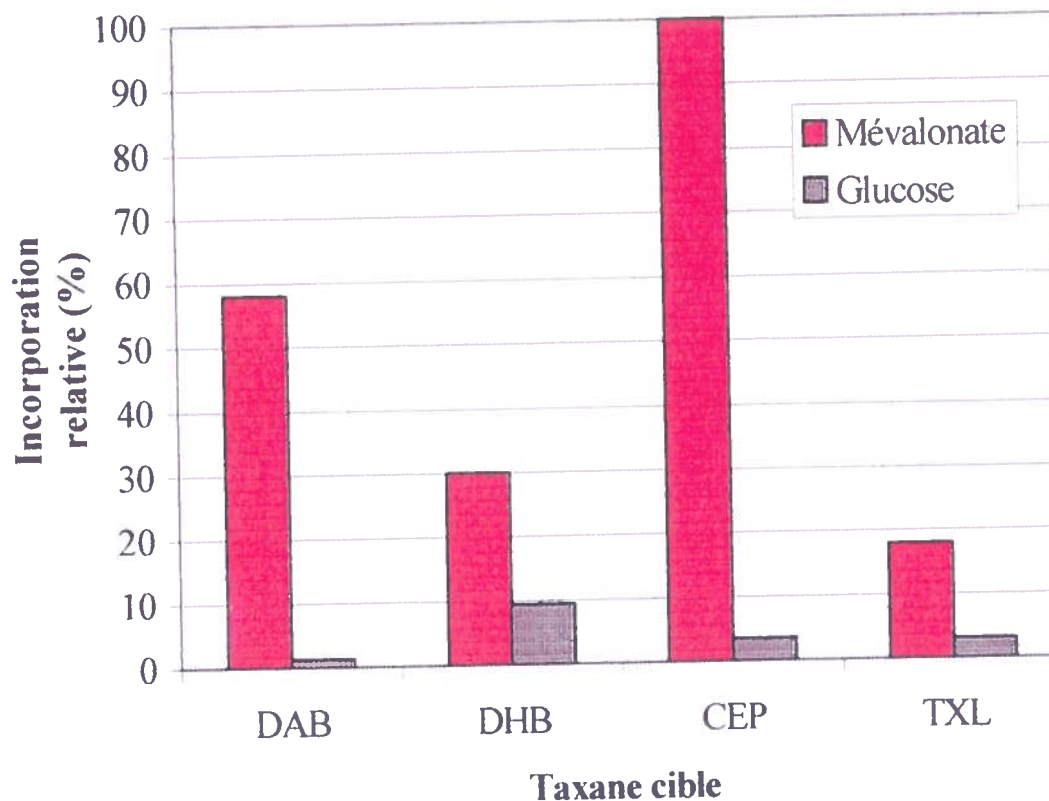


Figure 39. Incorporations relatives des taxanes cibles obtenus lors de l'essai 3 de nutrition des tissus avec des aiguilles broyées de *T. canadensis*.

5.0 Expériences de nutrition des tissus à partir de plants bouturés de *T. canadensis* et *T. cuspidata*

Des boutures de 3 mois de *T. canadensis* et de *T. cuspidata* ont été utilisées (Pépinrière Cramer, Les Cèdres). Celles-ci ont été conservées à 4°C, dans le noir, jusqu'à leur utilisation. Elles ont été arrosées de façon hebdomadaire.

5.1 Préparation des plants

Les plants ont été nettoyés de tout débris de sol, en prenant bien soin de ne pas endommager les racines. Celles-ci ont été rincées à l'eau distillée puis éponnées.

Les montages ont été réalisés comme illustré à la figure 40.

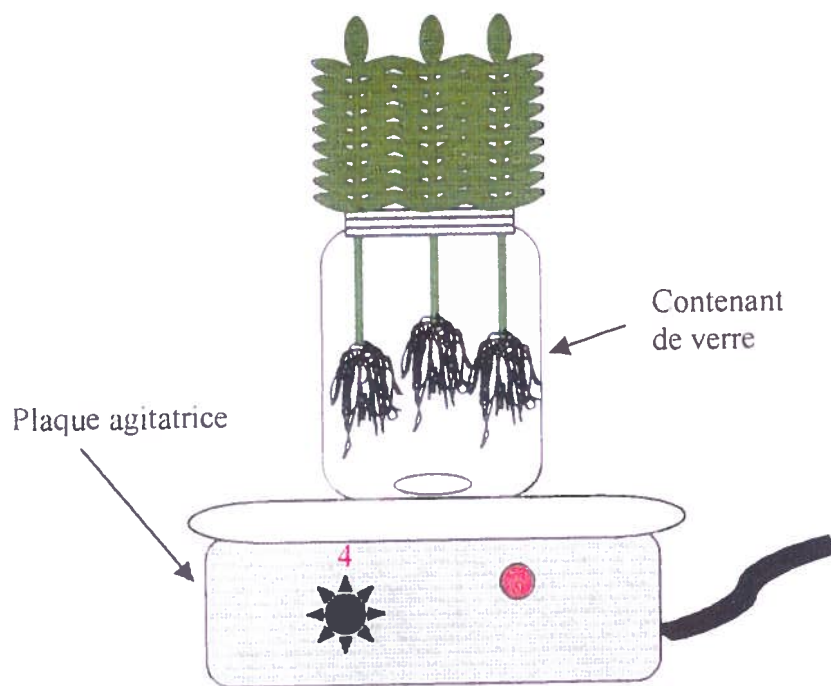


Figure 40. Schématisation des montages utilisés pour les expériences de nutrition des tissus avec des boutures d'if.

5.2 Préparation de la solution nutritive et des montages

La solution nutritive d'Hoagland a été préparée selon le protocole présenté à l'Annexe 22. Un litre (L) de solution nutritive d'Hoagland a été utilisé pour chaque expérience de nutrition des tissus avec des boutures. La radioactivité a été ajoutée directement à la solution à raison de 200 000 000 DPM (91 μCi) d'acide mévalonique hydrolysé, de 330 000 000 DPM (150 μCi) de glucose et 275 000 000 DPM (125 μCi) d'acétate. Ceux-ci étaient marqués au ^{14}C et ont été testés dans trois systèmes distincts (une seule source de carbone par système). À chacun de ces précurseurs a aussi été ajoutée de la phénylalanine tritiée à raison de 400 000 000 DPM (182 μCi) pour le mévalonate et de 550 000 000 DPM (250 μCi) pour le glucose ainsi que l'acétate. Chaque expérience a été menée parallèlement

et selon les mêmes paramètres avec des boutures de *T. canadensis* ainsi que des boutures de *T. cuspidata*. Pour chaque montage, 15 boutures de *T. cuspidata* et 30 boutures de *T. canadensis* ont été utilisées. Les différences dans le nombre de boutures utilisées provient d'une différence de taille importante entre les boutures des deux espèces. Ainsi, pour conserver un poids équivalent de tissus pour les deux espèces, comme les boutures de *T. cuspidata* étaient 2 fois plus grosses que celles de *T. canadensis*, nous en avons utilisés deux fois moins. Des contrôles négatifs, c'est-à-dire exempts de toute radioactivité, ont également été utilisés pour chacune des deux espèces.

Les expériences de nutrition ont été réalisées à une température ambiante de 22°C, dans l'obscurité. Les expériences de nutrition des tissus sont effectuées à la noirceur totale afin d'empêcher la plante de synthétiser ses propres sources de carbone par photosynthèse et ainsi forcer l'incorporation du précurseur choisis pour la nutrition. Un humidificateur a été maintenu en fonction à raison de 8 à 10 h par jour et la solution nutritive a été soumise à une agitation mécanique constante pendant toute la durée de l'expérience soit 336 h. Étant donné les coûts importants reliés à l'usage de produits radioactifs, il a été impossible de réaliser de vrais duplicata. Il a par contre été choisis d'utiliser de faux duplicata, c'est-à-dire que les plants contenus dans un même contenant de verre ont été divisés en deux parts égales pour les extractions et les purifications subséquentes. Il a cependant été impossible d'utiliser de faux triplicata puisque les faibles quantités de tissus alors obtenues n'auraient pas permis la purification et le suivi des taxanes cibles.

5.3 Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive

Le suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive a été réalisé grâce à des échantillonnages quotidiens de 10 μ L de solution. Ceux-ci ont été effectués en triplicata pour chacune des espèces à l'étude ainsi que pour les témoins. À chacun des aliquots ont été ajoutés 2 mL de liquide à scintillation et la quantification de la radioactivité a été réalisée par comptage à l'aide d'un compteur de radioactivité pendant 20 min (2 sigma = 0,25%). Les courbes de suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive apparaissent aux figures 41 et 42.

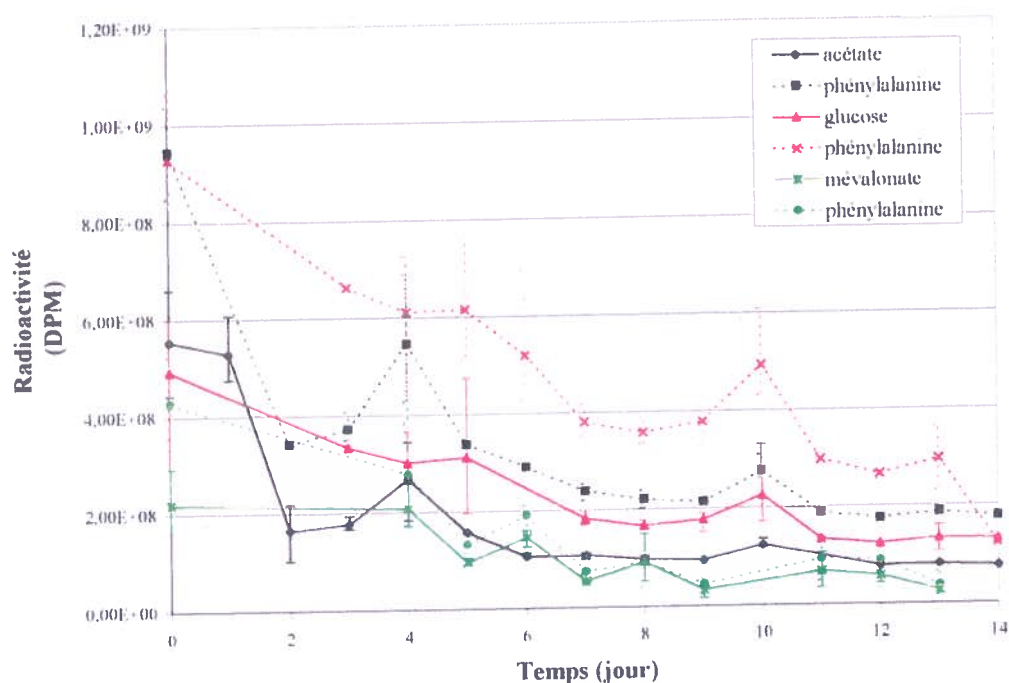


Figure 41. Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour les essais de nutrition avec des boutures de *T. canadensis*

Les figures 41 et 42 montrent des patrons similaires de diminution de la radioactivité de la solution au fil du temps et ce, pour l'ensemble des précurseurs utilisés.

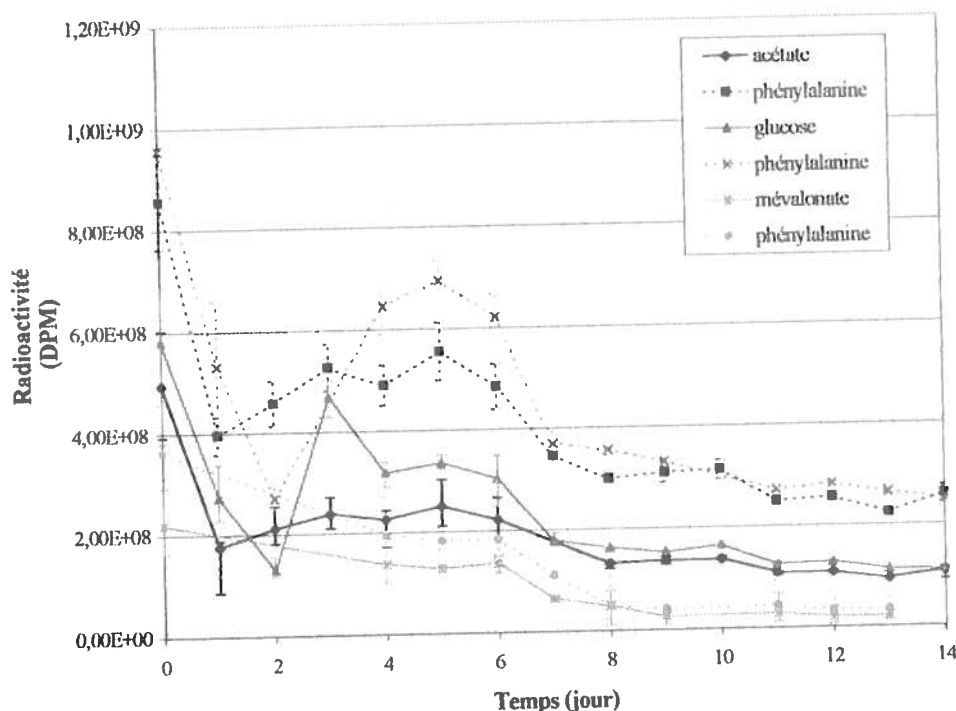


Figure 42. Suivi de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive pour les essais de nutrition avec des boutures de *T. cuspidata*

5.4 Lavage des tissus nourris

Les plants bouturés ont été recueillis puis rincés à plusieurs reprises avec de l'eau distillée afin d'éliminer toute radioactivité résiduelle attribuable au tampon de nutrition. Les rinçages ont été arrêtés lorsque la radioactivité des eaux de filtration a atteint les 40 à 50 CPM. Les plants ont été asséchés et coupés en pièces de 0,5 à 0,8 cm à l'aide de ciseaux. Celles-ci ont été déposées dans des flacons Erlenmeyer propres de 125 mL.

5.5 Extraction des taxanes d'intérêt

L'extraction des taxanes d'intérêt a été réalisée selon la même méthode que celle présentée à la section 4.6. Les solvants d'extraction ont été utilisés à raison de 8,8

ml./g de tissus. Les extraits bruts obtenus ont été évaporés sous pression réduite et conservés à -80°C jusqu'aux analyses subséquentes.

5.6 Purification des taxanes d'intérêt

Les extraits bruts des boutures de *T. canadensis* et *T. cuspidata* ont été dilués dans 500 à 800 μL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (1:1). Ils ont par la suite été purifiés par HPLC préparative selon la méthode décrite à la section 4.7. La purification de l'ensemble des taxanes d'intérêt (DAB, TXL, CEP, CDN et DHB) a également été réalisée selon cette méthode. Les figures 43 à 48 montrent les chromatogrammes obtenus pour chacun des produits purifiés.

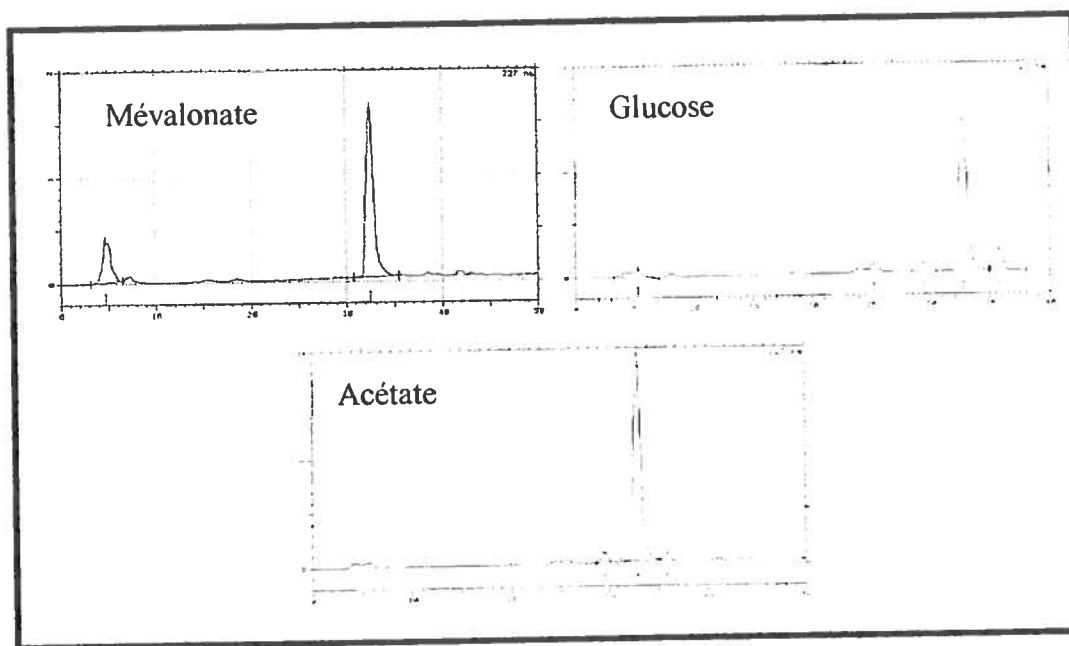


Figure 43. Taxol® purifié à partir des boutures de *T. canadensis* utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

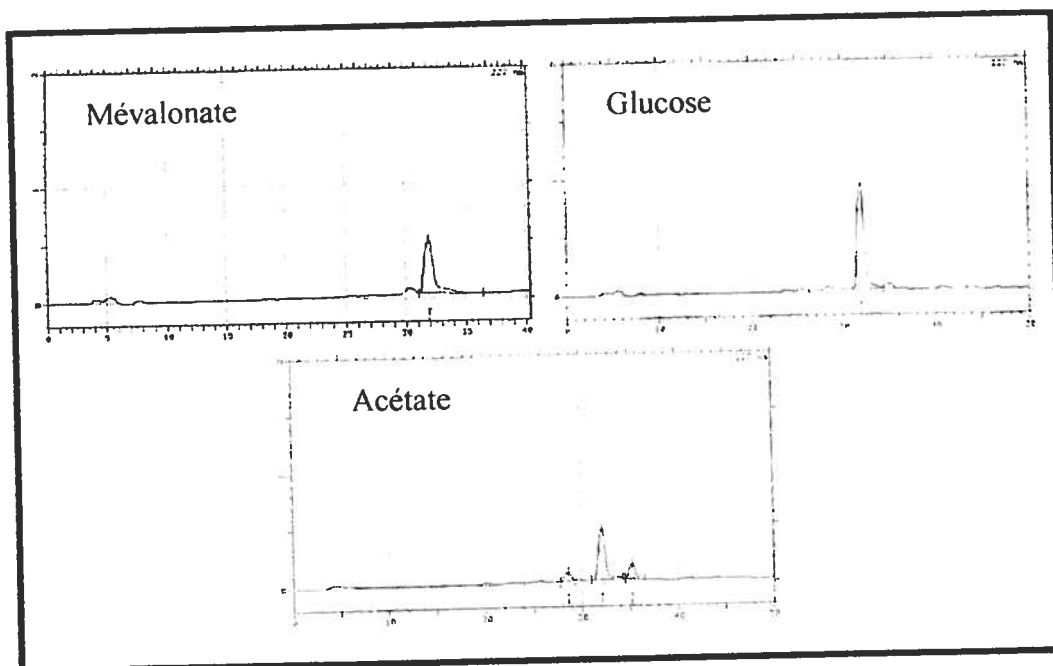


Figure 44. Céphalomannine purifiée à partir des boutures de *T. canadensis* utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

Les chromatogrammes de HPLC présentés aux figures 43 à 48 ont été inclus afin de présenter les t_R des composés purifiés et d'ainsi démontrer leur identité. Ceux-ci correspondent aux t_R des standards injectés selon les mêmes conditions et permettent donc une identification préliminaire de leur nature. Cette identification a de plus été confirmée par des analyses en FABMS de tous les composés purifiés (Annexe 23). Tout comme pour les broyats d'aiguilles, des quantités identiques de tissus ont été extraites et purifiées. Les profils correspondent également aux contrôles négatifs pour les mêmes raisons que celles expliquées à la section 4.7.1.

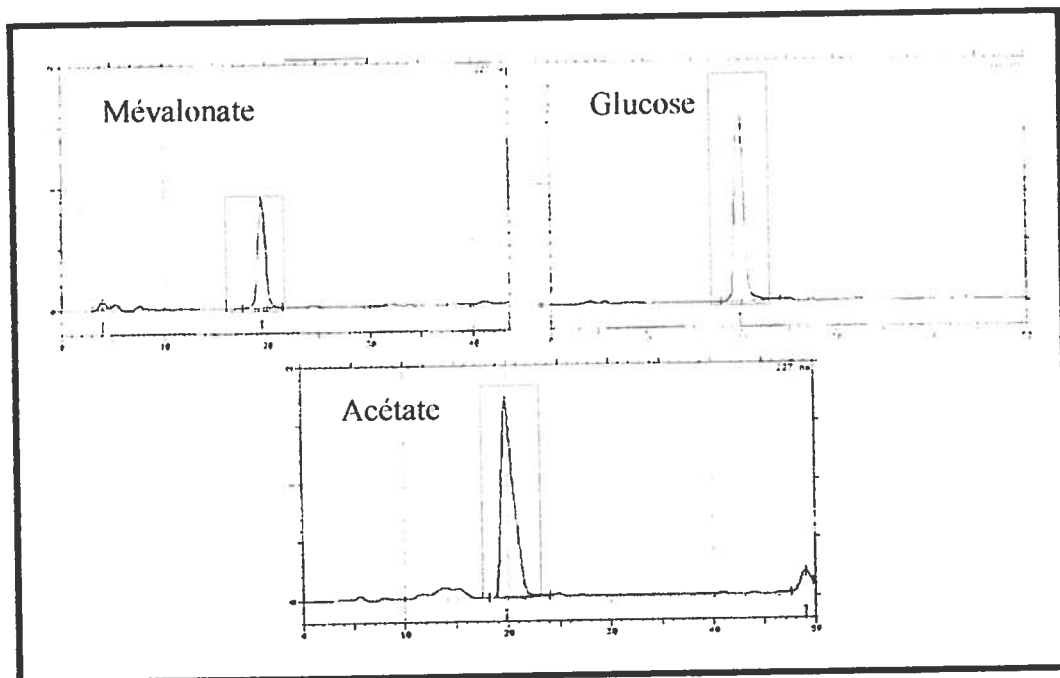


Figure 45. 10-désacétylbaccatine III purifiée à partir des boutures de *T. canadensis* utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

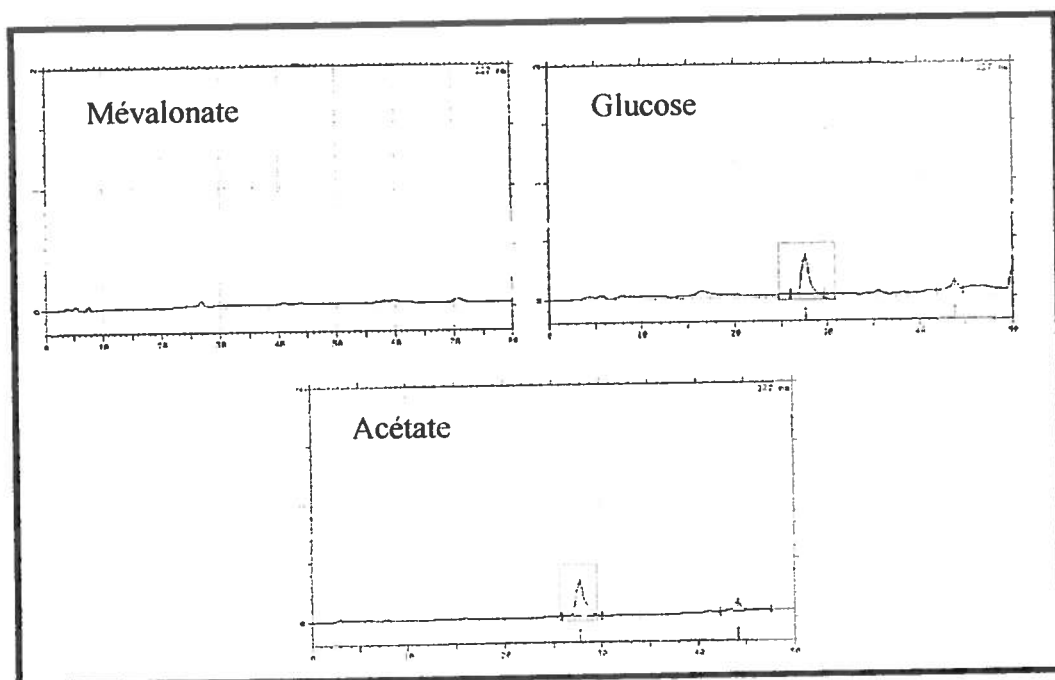


Figure 46. Canadensène purifié à partir des boutures de *T. canadensis* utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

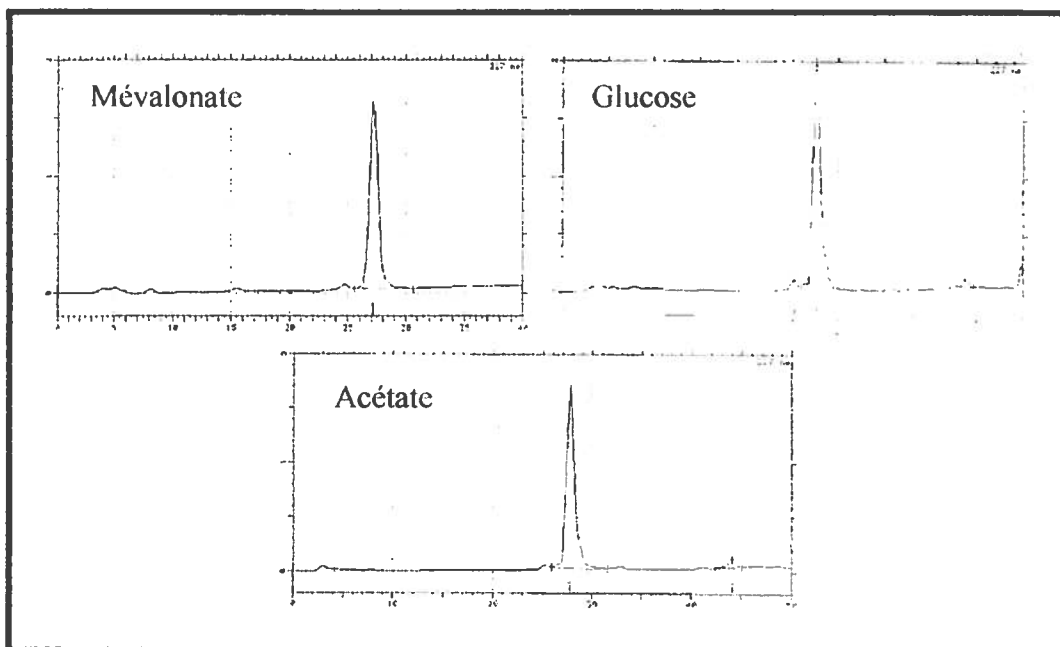


Figure 47. 9-dihydro-13-acétylbaccatine III purifiée à partir des boutures de *T. canadensis* utilisées lors des expériences de nutrition des tissus sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

La figure 48 illustre les taxanes purs obtenus des boutures de *T. cuspidata* lors de l'utilisation du mévalonate comme précurseur. Malheureusement, des problèmes techniques reliés à un mauvais fonctionnement d'un des chromatographes HPLC utilisés ont causé la perte des échantillons de glucose et d'acétate pour cette espèce. Ainsi, seuls les résultats se rapportant à l'utilisation du mévalonate apparaissent sur cette figure.

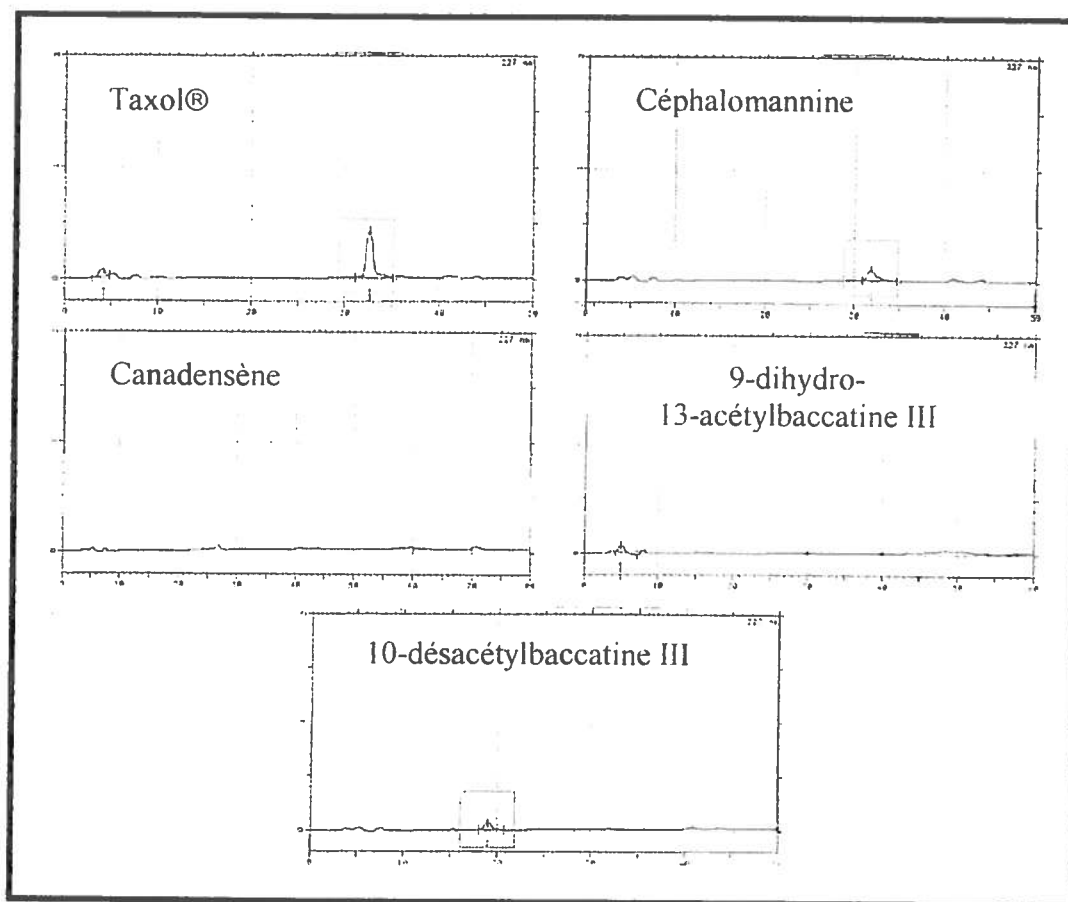


Figure 48. Taxanes cibles purifiés à partir des boutures de *T. cuspidata* utilisées lors des expériences de nutrition des tissus utilisant le mévalonate comme précurseur sur HPLC préparative (Binary LC Pump 250, Programme A-Annexe 3).

Comme cela a été mentionné précédemment, les échantillons purifiés des boutures de *T. canadensis* et *T. cuspidata* ont été analysés en SM-FAB (Anexe 23) afin de confirmer leurs structures. Les décompte de la radioactivité incorporée au sein de ces taxanes cibles a également été réalisé. Le comptage s'est fait au compteur de radioactivité pendant 20 min (2 sigma = 0,25%). À chaque échantillon ont été préalablement ajoutés 2 mL de liquide à scintillation. La figure 49 illustre les incorporations relatives obtenues pour les taxanes cibles étudiés chez *T. canadensis* uniquement. Le comptage de la radioactivité des échantillons de mévalonate (figure 48) de *T. cuspidata* n'a pas permis la détection d'une quantité significative de radioactivité par rapport au contrôle.

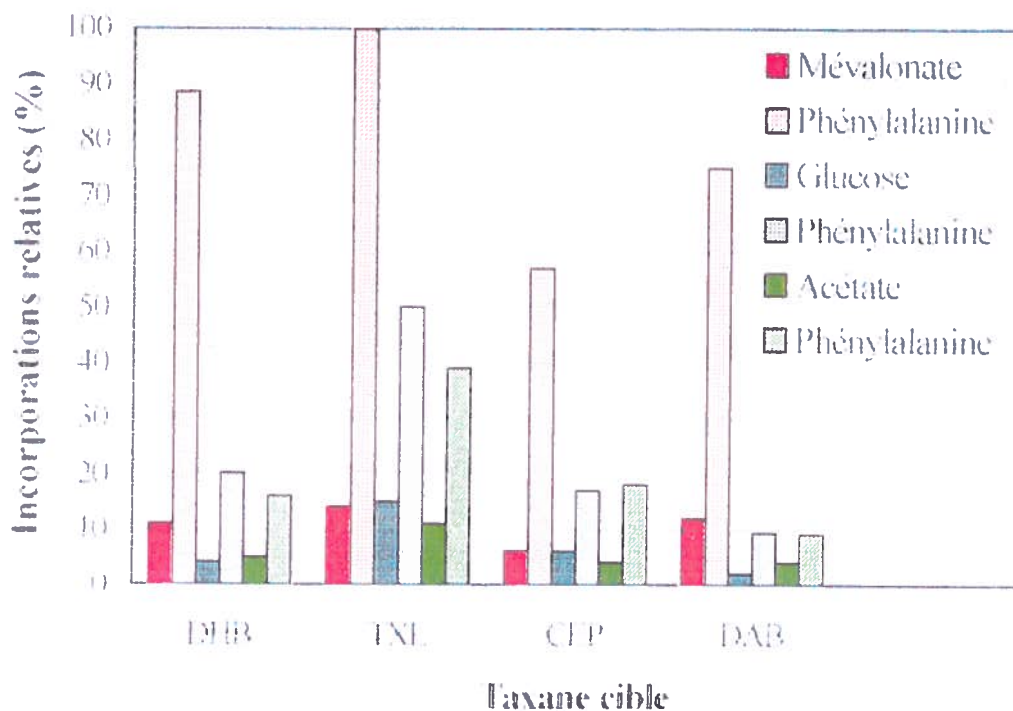


Figure 49. Incorporations relatives des taxanes cibles obtenues suite aux expériences de nutrition des tissus avec des boutures de *T. canadensis*. L'incorporation obtenue pour le Taxol® a été utilisée comme point de référence.

La figure 49 ne présente pas l'incorporation obtenue pour le canadensène. En effet, suites aux analyses en FABMS, il s'est avéré que le composé purifié par HPLC dont le temps de rétention correspondait au canadensène n'était en fait qu'une impureté éluant au même temps de rétention. L'absence de canadensène est peu surprenante étant donné les faibles concentrations de ce taxanes dans les tissus de l'if et les faibles quantités de tissus utilisées pour les expériences de nutrition avec des boutures.

DISCUSSION

1.0 Comparaison du contenu en taxanes des tissus matures de *T. canadensis* et de *T. cuspidata*

Comme cela a été mentionné dans la revue de la littérature, l'if du Canada possède un éventail de taxanes beaucoup plus diversifié que les autres espèces d'if. Plusieurs composés isolés d'aiguilles matures de *T. canadensis* par l'équipe du Dr Zamir lui sont uniques ou encore y sont présents dans des proportions très différentes de celles observées chez les autres espèces. Parmi ces composés figurent les canadensènes. Présents en faibles concentrations (environ 0,0008%) à l'intérieur des aiguilles de l'if du Canada, ces taxanes bicycliques n'ont été retrouvés chez aucune autre espèce. La 9-dihydro-13-acétylbaccatine III fait aussi de l'if du Canada un cas d'exception. En effet, ce taxane est majoritaire (5 à 7 fois plus abondant que le Taxol®) dans les aiguilles de *T. canadensis*. On le retrouve même selon des concentrations supérieures à celles de la 10-désacétylbaccatine III alors qu'il ne se retrouve qu'à l'état de traces dans une seule espèce d'if (l'if de Chine). De plus, chez ces dernières, il a été extrait de l'écorce du conifère et non de ses aiguilles.

Les canadensènes de même que la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III n'ont jamais été isolés de l'if du Japon (Annexe 1). Il est dès lors possible de noter une différence importante du contenu en taxanes de cet if par rapport à l'if du Canada. *T. cuspidata*, tout comme *T. canadensis* d'ailleurs, renferme cependant les autres taxanes majeurs communs à l'ensemble des ifs soit, la 10-désacétylbaccatine III, le Taxol® et la céphalomannine (Annexes 1 et 2).

2.0 Comparaison du contenu en taxanes des boutures de *T. canadensis* et de *T. cuspidata*

Il semble que le contenu en taxanes majeurs des deux espèces de boutures étudiées diverge de façon significative. En effet, plusieurs taxanes retrouvés en

quantités relativement élevées (entre 0,001 et 0,005%) chez l'if du Japon n'ont pu être identifiés chez l'if du Canada. Parmi ceux-ci, notons les isomères de *O*-cinnamoyltaxicine I et de 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I ainsi que ceux de 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine II et de 5-cinnamoyl-9-acétyltaxicine II. Dans les deux cas, il s'agit de deux paires de stéréoisomères géométriques *thréo*. La présence de ces quatre composés, dans les tissus **matures** d'if du Canada, n'a pas non plus été rapportée dans la littérature. De plus, il est intéressant de constater que la littérature ne fait état de la présence de ces composés que chez *Taxus baccata* exclusivement⁸⁹. Il semble donc que nos travaux nous aient permis de purifier pour la première fois, chez l'if du Japon, ces quatre composés. Or, les deux premiers isomères (*O*-cinnamoyltaxicine I et 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I) sont les taxanes qui ont été retrouvés en quantités les plus grandes à l'intérieur des boutures de *T. cuspidata* (0,005 et 0,003%, Tableau 6).

La TNM de même que la DTJ n'ont pas non plus été détectées chez les boutures de l'if du Canada (Tableau 6). Toutefois, il semble que leur présence n'a jamais été démontrée pour cette espèce d'if.

La purification des taxanes des boutures d'if du Japon a aussi conduit à l'obtention d'un composé inconnu (C11, Approche expérimentale et résultats, section 3.0). Bien que des analyses en RMN aient été tentées, il a été impossible d'identifier ce produit. En effet, les faibles quantités disponibles de composé n'ont pas permis l'obtention d'un signal non équivoque de telle sorte que la nature de cette molécule demeure inconnue. Il s'avérera donc nécessaire, dans un avenir prochain, que le groupe du Dr. Zamir purifie à nouveau ce produit afin de pouvoir déterminer sa structure.

Plusieurs taxanes obtenus à partir des boutures de l'if du Canada n'ont également pu être isolés des boutures de l'if du Japon. Il s'agit du Canadensène, de la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III, de la taxinine E ainsi que du 10-désacétyltaxol. Comme cela a été mentionné à la section 1.0, l'absence de canadensène et de 9-

dihydro-13-acétylbaccatine III chez *T. cuspidata* correspond parfaitement aux données rapportées dans la littérature (Annexe 1). Par contre, la TNE de même que le DTX ont déjà été isolés des tissus matures de cette espèce⁸⁹.

L'analyse du contenu en taxanes des boutures d'if du Canada a aussi mené à l'obtention de trois taxanes potentiels jusqu'ici non identifiés (composés 2.2, 4.4 et 5.2, Approche expérimentale et résultats, section 2.0). Le composé 2.2 devra être purifié davantage. Deux signaux aldéhydes ont pu être observés selon un ratio 70:30, ce qui laisse croire que deux produits différents puissent être présents. Il semblerait que des groupements OAc soient présents aux carbones 9 et 10, un groupement hydroxyle au carbone 2 ainsi qu'une ouverture au carbone 20. Toutefois, la présence de plusieurs impuretés n'a pas permis d'approfondir cette analyse en RMN.

L'analyse du produit 4.4 a pour sa part révélé la présence de deux composés très similaires présent selon des proportions 70:30. Le spectre HSQC s'est avéré très peu révélateur. Il semblerait qu'il y ait corrélation des groupements méthyle et qu'il y ait présence d'un oléfine. Il pourrait y avoir un benzoyle et peut-être également un cycle oxétane au carbone 20. Ce produit semble donc posséder une structure particulièrement intéressante. Cependant, sa faible abondance n'a pas permis de déterminer sa structure avec certitude. Le groupe devra donc répéter les procédures de purification afin d'obtenir une quantité plus appréciable de produit, ce qui permettra la poursuite des analyses en RMN.

En ce qui a trait au composé 5.2, il semble avoir une structure analogue à celle du Taxol® mais tout de même très inhabituelle. Il renferme un proton oléfinique, deux groupements méthyle couplés à un carbonyle, trois groupements méthyle sur les carbones quaternaires ainsi que plusieurs groupements CH₂. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer avec certitude la structure de ce taxane inconnu. En effet, l'ambiguïté de certains signaux ne permet pas de déterminer avec assurance s'ils sont issus du composé lui-même ou des impuretés contenues dans

l'échantillon. Le groupe devra donc éventuellement approfondir la purification de ce produit afin d'éliminer les impuretés et compléter les analyses en RMN.

À la lumière de ces résultats et comme le montre le tableau 6, nous pouvons conclure que le contenu en taxanes majeurs des boutures de l'if du Canada diffère de celui des boutures de l'if du Japon.

3.0 Contenu en taxanes des boutures en comparaison aux tissus matures

Les proportions en chacun des taxanes purifiés à partir des boutures des deux espèces diverge également de celles retrouvée au sein des tissus matures. En effet, au niveau des tissus matures de *T. canadensis*, les taxanes majoritaires sont, en ordre d'importance, la DHB (0,05%), la DAB (0,02%), la TNN (0,028%) ainsi que la TNE (0,023%)^{10,155,156}. Le TXL, la CEP et le CDN sont pour leur part des taxanes minoritaires (respectivement, 0,003%, 0,005% et 0,0008%)^{10,152,153,155,156}. Tout d'abord, il est important de noter que les quantités de taxanes purifiés des boutures de *T. canadensis* sont beaucoup plus petites que celles rapportées dans la littérature pour les tissus matures. De plus, la DAB (0,009%) se retrouve en quantités supérieures à la DHB (0,008%) à l'intérieur des boutures (tableau 6). Ces deux composés sont nettement majoritaires par rapport aux autres taxanes extraits des boutures. Il est également intéressant de noter les fortes concentrations en TNN (0,006%) et TNE (0,002%) au sein des boutures de *T. canadensis* par rapport aux autres taxanes (tableau 6), ce qui correspond parfaitement aux analyses des tissus matures^{155,156}. Le TXL a quant à lui été retrouvé à des concentrations légèrement supérieures (0,005%) à celles obtenues avec les tissus matures (0,003%)^{155,156}.

Les résultats obtenus quant à l'abondance des taxanes chez les boutures de *T. cuspidata* sont également différents de ce qui a été rapporté dans la littérature par rapport aux tissus matures. En effet, selon Van Rozendaal et ses

collaborateurs¹³⁶, la DAB (0,012%) est le taxane majoritaire présent dans les tissus adultes de l'if du Japon suivie par le TXL (0,010%) et la CEP (0,004%). Or, le tableau 6 montre clairement que ces trois taxanes sont présents en quantités beaucoup plus petites dans les boutures (DAB = 0,001%, TXL = 0,0002%, CEP = 0,0005%). En fait, non seulement la CEP est-elle présente en quantités supérieures au TXL dans les boutures de *T. cuspidata* mais les taxanes majeurs que nous y avons retrouvés n'ont jamais, toujours selon la littérature, été isolés jusqu'à maintenant chez cette espèce (O-cinnamoyltaxicine I = 0,005% et 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I = 0,003%). La taxinine qui constitue habituellement 0,088% des aiguilles matures de *T. cuspidata*⁵ se retrouve en quantités très inférieures dans les boutures (0,003%) tout comme la taxinine M (0,003%) d'ailleurs. Il apparaît donc évident que les proportions en taxanes majeurs présents dans les boutures d'if ne correspondent pas à celles des tissus matures et ce, pour les deux espèces étudiées.

Ces divergences dans la nature de même que dans les proportions en taxanes entre les deux espèces de boutures laissent présager l'existence de voies de biosynthèse différentes d'une espèce d'if à l'autre. La présence de certains taxanes particuliers comme le canadensène, retrouvé chez l'if du Canada uniquement¹⁵¹, tendent à confirmer cette théorie. De plus, l'obtention de O-cinnamoyltaxicine I, de 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I, de 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine II et de 5-cinnamoyl-9-acétyltaxicine II dans les jeunes plants de *T. cuspidata* exclusivement, suggère une spécification des voies de biosynthèse des taxanes selon l'âge ou encore selon la nature des tissus analysés. En effet, l'emploi de boutures d'if a engendré l'utilisation des racines du conifère, une partie jusqu'alors inexploitée dans l'étude du profil de taxanes chez l'if du Japon et l'if du Canada.

L'existence de profils de biosynthèse distincts pourrait expliquer la controverse actuelle entourant l'identité du précurseur réel des taxanes chez les ifs. Ainsi, selon l'espèce, l'âge, la nature des tissus ciblés ou même selon les conditions

environnementales prévalant à une période déterminée de l'année, une voie en particulier pourrait être favorisée plutôt qu'une autre. Les précurseurs propres à chacune de ces voies pourraient dès lors être utilisés en alternance ou de façon préférentielle les uns par rapport aux autres. Cela expliquerait la présence d'évidences, dans la littérature, quant à l'utilisation du glucose (Rohmer) et du mévalonate (Zamir) comme précurseurs de la voie. Ainsi, l'utilisation de conditions de cultures ou de tissus différents lors des expériences de nutrition pourraient expliquer l'utilisation de la voie via le glucose dans les travaux de Rhomer et celle via le mévalonate dans les travaux de Zamir. Cette hypothèse doit cependant être vérifiée avec rigueur puisqu'elle implique l'influence de nombreux facteurs parfois difficiles à testés.

4.0 Expériences de nutrition des tissus

4.1 Avec les broyats d'aiguilles de *T. canadensis*

Les essais réalisés avec des broyats d'aiguilles de *T. canadensis* ne permettent pas de noter une diminution significative de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive tout au long de l'incorporation (figures 26 et 27). Il n'est pas possible de discuter l'incorporation à partir des valeurs obtenues lors de ce suivi. Cela a été fait pour observer d'éventuelles différences au niveau de la baisse de la radiocativité de la solution lors de l'utilisation de tissus broyés et de plants bouturés. La masse de radioactivité alimentée, par rapport au faible taux d'incorporation observés chez les végétaux pourrait expliquer ce phénomène. En effet, des incorporations de l'ordre de 0,01 à 0,12% obtenus chez les végétaux ne permettent pas de noter un baisse drastique de la radioactivité de la solution. Toutefois, étant donné la complexité des phénomènes d'absorption, de transports extracellulaires et intracellulaires de même que des voies de biosynthèse impliqués, il devient très spéculatif de discuter les figures 26 et 27. Ainsi, comme nos connaissances des processus biosynthétiques et des échanges avec le milieu

sont très limitées, nous nous abstiendrons de tenter une interprétation de ces deux figures.

Les figures 38 et 39, indiquent que les deux sources de carbones (glucose et mévalonate) seraient utilisées par l'if du Canada pour la biosynthèse des taxanes et ce, peu importe les conditions expérimentales utilisées. Elles indiquent aussi l'obtention d'incorporations beaucoup plus importantes lors de l'utilisation du mévalonate. Il est donc justifié de croire que chez *T. canadensis*, le mévalonate serait utilisé de façon préférentielle. Il aurait été justifié de s'attendre à l'obtention d'incorporations équivalentes à celles obtenues avec le mévalonate seul lors de l'utilisation combinée du glucose et du mévalonate. Or, les valeurs obtenues sont légèrement inférieures. Toutefois, il est difficile d'interpréter cette différence d'incorporation puisque'elle n'est pas assez grande pour être significative.

4.2 Avec les boutures de *T. canadensis* et de *T. cuspidata*

Les figures 41 et 42 illustrent la baisse de la radioactivité résiduelle de la solution nutritive tout au long des expériences de nutrition. Contrairement aux expériences avec des broyats d'aiguilles, il est possible de noter une baisse significative des comptes au sein de la solution et ce, pour tous les précurseurs testés. Toutefois, cette baisse drastique de radioactivité doit être évaluée avec réserve. En effet, pour les raisons mentionnées à la section 4.1, ces figures sont difficilement interprétables. De plus, le mévalonate utilisé lors des expériences de nutrition des tissus avec des boutures constitue, en réalité, un mélange de deux isomères présents en proportions égales. Or, un seul de ces isomère est susceptible d'être utilisé par les plants pour la synthèse de taxanes. Ainsi, dans les meilleures conditions possibles, seule la moitié de la radioactivité présente dans le milieu pourrait être utilisée. La figure 41 montre pourtant très clairement que la baisse de radioactivité est de beaucoup supérieure à cette valeur.

Lors des expériences de nutrition des tissus avec des boutures d'if du Canada, des incorporations ont été obtenues pour les quatre sources de carbone utilisées soit, le mévalonate, l'acétate, le glucose et la phénylalanine (figure 49). Les taux d'incorporation obtenus avec la phénylalanine sont très supérieurs à ceux issus de l'utilisation des trois autres sources de carbone. On pourrait avoir tendance à expliquer ces résultats par le fait que la phénylalanine est une molécule simple, commune et facilement assimilable par les cellules. Il en est toutefois de même avec le glucose et l'acétate. Il aurait donc été légitime de s'attendre à ce que ceux-ci soient incorporés aussi facilement, ce qui n'est pas le cas. Cette hypothèse établissant un lien direct entre l'incorporation d'un composé et sa structure est cependant beaucoup trop simpliste. En effet, de nombreux facteurs tels que la polarité de la molécule ou encore les interactions avec les membranes et les parois cellulaires sont à considérer. La figure 49 démontre donc que le cas de la phénylalanine est beaucoup plus complexe que celui des trois autres précurseurs. Quant à l'acétate et au glucose, leur faible disponibilité à être incorporés dans les voies biosynthétiques des taxanes est explicable par leur implication dans une multitude de voies biochimiques autres.

Il ressort de ces expériences de nutrition chez les boutures que cette nouvelle méthode permet l'obtention d'incorporations. Toutefois, les faibles différences d'incorporations obtenues pour le mévalonate, le glucose et l'acétate ne permettent pas de conclure que l'un des précurseur soit plus utilisé qu'un autre. Pour ce faire, cette nouvelle technique utilisant des boutures devra être optimisée. L'obtention de taux d'incorporation plus élevés pourra alors permettre d'obtenir des écarts significatifs en ce qui a trait aux différences d'incorporation entre les précurseurs utilisés. La théorie selon laquelle plusieurs précurseurs pourraient être utilisés demeure donc très plausible.

En effet, comme il a été suggéré dans la littérature⁹, le mévalonate pourrait être utilisé de façon préférentielle chez l'if du Canada. Des expériences de nutrition ont donc été menées, en parallèle, sur des boutures d'if du Japon afin de vérifier

cette hypothèse. Malheureusement, à causes de problèmes techniques majeurs, les données relatives à l'incorporation du glucose et de l'acétate n'ont pu être obtenues. Par contre, les analyses pour le mévalonate ont pu être effectuées sans problème. Or, aucune incorporation de mévalonate n'a pu être décelée au sein des taxanes cibles de *T. cuspidata*. Il pourrait donc être possible que ce précurseur ne soit pas ou qu'il soit peu utilisé chez cette espèce. Il est tout de même prématuré de tirer des conclusions de ces résultats puisque la phénylalanine n'a également pas pu être incorporée dans les tissus. Il faudra répéter cette expérience pour pouvoir observer les patrons d'incorporation obtenus avec le glucose et l'acétate. Seule une comparaison des taux d'incorporation des trois sources de carbone pourra permettre de déterminer si l'if du Canada est bel et bien un cas d'exception. Suite à ces analyses, il sera possible de savoir si cette espèce privilégie réellement l'utilisation du mévalonate, au lieu des sources de carbones facilement assimilables comme le glucose et l'acétate, pour la synthèse de ses taxanes.

Les valeurs d'incorporation obtenues avec le mévalonate doivent aussi être analysées avec discernement. En effet, une surnutrition des tissus avec un substrat comme le mévalonate ne représente pas des conditions physiologiques normales pour la plante. Or, il a été rapporté dans la littérature que la présence de concentrations anormalement élevées de mévalonate puisse mener à une activation de la voie biosynthétique¹⁰⁰. La contribution de ce précurseur dans la biosynthèse des taxanes pourrait dès lors être grandement surestimée.

Les faibles incorporations obtenues lors de l'utilisation du glucose pourraient quant à elles être justifiées par une compartimentation particulière des voies de biosynthèse au sein des cellules végétales. En effet, la voie via le mévalonate se déroule dans le cytoplasme de la cellule tandis que la voie via le glucose prendrait plutôt place au niveau des chloroplastes ou autres organites apparentés^{69,100}. Un précurseur aussi simple et accessible que le glucose, pourrait facilement traverser la barrière cytoplasmique et, être utilisé directement au niveau du cytoplasme

avant même de pouvoir parvenir au lieu de biosynthèse des taxanes. La disponibilité de cette source de carbone serait dès lors grandement diminuée, comme cela a été mentionné précédemment.

Les incorporations obtenues via cette nouvelle méthode de nutrition des tissus font de celle-ci une avenue prometteuse qu'il apparaît important d'explorer plus en détail. En effet, bien que ce type d'essai ait été réalisé pour la première fois, les données obtenues sont similaires à celles associées à la méthode exploitant des broyats de tissus. Ainsi, une optimisation des paramètres de cette technique innovatrice pourrait éventuellement conduire à l'obtention de taux d'incorporation supérieurs à ceux obtenus jusqu'à maintenant via les méthodes classiques. L'utilisation de boutures plutôt que de tissus broyés a l'avantage de diminuer les stress imposés aux tissus lors des expérimentations. Toutefois, elle ne constitue pas une méthode parfaite puisque l'agitation de la solution peut engendrer un stress sur les racines en les cisillant. La limitation en oxygène, bien que nous tentions de la limiter au maximum par l'agitation de la solution peut aussi affecter le comportement de la plante. Par contre, cette technique permet de mieux reproduire les conditions naturelles entourant la production des taxanes dans les tissus de l'if. De plus, elle mise sur l'incorporation de la source de carbone via les racines, des organes naturellement voués à l'absorption et au stockage de composés divers.

Il est cependant difficile de tirer des conclusions de ces expériences de nutrition des tissus. En effet, la perte des données relatives à l'utilisation de boutures de *T. cuspidata* s'avère très décevante puisqu'elle aurait permis de comparer et de mieux comprendre les différences au niveau des processus biosynthétiques entre les deux espèces. Il sera également essentiel de répéter ces expériences, autant chez *T. cuspidata* que chez *T. canadensis*, pour permettre une optimisation des paramètres expérimentaux.

CONCLUSION

La biosynthèse des taxanes chez les ifs est un processus extrêmement complexe impliquant une multitude de facteurs. Ainsi, selon l'espèce, l'âge, les tissus utilisés et même selon les facteurs environnementaux, l'éventail de taxanes présents de même que leur abondance relative au sein de la plante peuvent varier énormément. L'analyse de jeunes plants par comparaison au tissus matures, chez l'if du Canada et l'if du Japon, a révélé des différences importantes du contenu en taxanes. En effet, le patron de taxanes présent dans les boutures d'if du Japon s'avère être peu semblable à celui observé dans les tissus matures. De plus, il semblerait que quatre taxanes, dont la présence a déjà été rapportée au sein de d'autres espèces, aient été isolés pour la première fois de l'if du Japon.

Les abondances relatives des taxanes présents au niveau des boutures sont aussi très différentes de celles observées dans les tissus adultes et ce, autant pour l'if du Canada que pour l'if du Japon. Il est donc logique de croire, à la lumière de l'ensemble de ces résultats, qu'une divergence des voies biosynthétiques puisse exister. Celle-ci prendrait place entre les espèces mais également entre tissus jeunes et tissus adultes ainsi que selon les parties de la plante utilisées pour les analyses.

L'étude des voies biosynthétiques s'avère donc particulièrement ardue et nécessite la mise au point d'une méthode d'analyse fonctionnelle, précise et surtout reproductible. Le principal obstacle à l'existence d'une telle technique sont les faibles taux d'incorporation reliés à l'usage de cellules végétales lors des expériences de nutrition des tissus. Une nouvelle stratégie misant sur l'incorporation de la source de carbone via les racines a donc été testée. Des incorporations similaires à celles obtenues via l'utilisation des méthodes conventionnelles ont été obtenues. Cette façon de faire innovatrice s'avère donc très prometteuse puisque suite à une optimisation des paramètres de la méthode, il semble possible de pouvoir en arriver à l'obtention de taux d'incorporation très supérieurs à ceux obtenus jusqu'à maintenant.

Quant à l'implication du mévalonate dans la biosynthèse des taxanes, les résultats obtenus semblent indiquer qu'il serait utilisé tout comme le glucose et l'acétate chez

l'if du Canada. Toutefois, il serait intéressant de pouvoir comparer ces données avec celles issues d'une espèce dite « utilisant le glucose » comme l'if du Japon. Les différents problèmes survenus lors des expérimentations n'ont pas permis d'effectuer cette comparaison. Il s'avère donc essentiel, pour pouvoir tirer des conclusions fiables des résultats préliminaires obtenus jusqu'à maintenant, de répéter les expériences de nutrition avec les boutures pour obtenir les valeurs relatives aux incorporations chez *T. cuspidata*.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement tous ceux qui m'ont supporté directement ou indirectement tout au long de la réalisation de ma maîtrise. Un merci tout spécial aux membres de ma famille. À mes parents, Lise et Jacques, pour avoir fait de moi ce que je suis devenue, pour m'avoir toujours appuyée dans mes choix, parfois bon mais parfois mauvais!! Pour m'avoir inculquer ce désir d'apprendre mais surtout le dépassement de soi. Merci à mes deux petites soeurs Anne-Julie et Marie-Ève et surtout à Stéphanie, mon aînée, mon modèle. Merci Steph d'avoir enduré mon impatience et mon humeur insupportable, dans ce petit 3 ½ de la rue Cartier, pendant la période de ma vie qui fut, sans contredit, la plus difficile : la session de cours!!! Ma présence ne devait guère être d'un grand réconfort pendant ce semestre ou je ne m'endurais pas moi-même.

Merci à ma directrice de maîtrise pour avoir eu confiance en moi, à tous les membres de mon laboratoire, Anastasia, Di-An, Jian Hui. À Tracy et Sylvie sans qui je n'aurais pu finir dans les temps. À ceux qui sont maintenant partis, Patrick, Carole, Marie-Claude, Alice et Junzhang mais qui m'ont accueillis avec bienveillance à mon arrivée dans le groupe. À tous les étudiants du programme de microbiologie appliquée, pour le plaisir de party et de 5 à 7 partagés. Un immense remerciement à Marie-France, Valérie, Émilie et Cindy pour leur support continu mais SURTOUT pour avoir sans arrêt porté une oreille attentive à mes nombreux déboires de laboratoire. Et en terminant, merci Cindy, pour tant de temps d'attente et de cafés si agréablement partagés.

Milles millions de merci, car à chacun de vous je dois une partie de ce mémoire.

ANNEXE 1

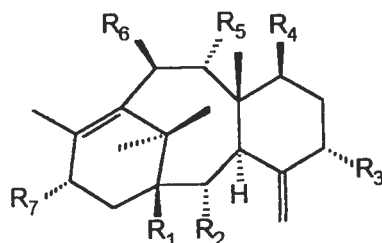
Annexe 1: taxanes de *Taxus cuspidata*

Tableau 1. Taxanes neutres avec une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Taxézopidine C	Graines et tiges ^a	R ₁ = H R ₂ = OH R ₃ = OH R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = OH R ₇ = =O
Taxézopidine D	Graines et tiges ^a	R ₁ = H R ₂ = OH R ₃ = OH R ₄ = H	R ₅ = OH R ₆ = OAc R ₇ = =O
Taxézopidine F	Graines et tiges ^a	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OH R ₄ = OAc	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = OH
Taxinine A	Feuilles ^c	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OH R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = =O
Taxinine H	Feuilles ^c	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OAc R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = =O
Taxuspinanane K	Tiges ^d	R ₁ = H R ₂ = H R ₃ = OH R ₄ = OAc	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = =O
Taxuspine F	Feuilles et tiges ^b	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OH R ₄ = OAc	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = H
Taxuspine G	Feuilles et tiges ^{b,c}	R ₁ = H R ₂ = OH	R ₅ = OAc R ₆ = OAc

		R ₃ = OH R ₄ = H	R ₇ = =O
9 α ,10 β - Désacétyltaxicine I ^c	-	R ₁ = OH R ₂ = OH R ₃ = OH R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = =O

- Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1998. *J. Nat. Prod.* **61**:474-479
- Kobayashi, J., Inubushi, A., Hosoyama, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Shigemori, H. 1995. *Tetrahedron* **51**:5971-5978
- Tong, X.-J., Fang, W.-S., Zhou, J.-Y., He, C.-H., Chen, W.-M., Fang, Q.-C. 1995. *J. Nat. Prod.* **58**:233-238
- Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1998. *Phytochem.* **48**:857-862
- Chiang, H. C., Woods, M. C., Nakadaira, Y., Nakanishi, K. 1967. *Chem. Commun.* 1201-1202

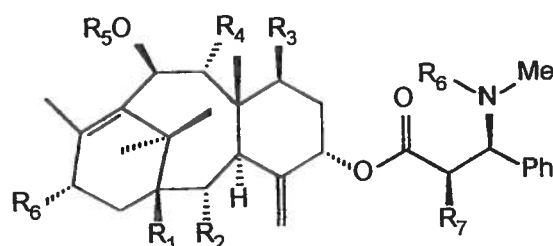


Tableau 2. Taxanes basiques avec une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
2'-Hydroxytaxine II	Feuilles ^b	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H R ₄ = OAc	R ₅ = Ac R ₆ = =O R ₇ = OH R ₈ = Me
Taxine II ^{b,c,d}	-	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H R ₄ = OAc	R ₅ = Ac R ₆ = =O R ₇ = H R ₈ = H
2'- Désacétoxyaustrospicatin ^{e,d,e,f}	-	R ₁ = H R ₂ = H R ₃ = OAc R ₄ = OAc	R ₅ = Ac R ₆ = OAc R ₇ = H R ₈ = Me
7,2'- Didésacétoxyaustrospicatin ^g	-	R ₁ = H R ₂ = H R ₃ = H R ₄ = OAc	R ₅ = Ac R ₆ = OAc R ₇ = H R ₈ = Me
Taxuspine Z	Tiges ^a	R ₁ = H R ₂ = OH R ₃ = H	R ₅ = Ac R ₆ = OAc R ₇ = H

- | | | |
|--|--------------------|-------------------|
| | $R_4 = \text{OAc}$ | $R_8 = \text{Me}$ |
|--|--------------------|-------------------|
- a. Shigemori, H., Wang, X.-X., Yoshida, N., Kobayashi, J. 1997. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**:1205-1208
 - b. Ando, M., Sakai, J., Zhang, S., Watanabe, Y., Kosugi, K., Suzuki, T., Hagiwara, H. 1997. *J. Nat. Prod.* **60**:499-501
 - c. Yoshizaki, F., Madaram, M., Takahashi, C., Hisamishi, S. 1986. *Chem. Abstracts*, 107, 130861
 - d. Kobayashi, J., Ogiwara, A., Hosoyama, H., Shigemori, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Li, Y., Iwasaki, S., Naito, M., Tsuruo, T. 1994. *Tetrahedron* **50**:7401
 - e. Konda, Y., Sasaki, T., Sun, X., Li, X., Onda, M., Takayanga, H., Harigaya, Y. 1994. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**:2621
 - f. Zhang, Y., Li, X., Wu, L. 1996. *Chem. Abstracts*, 97, 178717
 - g. Kobayashi, J., Inubushi, A., Hosoyama, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Shigemori, H. 1995. *Tetrahedron* **51**:5971-5978

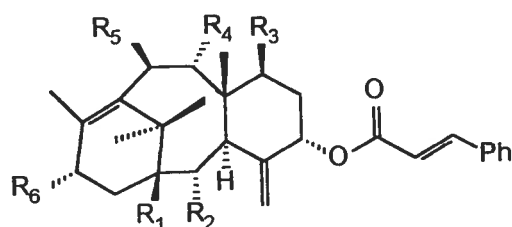


Tableau 3. 5-Cinnamoyle taxanes avec une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
10-deacetyltaxinine B	Feuilles et ramilles ^{a,b}	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OH}$ $R_6 = =\text{O}$
9 α ,10 β ,13 α -Triacétoxy-5 α -cinnamoyl-taxa-4(20),11-diène ^c	-	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
O-cinnamoyltaxicin I triacetate	Feuilles ^c	$R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = =\text{O}$
Taxinine	Feuilles ^h	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = =\text{O}$
Taxinine B	Feuilles ^d	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = =\text{O}$
Taxinine E	Feuilles ^d	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
Taxinine J	Feuilles ^e	$R_1 = \text{H}$	$R_4 = \text{OAc}$

		$R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
Taxézopidine E	Graines et tiges ^f	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{OH}$	$R_4 = \text{OH}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = =\text{O}$
Taxézopidine G	Graines et tiges ^f	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{OH}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
Taxézopidine H	Graines et tiges ^f	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OH}$
Taxuspinanane G	Tiges ^g	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$

- a. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1994. *Yaoxue Zuebao*, 29:55-60
- b. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1993. *Chin. Chem. Lett.*, 4:887-890.
- c. Chiang, H.C., Woods, M. C., Nakadaira, Y., Nakanishi, K. 1967. *Chem. Commun.*, 1201-1202
- d. Woods, M. C., Chiang, H. C., Nakadaira, Y., Nakanishi, K. 1968. *J. Am. Chem. Soc.* 90:522
- e. Liang, J., Min, Z., Niwa, M. J. 1988. *Huaxue Zuebao*, 46:1053-1054
- f. Wang, X. X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1998. *J. Nat. Prod.*, 61:474-479
- g. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1998. *Planta Med.*, 64:183-186
- h. Ando, M., Sakai, J., Zhang, S., Watanabe, Y., Kosugi, K., Suzuki, T., Hagiwara, H. 1997. *J. Nat. Prod.* 60:499-501

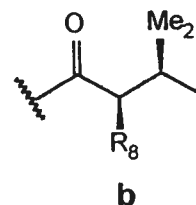
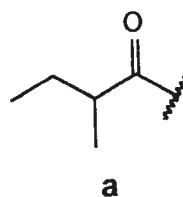
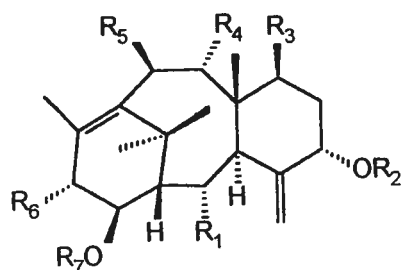


Tableau 4. Taxanes avec une double liaison C-4(20) et oxygénés en C-14

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Taxadiène ^b	-	$R_1 = \text{OAc}$ $R_2 = \text{Ac}$ $R_3 = \text{H}$ $R_4 = \text{H}$	$R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{H}$ $R_7 = \text{b}$ $R_8 = \text{CH}_3$

7 β -hydroxy- 2 α ,5 α ,10 β ,14 β - tétraacétoxytaxa- 4(20),11-diène ^a	-	R ₁ = OAc R ₂ = Ac R ₃ = OH R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = H R ₇ = Ac
2 α ,5 α ,10 β -triacétoxy- 14 β -(2- méthyl)butyryloxytaxa- 4(20),11-diène ^b	-	R ₁ = OAc R ₂ = Ac R ₃ = H R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = H R ₇ = a

- a. Fedoreyev, S. A., Vasilevskaya, N. A., Veselova, M. V., Denisenko, V.A., Dmitrenok, P. S., Ozhigova, I. T., Musaeok, T. I., Zhuravlev, Y. N. 1998. *Fitoterapia*, 69:430-432
- b. Sugiyama, T., Oritani, T., Oritani, T. 1994. *Biosci, Biotechnol. Biochem.*, 58:1923-1924

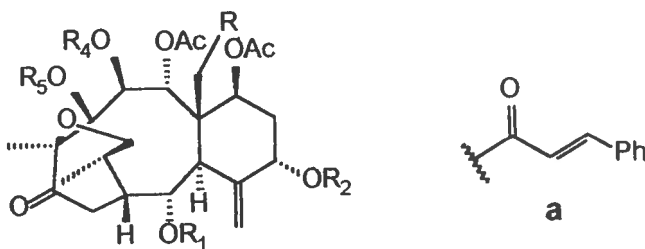


Tableau 5. Taxanes avec un pont C-12(16)-oxido et une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Taxacine ^a	Graines	R ₁ = Ac R ₂ = a R ₃ = OBz	R ₄ = Ac R ₅ = H
Taxagifine ^a	Graines	R ₁ = Ac R ₂ = a R ₃ = H	R ₄ = Ac R ₅ = H
Taxinine M ^d	-	R ₁ = Ac R ₂ = H R ₃ = OBz	R ₄ = Ac R ₅ = H
Taxezipidine L ^b	Graines	R ₁ = Ac R ₂ = a R ₃ = OAc	R ₄ = Ac R ₅ = H
Taxuspine S ^c	Tiges	R ₁ = Ac R ₂ = a R ₃ = OH	R ₄ = Ac R ₅ = H
Taxuspine T ^c	Tiges	R ₁ = Ac R ₂ = a R ₃ = OAc	R ₄ = H R ₅ = H

- a. Yoshizaki, F., Fuduka, M., Hisamishi, S., Ishida, T., In, Y. 1988. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**:2098-2102
- b. Shigemori, H., Sakurai, C. A., Hosoyama, H., Kobayashi, A., Kajiyama, S., Kobayashi, J. 1999. *Tetrahedron*, **55**:2553-2558
- c. Wang, X. X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:12159-12164
- d. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1994. *Yaoxue Zuebao*, **29**:55-60

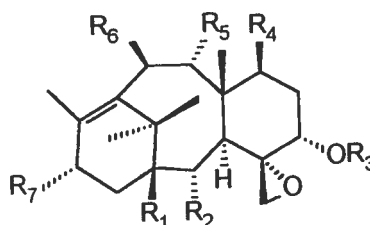


Tableau 6. Taxane avec un époxide en C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
Taxuspine V	Tiges ^a	$R_1 = \text{OH}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{H}$ $R_7 = \text{OAc}$ $R_4 = \text{OAc}$

- a. Hosoyama, H., Inubishi, A., Katasui, T., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:13145-13150

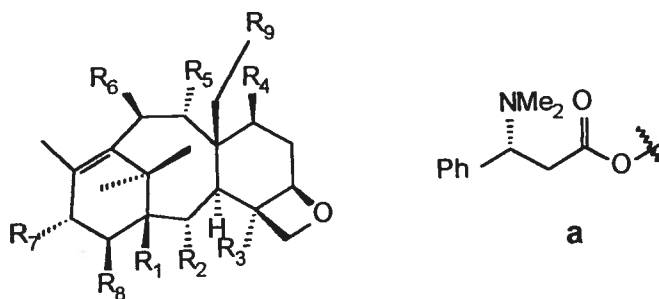


Tableau 7. Taxanes avec un cycle oxétane

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
Taxuspinanane C	Tiges ^f	$R_1 = \text{OH}$ $R_6 = \text{OH}$ $R_2 = \text{OBz}$ $R_7 = =\text{O}$ $R_3 = \text{OAc}$ $R_8 = \text{H}$ $R_4 = \text{OH}$ $R_9 = \text{H}$ $R_5 = \text{OH}$
Taxuspinanane D	Tiges ^g	$R_1 = \text{OH}$ $R_6 = \text{OAc}$

		R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₇ = =O R ₈ = H R ₉ = H
Taxuspine E	Feuilles et tiges ^b	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OAc R ₅ = OH	R ₆ = OH R ₇ = OH R ₈ = H R ₉ = H
Taxuspine N	Tiges ^c	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = OAc R ₄ = OAc R ₅ = OAc	R ₆ = OBz R ₇ = a R ₈ = H R ₉ = H
Baccatine III ^d	-	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = =O	R ₆ = OAc R ₇ = OH R ₈ = H R ₉ = H
10-Désacétylbaccatine ^{III} VVTC	-	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc	R ₆ = OH R ₇ = OH R ₈ = H
7-épi-9,10- tridésacétylbaccatine III ^f	-	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₆ = OH R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H

- a. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1998. *Planta Med.*, **64**:183-186
- b. Kobayashi, J. Inubushi, A., Hosoyama, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Shigemori, H. 1995. *Tetrahedron*, **51**:5971-5978
- c. Kobayashi, J. Hosoyama, H., Katsui, T. Yoshida, N., Shigemori, H. 1996. *Tetrahedron*, **52**:5391-5396
- d. Hoke, S. H. II, Wood, J. M., Cooks, R. G., Li, X. H., Chang, C. J. 1992. *Anal. Chem.*, **64**:2313
- e. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1994. *Yaoxue Zuebao*, **29**:55-60
- f. Morita, H., Wei, L., Gonda, A., Takeya, K., Itokawa, H. 1997. *Phytochem.*, **46**:583

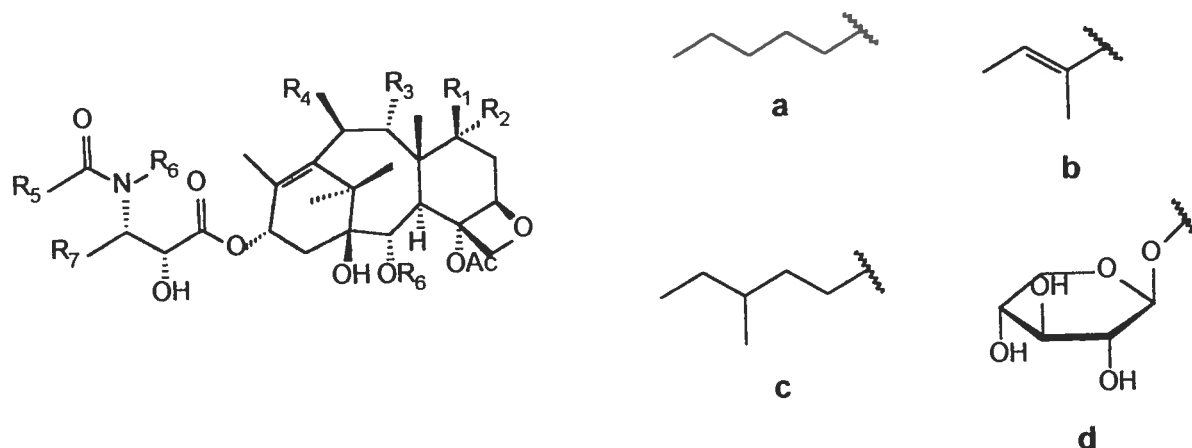


Tableau 8. Taxanes avec un cycle oxétane et une chaîne latérale de phénylisosérine en C-13.

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Paclitaxel ^{d,e,f,g,h}	-	R ₁ = OH R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OAc	R ₅ = Ph R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
Céphalomannine ^{f,g,h}	-	R ₁ = OH R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OAc	R ₅ = b R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
10-Désacétyltaxol ^h	-	R ₁ = OH R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OH	R ₅ = Ph R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
10-Désacétylcéphalomannin ^{e,h}	-	R ₁ = OH R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OH	R ₅ = b R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
10-Désacétyltaxol-7-xyloside ⁱ	-	R ₁ = d R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OH	R ₅ = Ph R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
Taxuspinanane A	Tiges ^b	R ₁ = OH R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OAc	R ₅ = c R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
Taxuspinanane E	Tiges ^a	R ₁ = H R ₂ = OH R ₃ = =O R ₄ = OH	R ₅ = a R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
Taxuspinanane I	Tiges ^c	R ₁ = OH	R ₅ = Ph

		R ₂ = H	R ₆ = Me
		R ₃ = =O	R ₇ = Ph
		R ₄ = OAc	R ₈ = Bz

- a. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1998. *Planta Med.*, **64**:183-186
- b. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1997. *J. Nat. Prod.*, **60**:390-392
- c. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1998. *Phytochem.*, **48**:857-862
- d. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. 1971. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**:2325
- e. Kikuchi, Y., Kawamura, F., Ohira, T., Yatagi, M. 1997. *Chem. Abstract*, **128**:14281
- f. Hoke, S. H. II, Wood, J. M., Cooks, R. G., Li, X. H., Chang, C. J. 1992. *Anal. Chem.*, **64**:2313
- g. Zobel, A. M., Furmanowa, M., Glowniak, K., Cragg, C. 1996. *Phytomedicine*, **3**:287
- h. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1994. *Yaoxue Zuebao*, **29**:55-60
- i. Chattopadhyay, S. K., Saha, G. C., Kulshrestha, M., Sharma, R. P., Kumar, S. 1996. *Ind. J. Chem.*, **35B**:175

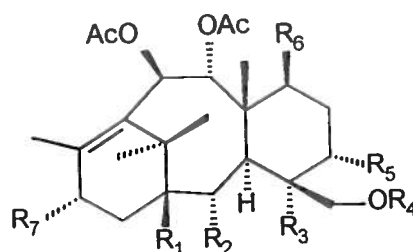


Tableau 9. Taxanes avec un cycle oxétane ouvert

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Taxuspine L	Tiges ^a	R ₁ = H	R ₅ = OAc
		R ₂ = OAc	R ₆ = OAc
		R ₃ = H	R ₇ = OAc
		R ₄ = H	
Taxuspine R	Tiges ^b	R ₁ = OH	R ₅ = OAc
		R ₂ = OH	R ₆ = OAc
		R ₃ = H	R ₇ = OAc
		R ₄ = Ac	

- a. Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:2337-2342
- b. Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:12159-12164

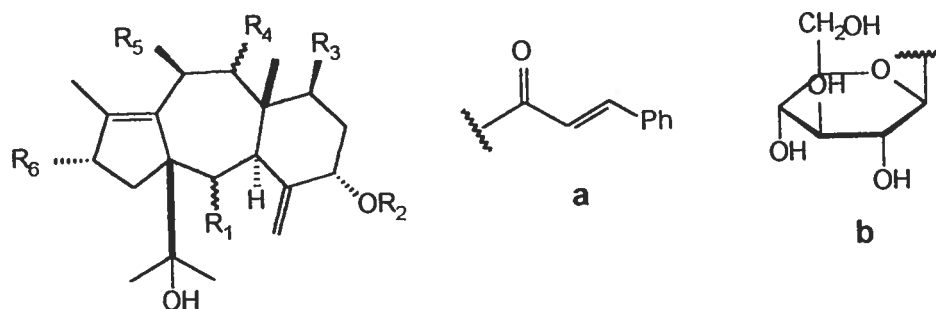


Tableau 10. 11(15→1)-abeo-taxanes avec double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
5α-O-(β-D-glucopyranosyl)-10β-benzoyltaxacustone	Feuilles et tiges ^a	R ₁ = β-OAc R ₂ = b R ₃ = H	R ₄ = β-OAc R ₅ = Obz R ₆ = =O
Taxacustone	Feuilles et tiges ^a	R ₁ = β-OAc R ₂ = H R ₃ = H	R ₄ = β-OAc R ₅ = OH R ₆ = =O
Taxuspinanane B	Tiges ^d	R ₁ = α-OAc R ₂ = H R ₃ = OAc	R ₄ = α-OAc R ₅ = Obz R ₆ = =O
Taxuspine A	Tiges ^g	R ₁ = H R ₂ = a R ₃ = OAc	R ₄ = α-OAc R ₅ = Obz R ₆ = OAc
Taxuspine J	Feuilles et tiges ^f	R ₁ = H R ₂ = a R ₃ = OAc	R ₄ = α-OAc R ₅ = OAc R ₆ = OAc
Taxuspine M	Tiges ^e	R ₁ = H R ₂ = a R ₃ = OAc	R ₄ = α-OAc R ₅ = OH R ₆ = OAc
Taxuspine O	Tiges ^b	R ₁ = α-OAc R ₂ = H R ₃ = OH	R ₄ = α-OAc R ₅ = OAc R ₆ = =O
Taxuspine Y	Tiges ^c	R ₁ = α-OAc R ₂ = H R ₃ = H	R ₄ = α-OAc R ₅ = Obz R ₆ = =O

- a. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1995. *J. Nat. Prod.*, **58**:233-238
- b. Kobayashi, J. Hosoyama, H., Katsui, T. Yoshida, N., Shigemori, H. 1996. *Tetrahedron*, **52**:5391-5396
- c. Shigemori, H., Wang, X.-X., Yoshida, N., Kobayashi, J. 1997. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**:1205-1208
- d. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1997. *J. Nat. Prod.*, **60**:390-392

- e. Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:2337-2342
 f. Kobayashi, J., Inubushi, A., Hosoyama, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Shigemori, H. 1995. *Tetrahedron*, **51**:5971-5978
 g. Kobayashi, J., Ogiwara, A., Hosoyama, H., Shigemori, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Li, Y., Iwasaki, S., Naito, M., Tsuruo, T. 1994. *Tetrahedron*, **50**:7401-7416

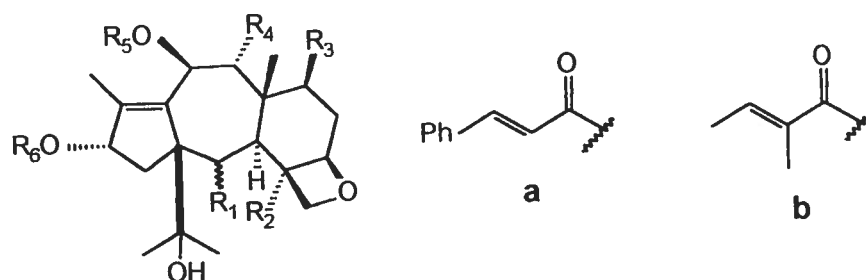


Tableau 11. 11(15→1)-*abeo*-taxanes avec double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Taxacustine	Feuilles et ramilles ^{a,b}	R ₁ = OAc R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = H R ₆ = H
Taxayuntine ^a	-	R ₁ = OAc R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = Bz R ₆ = H
Taxuspinanane F	Tiges ^c	R ₁ = OBz R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OH R ₅ = H R ₆ = H
Taxuspine Q	Tiges ^d	R ₁ = OAc R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = b R ₆ = H
Taxchinine B ^e	-	R ₁ = OAc R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = Bz R ₆ = a

- a. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1994. *Yaoxue Zuebao*, **29**:55-60
 b. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1993. *Chin. Chem. Lett.*, **4**:887-890
 c. Morita, H., Gonda, A., Wei, L., Yamamura, Y., Wakabayashi, H., Takeya, K., Itokawa, H. 1998. *Planta Med.*, **64**:183-186
 d. Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:12159-12164
 e. Bogdan, C., Ding, A. 1992. *Chem. Abstracts*, **117**:163472

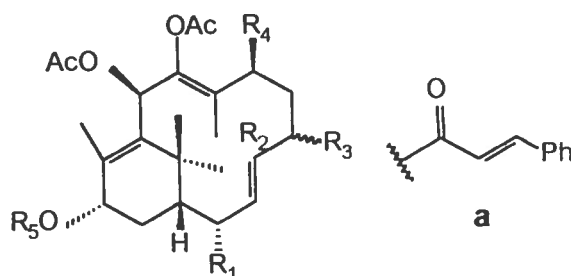


Tableau 12. Taxanes bicycliques

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
Taxuspine U	Tiges ^a	R ₁ = OH R ₄ = OH R ₂ = CH ₂ OH R ₅ = Ac R ₃ = α-OAc
Taxuspine X	Tiges ^b	R ₁ = OAc R ₄ = OAc R ₂ = CH ₂ OAc R ₅ = Ac R ₃ = α-O-a

- a. Hosoyama, H., Inubishi, A., Katasui, T., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:13145-13150
- b. Shigemori, H., Wang, X.-X., Yoshida, N., Kobayashi, J. 1997. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**:1205-1208

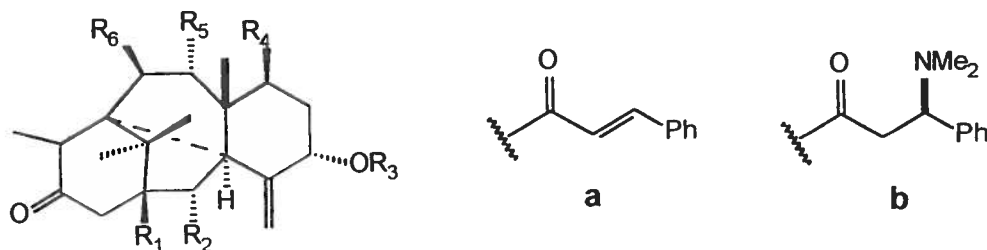


Tableau 13. Taxanes avec un pont C-3(11) et une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
Taxinine K	Feuilles ^a	R ₁ = H R ₄ = H R ₂ = OAc R ₅ = OAc R ₃ = H R ₆ = OAc
Taxinine L	Feuilles ^a	R ₁ = H R ₄ = H R ₂ = OAc R ₅ = OAc R ₃ = Ac R ₆ = OAc
Taxuspine C	Tiges ^b	R ₁ = H R ₄ = H R ₂ = OAc R ₅ = OAc R ₃ = a R ₆ = OAc
Taxuspine H	Feuilles et tiges ^c	R ₁ = H R ₄ = H

		R ₂ = OAc	R ₅ = OAc
		R ₃ = b	R ₆ = OAc

- Chiang, H. C., Woods, M. C., Nakadaira, Y., Nakanishi, , K. 1967. *Chem. Commun.*, 1201-1202
- Kobayashi, J., Ogiwara, A., Hosoyama, H., Shigemori, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Li, Y., Iwasaki, S., Naito, M., Tsuruo, T. 1994. *Tetrahedron*, **50**:7401-7416
- Kobayashi, J. Inubushi, A., Hosoyama, H., Yoshida, N., Sasaki, T., Shigemori, H. 1995. *Tetrahedron*, **51**:5971-5978

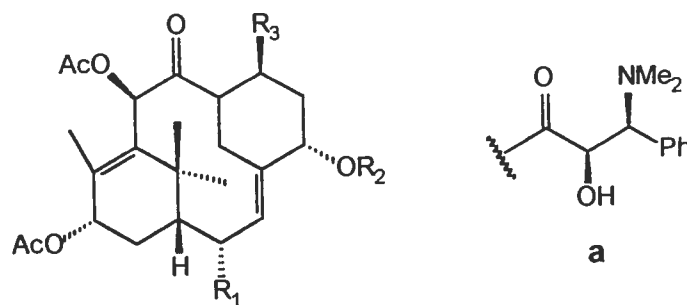
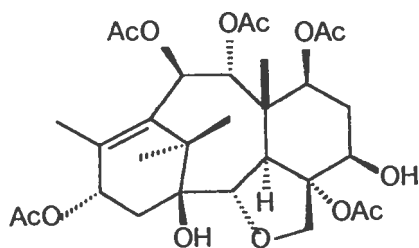


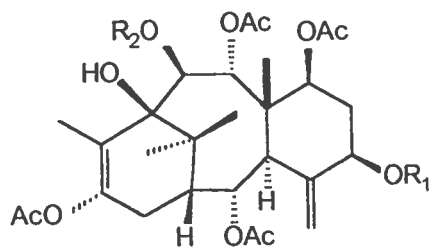
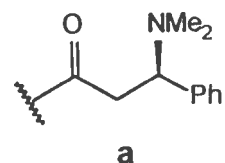
Tableau 14. 2(3→20)-abeo-taxanes

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
Taxuspine W	Tiges ^a	R ₁ = OAc R ₂ = H	R ₃ = OAc R ₄ = OH
Taxine A ^{b,c}	-	R ₁ = OAc R ₂ = a	R ₃ = OH R ₄ = OH

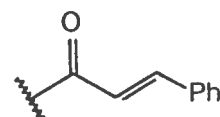
- Hosoyama, H., Inubishi, A., Katasui, T., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:13145-13150
- Graf, E. 1956. *Angewandte Chemie*, **68**:249
- Graf, E. 1958. *Chem. Abstracts*, **53**:4335



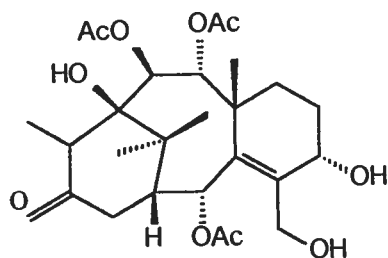
A

B $R_1 = \text{a}$, $R_2 = \text{Ac}$ C $R_1 = \text{b}$, $R_2 = \text{H}$ D $R_1 = \text{b}$, $R_2 = \text{Ac}$ 

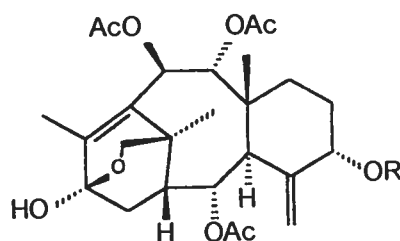
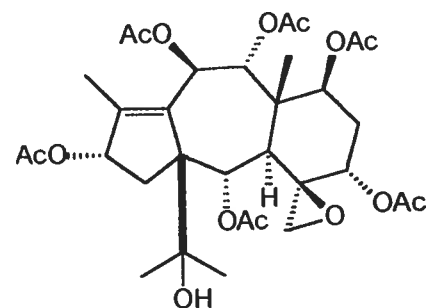
a



b



E

F $R = \text{H}$ G $R = \text{b}$ 

H

Tableau 15. Taxanes divers

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
Taxézopidine A	Feuilles ^a	F
Taxézopidine B	Feuilles ^b	E
Taxézopidine J	Feuilles et tiges ^c	G
Taxézopidine K	Tiges ^c	C
Taxuspine D	Tiges ^d	D
Taxuspine K	Tiges ^e	A
Taxuspine P	Tiges ^f	B
Taxuchine A ^g	-	H

a. Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1997. *Tetrahedron Lett.*, **38**:7587-7588b. Wang, X. X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1998. *J. Nat. Prod.*, **61**:474-479c. Shigemori, H., Sakurai, C. A., Hosoyama, H., Kobayashi, A., Kajiyama, J. 1999. *Tetrahedron*, **55**:2553-2558d. Kobayashi, J., Hosoyama, H., Shigemori, H., Koiso, Y., Iwasaki, S. 1995. *S. Experientia*, **51**:592-595e. Wang, X.-X., Shigemori, H., Kobayashi, J. 1996. *Tetrahedron*, **52**:2337-2342f. Kobayashi, J. Hosoyama, H., Katsui, T. Yoshida, N., Shigemori, H. 1996. *Tetrahedron*, **52**:5391-5396g. Tong, X.-J., Fang, W. S., Zhou, J. Y. He, C. H., Chen, W. M., Fang, Q. C. 1994. *Yaoxue Zuebao*, **29**:55-60

ANNEXE 2

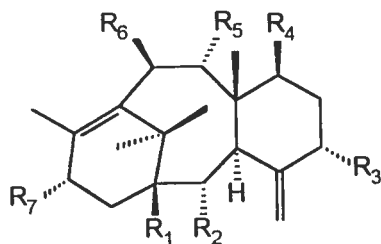
Annexe 2: taxanes de *Taxus canadensis*

Tableau 1. Taxanes neutres avec une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
2-désacétoxy-7-désacétyltaxinine J ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = H R ₃ = Cinn R ₄ = OH	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = OAc
2-désacétyl-5-decinnamoyltaxinine J ^{b,c}	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OH R ₃ = OH R ₄ = OAc	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = OAc
5-décinnamoyltaxinine E ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = OAc
Taxinine A ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OH R ₄ = H	R ₅ = OAc R ₆ = OAc R ₇ = =O

a. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *Tetrahedron*. **55**:14323-14340

b. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Garneau, F.-X. 1992. *Tetrahedron Lett.*, **33**:5235

c. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Zhou, Z. H., Bélair, S., Caron, G., Sauriol, F., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X., Mamer, O. 1995. *Can. J. Chem.* **73**:655

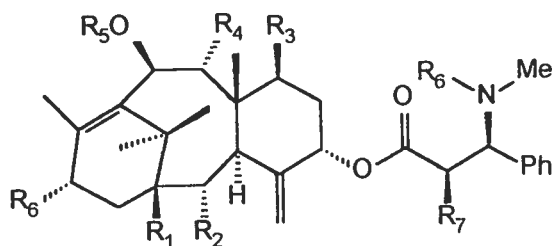


Tableau 2. Taxanes basiques avec une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
TNB ^a	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = H R ₄ = OH	R ₅ = H R ₆ = =O R ₇ = H R ₈ = Me

a. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *Tetrahedron*. **55**:14323-14340

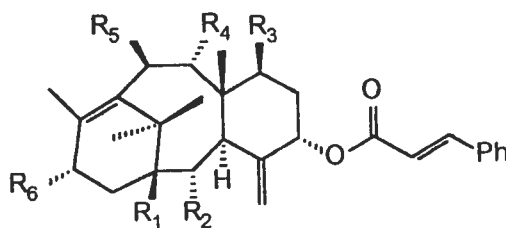


Tableau 3. 5-Cinnamoyl taxanes avec une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
DTN ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H	R ₄ = OH R ₅ = OH R ₆ = OAc
10-désacétyltaxinine E ^b	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H	R ₄ = OAc R ₅ = OH R ₆ = OAc
10-désacétyltaxinine B ^b	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = OH R ₆ = =O
7,9-désacétyltaxinine B ^b	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OH	R ₄ = OH R ₅ = OAc R ₆ = =O
TNN ^{b,c,d}	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H	R ₄ = OAc R ₅ = OAc R ₆ = =O
Taxinine B ^b	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = OAc R ₆ = =O
TNE ^b	Feuilles	R ₁ = H	R ₄ = OAc

		$R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{H}$	$R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
2,7-désacétoxytaxinine J ^b	Feuilles	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
2-désacétoxytaxinine J ^b	Feuilles	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
Taxinine J ^b	Feuilles	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{OAc}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$
TZG ^b	Feuilles	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{OH}$	$R_4 = \text{OAc}$ $R_5 = \text{OAc}$ $R_6 = \text{OAc}$

- a. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *J. Nat. Prod.* **63**:929-933
b. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *Tetrahedron*. **55**:14323-14340
c. Bourbeau, G. 1954. *Laval Med.* **19**:511 et 637.
d. Olsen, C. E., Singh, R., Gupta, S., Bisht, K. S., Malhotra, S., Jain, R.m Jain, S. C., Parmar, V. S. 1998. *Ind. J. Chem.* **37B**:828

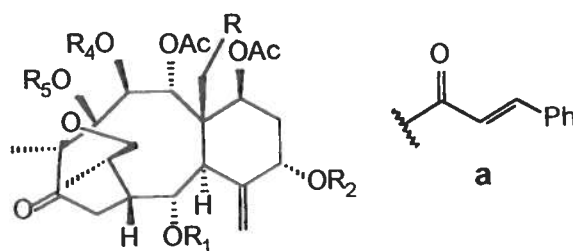


Tableau 4. Taxanes avec un pont C-12(16)-oxido et une double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
5-décinnamoyltaxagifine ^{a,b}	Feuilles	$R_1 = \text{Ac}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{Ac}$ $R_5 = \text{H}$
2-désacétyl-5-décinnamoyltaxagifine ^a	Feuilles	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{Ac}$ $R_5 = \text{H}$
Taxagifine ^c	Feuilles	$R_1 = \text{Ac}$ $R_2 = \text{a}$ $R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{Ac}$ $R_5 = \text{H}$

- a. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Garneau, F.-X. 1992. *Tetrahedron Lett.*, **33**:5235
b. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Zhou, Z. H., Bélair, S., Caron, G., Sauriol, F., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X., Mamer, O. 1995. *Can. J. Chem.* **73**:655
c. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *Phytochem.* **54**:221-230

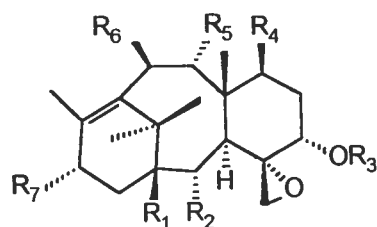


Tableau 5. Taxane avec un époxyde en C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
1 β -hydroxy-10-désacétyl-10-glycolylbaccatine I ^a	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = OAc R ₄ = OAc	R ₅ = OAc R ₆ = COCH ₂ OH R ₇ = OAc
1 β -acétoxy-5,7,10-désacétylbaccatine I ^{b,c}	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = OAc R ₄ = OH	R ₅ = OAc R ₆ = OH R ₇ = OAc
HDB ^d	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = Ac R ₄ = OH	R ₅ = OH R ₆ = OAc R ₇ = OAc

- a. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *Phytochem.* **54**:221-230
 b. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Garneau, F.-X. 1992. *Tetrahedron Lett.*, **33**:5235
 c. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Bélair, S., Sauriol, F., Mamer, O., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X.. 1992. *Tetrahedron Lett.* **33**:5173
 d. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Zhou, Z. H., Bélair, S., Caron, G., Sauriol, F., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X., Mamer, O. 1995. *Can. J. Chem.* **73**:655-665

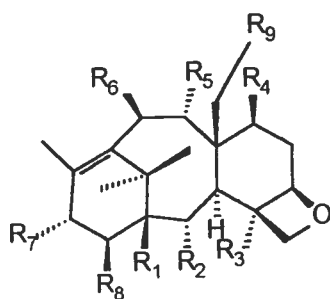


Tableau 6. Taxanes avec un cycle oxétane

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
7,9,13-tridésacétylbaccatine VI ^a	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₆ = OAc R ₇ = OH R ₈ = H R ₉ = H

10-désacétyl-10-glycolylbaccatine IV ^a	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = OAc R ₄ = OAc R ₅ = OAc	R ₆ = OCOCH ₂ OH R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
DAB ^{b,c}	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = =O	R ₆ = OH R ₇ = OH R ₈ = H R ₉ = H
7,9-désacétylbaccatine IV ^c	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OAc R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₆ = OAc R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
1-acétyl-10-désacétylbaccatine III ^b	Feuilles	R ₁ = OAc R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = =O	R ₆ = OH R ₇ = OH R ₈ = H R ₉ = H
7-épi-9,10-tridésacétylbaccatine VI ^b	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = α -OH R ₅ = OH	R ₆ = OH R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
DBVI ^d	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₆ = OAc R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
7,9,10-tridésacétylbaccatine VI ^c	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₆ = OH R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
DHB ^{b,c,e}	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OH R ₅ = OH	R ₆ = OAc R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
HAB ^c	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = OBz R ₃ = OAc R ₄ = OAc R ₅ = OAc	R ₆ = COOCH ₂ OH R ₇ = OAc R ₈ = H R ₉ = H
7-épi-10-	Feuilles	R ₁ = OH	R ₆ = OH

désacétylbaccatine III ^c	$R_2 = \text{OBz}$ $R_7 = \text{OH}$ $R_3 = \text{OAc}$ $R_8 = \text{H}$ $R_4 = \text{OH}$ $R_9 = \text{H}$ $R_5 = =\text{O}$
-------------------------------------	--

- a. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *Phytochem.* **54**:221-230
b. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Garneau, F.-X. 1992. *Tetrahedron Lett.*, **33**:5235
c. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Zhou, Z. H., Bélair, S., Caron, G., Sauriol, F., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X., Mamer, O. 1995. *Can. J. Chem.* **73**:655-665
d. Zamir, L. O., Nedeia, M. E., Bélair, S., Sauriol, F., Mamer, O., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X. 1992. *Tetrahedron Lett.* **33**:5173-5176
e. Gunawardana, G. P., Premachandran, U., Burres, N. S., Whittern, D. N., Henry, R., Spanton, S., McAlpine, J. B. 1992. *J. Nat. Prod.* **55**:1686

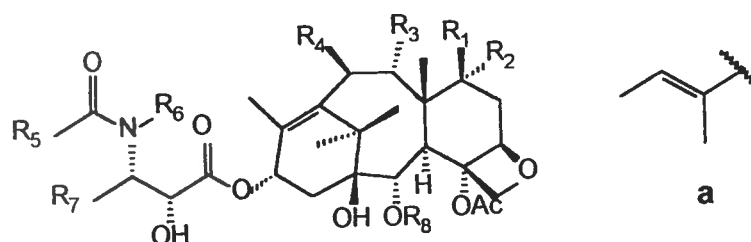


Tableau 7. Taxanes avec un cycle oxétane et une chaîne latérale de phénylisosérine en C-13.

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
2'-acétyl-épi-taxol ^a	Feuilles	$R_1 = \text{OH}$ $R_5 = \text{Ph}$ $R_2 = \text{H}$ $R_6 = \text{H}$ $R_3 = =\text{O}$ $R_7 = \text{Ph}$ $R_4 = \text{OAc}$ $R_8 = \text{Bz}$
ADT ^b	Feuilles	$R_1 = \text{OH}$ $R_5 = \text{Ph}$ $R_2 = \text{H}$ $R_6 = \text{H}$ $R_3 = =\text{O}$ $R_7 = \text{Ph}$ $R_4 = \text{OAc}$ $R_8 = \text{Bz}$
TXL ^{c,d}	Feuilles	$R_1 = \text{OH}$ $R_5 = \text{Ph}$ $R_2 = \text{H}$ $R_6 = \text{H}$ $R_3 = =\text{O}$ $R_7 = \text{Ph}$ $R_4 = \text{OAc}$ $R_8 = \text{Bz}$
CEP ^{c,d}	Feuilles	$R_1 = \text{OH}$ $R_5 = \text{a}$ $R_2 = \text{H}$ $R_6 = \text{H}$ $R_3 = =\text{O}$ $R_7 = \text{Ph}$ $R_4 = \text{OAc}$ $R_8 = \text{Bz}$
DTX ^d	Feuilles	$R_1 = \text{OH}$ $R_5 = \text{Ph}$ $R_2 = \text{H}$ $R_6 = \text{H}$ $R_3 = =\text{O}$ $R_7 = \text{Ph}$ $R_4 = \text{OH}$ $R_8 = \text{Bz}$

TXC ^c	Feuilles	R ₁ = OH R ₂ = H R ₃ = =O R ₄ = OAc	R ₅ = a R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz
ETX ^d	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OH R ₃ = =O R ₄ = OAc	R ₅ = Ph R ₆ = H R ₇ = Ph R ₈ = Bz

- a. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *J. Nat. Prod.* **63**:929-933
b. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *Phytochem.* **54**:221-230
c. Zamir, L. O., Nedea, M. E., Garneau, F.-X. 1992. *Tetrahedron Lett.*, **33**:5235
d. Zamir, L. O., Nedea, M. E., Zhou, Z. H., Bélair, S., Caron, G., Sauriol, F., Jacqmain, E., Jean, F. I., Garneau, F.-X., Mamer, O. 1995. *Can. J. Chem.* **73**:655-665
e. Zamir, L. O., Nedea, M. E., Zhou, Z.-H., Caron, G., Sauriol, F., Mamer, O. 1996. *Phytochem.* **41**(3):803-805

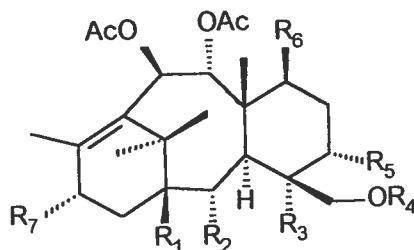
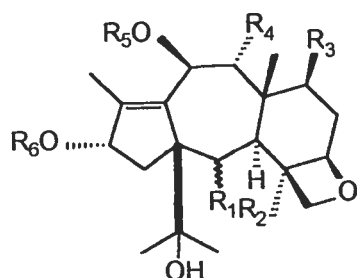


Tableau 8. Taxanes avec un cycle oxétane ouvert

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
7,9-désacétyltaxuspine L ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = H R ₄ = OH	R ₅ = OAc R ₆ = OH R ₇ = OAc

- a. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *J. Nat. Prod.* **62**:1268-1273

Tableau 9. 11(15→1)-*abeo*-taxanes avec double liaison C-4(20)

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
TAB ^a	Feuilles	R ₁ = OBz R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OH R ₅ = H R ₆ = H
2-acétyl-13-désacétyl-2-débenzoyl- <i>abeo</i> -baccatine VI ^a	Feuilles	R ₁ = OAc R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = Ac R ₆ = H
Taxacustine ^b	Feuilles	R ₁ = OAc R ₂ = OAc R ₃ = OAc	R ₄ = OAc R ₅ = H R ₆ = H

a. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *J. Nat. Prod.* **62**:1268-1273

b. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *Phytochem.* **54**:221-230

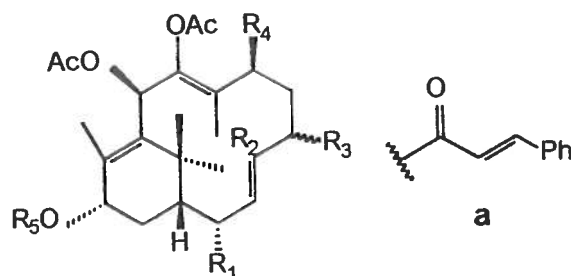


Tableau 10. Taxanes bicycliques

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
CDN ^a	Feuilles	R ₁ = OAc R ₂ = CH ₂ OH R ₃ = β-OH	R ₄ = OAc R ₅ = Ac
5-épi-canadensène ^b	Feuilles	R ₁ = OAc R ₂ = CH ₂ OH R ₃ = α-OH	R ₄ = OAc R ₅ = Ac
5-épi-cinnamoyl canadensène ^c	Feuilles	R ₁ = OAc R ₂ = CH ₂ OH R ₃ = α-Oa	R ₄ = OAc R ₅ = Ac

- a. Zamir, L. O., Zhou, Z.-H., Caron, G., Nedeia, M. E., Sauriol, F., Mamer, O. 1995. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 529-530
- b. Zamir, L. O., Zhang, J., Kutterer, K., Sauriol, F., Mamer, O., Khiat, A., Boulanger, Y. 1998. *Tetrahedron* **54**:15845-15860
- c. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *J. Nat. Prod.* **63**:929-933

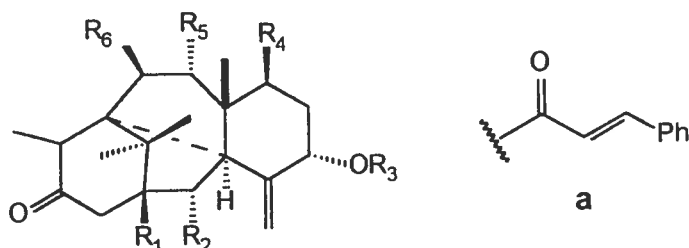
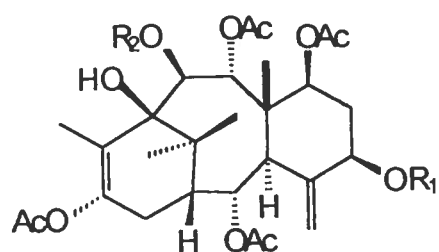


Tableau 11. Taxanes avec un pont C-3(11) et une double liaison C-4(20)

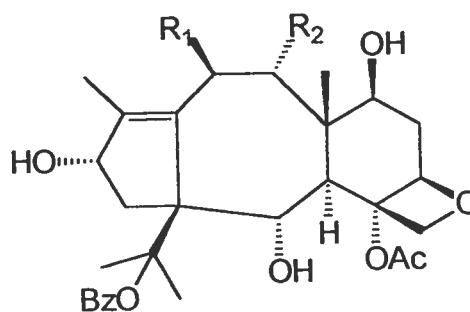
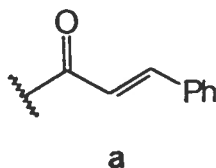
TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE	
2,9-diacétyl-5-cinnamoyl-phototaxicine II ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = a	R ₄ = H R ₅ = OAc R ₆ = OH
DCP ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = a	R ₄ = H R ₅ = OH R ₆ = OAc
2,10-diacétyl-5-cinnamoyl-7β-hydroxyphototaxicine II ^a	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = a	R ₄ = OH R ₅ = OH R ₆ = OAc
Taxuspine C ^b	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = a	R ₄ = H R ₅ = OAc R ₆ = OAc
7-acétoxytaxuspine C ^b	Feuilles	R ₁ = H R ₂ = OAc R ₃ = a	R ₄ = OAc R ₅ = OAc R ₆ = OAc

- a. Zamir, L. O., Zhang, J., Kutterer, K., Sauriol, F., Mamer, O., Khiat, A., Boulanger, Y. 1998. *Tetrahedron* **54**:15845-15860
- b. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *Tetrahedron*. **55**:14323-14340



A $R_1 = H$, $R_2 = Ac$

B $R_1 = a$, $R_2 = Ac$



C $R_1 = =O$, $R_2 = =O$

D $R_1 = OAc$, $R_2 = OH$

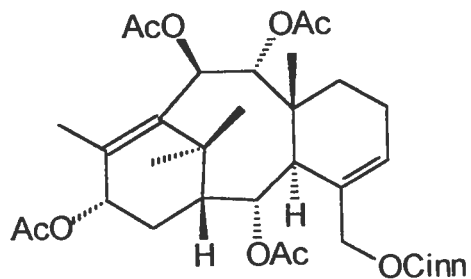
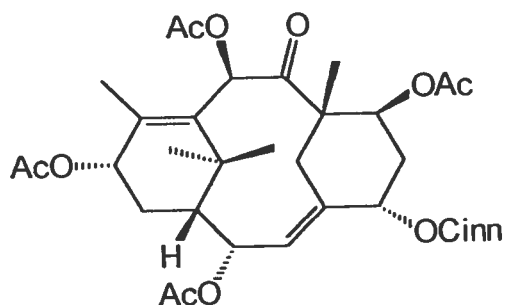
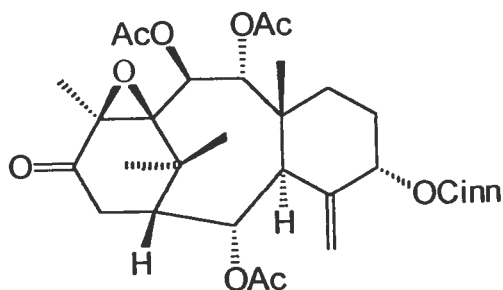


Tableau 12. Taxanes divers

TAXANES	TISSUS	FORMULE CHIMIQUE
5-décinnamoyltaxuspine D ^a	Feuilles	A
Taxuspine D ^b	Feuilles	B
15-benzoyl-10-désacétyl- 2-débenzoyl-10-déhydro- 11(15→1) <i>abeo</i> -baccatine III ^c	Feuilles	C
BDDB ^c	Feuilles	D
TNO ^b	Feuilles	E
5-cinnamoyltaxine B ^b	Feuilles	F

2,9,10,13-tétraacétoxy- 20-cinnamoyloxy-taxa- 4(5),11(12)-diène ^d	Feuilles	G
--	----------	---

- a. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *J. Nat. Prod.* **62**:1268-1273
- b. Zamir, L. O., Zhang, J., Wu, J., Sauriol, F., Mamer, O. 1999. *Tetrahedron*. **55**:14323-14340
- c. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *Phytochem.* **54**:221-230
- d. Zhang, J., Sauriol, F., Mamer, O., Zamir, L. O. 2000. *J. Nat. Prod.* **63**:929-933

ANNEXE 3

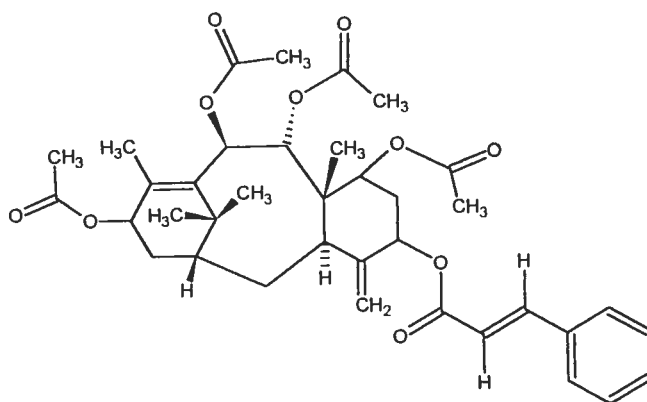
Annexe 3: Liste et description des conditions utilisées pour la chromatographie liquide à haute pression.

PROGRAMME	DESCRIPTION
A	Gradient linéaire, 25 à 100% acétonitrile en 50 minutes
B	Gradient linéaire, 25 à 100% acétonitrile en 60 minutes
C	Gradient linéaire, 25 à 100% acétonitrile en 70 minutes
D	Gradient linéaire, 25 à 100% acétonitrile en 120 minutes
E	Isocratique, 25% acétonitrile en 50 minutes Gradient linéaire, 25 à 40% acétonitrile en 20 minutes Isocratique, 40% acétonitrile en 170 minutes
F	Isocratique 27% acétonitrile en 45 minutes
G	Isocratique 35% acétonitrile en 25 minutes
H	Gradient linéaire, 25 à 100% acétonitrile en 150 minutes
I	Isocratique 46% Acétonitrile en 30 minutes
J	Isocratique 50% Acétonitrile en 25 minutes
K	Isocratique 55% Acétonitrile en 25 minutes

ANNEXE 4

Annexe 4: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la 2-déacétoxytaxinine J des boutures de *T. cuspidata*.

RMN de la 2-déacétoxytaxinine J



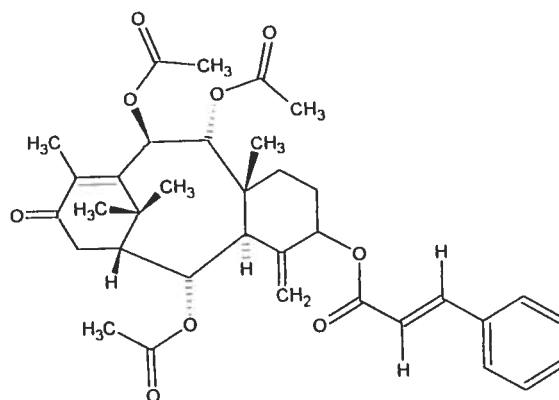
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC
1	1.85 (o.m)		40.23	
2	1.89 (o.m) 1.78 (o.m)		27.31 (o)	
3	3.020 (br.d)	5.3	37.52	
4	--		146.22	
5	5.569 (dd)	2.9	74.84	
6	1.94 (o.m) 1.88 (o.m)		34.62	
7	5.679 (dd)	11.5, 5.0	70.08	6, 8, Me19, Ac
8	--		46.36	
9	5.934 (d)	11.1	76.6 (hmqc)	7, 8, 10, 19, Ac
10	6.293 (d)	11.0	71.74	9, 11, 12, 15, Ac
11	--		134.8	
12	--		137.27	
13	5.802 (br.t)	≈ 8.3	70.62	
14	2.718 (dt) 0.978 (dd)	14.6, 9.6, 9.6 14.2, 6.6	31.92	1, 2, 12, 13
15	--		39.43	
16	1.090 (s)		31.21	1, 11, 15, Me17
17	1.622 (s)		27.31 (o)	1, 11, 15, Me16

18	2.330 (s)		15.32	11, 12, 13
19	0.872 (s)		13.23	3, 7, 8, 9
20	5.384 (s) 5.012 (d)	0.9	115.98	3, 3, 5
CO	--	--	166.0	
=CH α	6.557 (d)	16.1	118.45	Cl(Ph), 166.0
=CH β	7.763 (d)	16.1	145.75	Ca, Co(Ph), 166.0
Ph-Cl	--	--	134.2	--
o	7.49 (m)	--	128.12	
m	7.39 (o.m)		129.02	
p	7.39 (o.m)		130.60	
OAc	1.708 (s)		21.01	170.69 (Ac-13)
	1.994 (s)		21.01	169.45 (Ac-10)
	2.042 (s)		20.86	170.25 (Ac-9)
	2.075 (s)		21.47	169.85 (Ac-7)

ANNEXE 5

Annexe 5: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la taxinine des boutures de *T. cuspidata*.

RMN de la taxinine



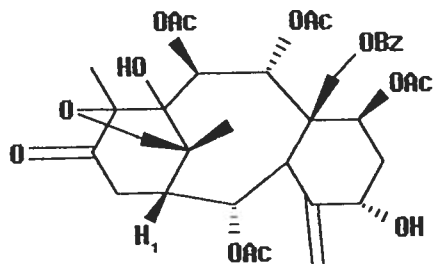
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC
1	2.22 (m)		48.58	2, 3, 11, 12, 13, 15
2	5.551 (dd)	6.4, 1.7	69.66	3, 8, 14, Ac
3	3.403 (d)	6.2	43.21	1, 8, 19, 20
4	--		141.97	
5	5.347 (o.m)		78.22	
6a	1.98		28.38	
6b	1.71 (o.m)			
7	1.77 (o.m) 1.72 (o.m)		27.53	
8	--		44.48	
9	5.888 (d)	10.0	75.91	7, 8, 10, 19, Ac
10	6.040 (d)	10.2	73.48	9, 11, 12, 15, Ac
11	--		150.61	
12	--		137.99	
13	--		199.43	
14a	2.831 (dd)	20.0, 6.9	36.05	2, 1, 2, 13, 15
14b	2.423 (d)	20.0		
15	--		37.65	
16	1.150 (s)		37.38	1, 11, 15, Me17
17	1.761 (s)		25.20	1, 11, 15, Me16
18	2.443 (s)		13.99	11, 12, 13

19	0.925 (s)		17.49	3, 7, 8, 9
20a	5.347 (o.s)		117.23	3, 4, 5
20b	4.841 (s)			3, 4, 5
C=O [5] -	--		166.31	C1(Ph), 166.31 (CO) Ph-o, Cα, 166.31 (CO) Cβ
=CH α	6.424 (d)	16.0	117.86	
CH= β	7.656 (d)	16.0	145.76	
Ph-C1	--	--	134.55	
o	7.754 (d)	7.2	128.49	
m	7.656 (t)	7.5	128.95	
p	7.405 ($\approx$ t)	7.3	130.37	
Ac	2.070 (s)		20.71	169.90
	2.056 (s)		21.39	169.72
	2.045 (s)		20.88	169.46

18	2.070 (d)	1.1	14.4	11, 12, 13
19	1.741 (s)		9.0	
20a	5.243 (s)		75.8	
20b	4.161 (s)			
OAc	2.280 (s)		21.8	170.0
OBz				
o	8.098 (dd)	8.3,	1.2	129.3
m	7.473 (t)	8.0		127.8
p	7.600 (t)	7.4		130.3

ANNEXE 7

Annexe 7: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la Taxinine M des boutures de *T. cuspidata*.



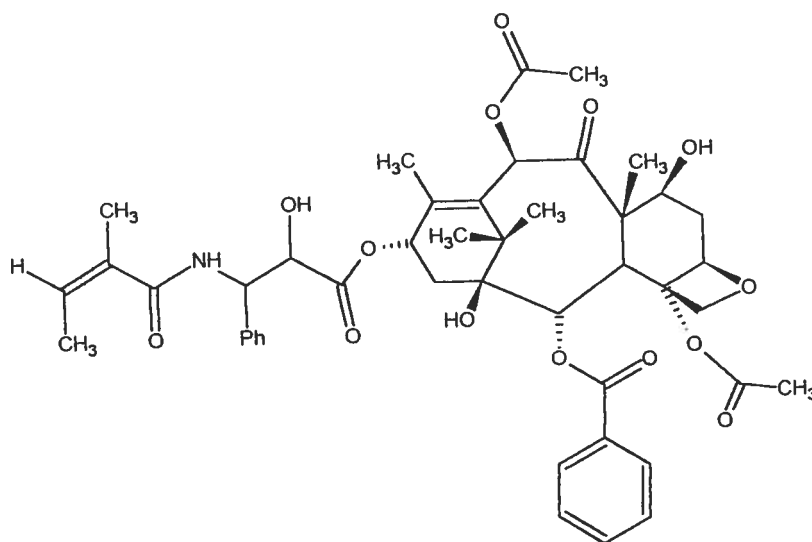
position	δH - mult	J (Hz)	δC	HMBC	NOESY
1	2.465 (br.dd)	$\sim 11.4, \sim 1.6$	48.3		<u>2, 14a, 16b, 17</u>
2	6.126 (dd)	2.6, 10.3	69.8	169.7	<u>1, 9, 17, 20a</u>
3	3.688 (d)	10.2	38.5	1, 4, 5, 7, 9, 15, 19, 20	<u>7, 10, 14b</u>
4	--		144.9		
5	4.421 (o.t)	~ 3.0	72.5		See 19b
6a	2.214 (ddd)	2.3, 6.1, 14.1	38.9		<u>5, 6a, 7</u>
6b	1.682 (o.ddd)	3.9, 10.7, 14.2		7	<u>3, 6a, 10</u>
7	5.493 (dd)	6.2, 10.7	68.5	3, 8, 9, 19, 168.1	<u>3, 6a, 10</u>
8	--		49.9	49.60	
9	5.351 (d)	3.2	69.8	11, 19, 15/8, 172.4	<u>2, 16a, 17</u>
10	5.291 (d)	3.0	63.8	9, 15/8, 12, 168.6	<u>3, 7, 18</u>
11	--		80.3		
12	--		91.5		
13	--		204.4		
14a	2.981 (dd)	11.8, 19.1	33.7	1, 2, 13	<u>3, 14b</u>
14b	2.732 (d)	19.1		1, 2, 12, 13, 15	<u>1, 14a</u>
15	--		49.9		
16a	4.070 (o.d)	8.1	81.9	1, 11, 12, 15, 17	<u>16b, 17, 18, 9</u>
16b	3.615 (d)	8.2		1, 11, 12, 15,	<u>1, 16a, 17</u>
17	1.279 (s)		15.3	1, 11, 15, 16	<u>1, 2, 9, 16a,</u>
18	1.152 (s)		11.8	11, 12, 13	<u>10, 16a, Ac-10</u>
19a	5.120 (d)	12.0	61.0	3, 8, 9, 166.7	<u>2, 19b</u>
19b	4.403 (d)	12.2		3, 8, 9, 166.7	<u>19a, 20a, 6a,</u>

					6b
20a	5.387 (s)		113.1	3, 4, 5, 8	<u>5/19b</u>, <u>20b</u>
20b	4.668 (s)			3, 4, 5, 8,	<u>2</u>, <u>20a</u>
Ac *4	2.129 (s)		20.4	172.5 (9)	
	2.090 (s)		20.3	168.6 (10)	
	2.011 (s)		21.0	168.2 (7)	
	2.009 (s)		21.0	169.8 (2)	
Bz-o	8.149 (d)	7.5	129.8	Bz-p, Bz-o,	<u>Bz-m</u>, 2
Bz-m	7.496 (t)	7.6	128.4	166.7	
Bz-p	7.594 (t)	7.6	133.4		

ANNEXE 8

Annexe 8: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la céphalomannine des boutures de *T. cuspidata*.

Céphalomannine :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC
1	---		79.2	
2	5.664 (d)	6.6	74.9	
3	3.780 (o.d)	7.1	45.5	
4			--	
5	4.930 (br.d)	8.0	84.3	
6a	2.54 (o.m)		--	
6b	1.87 (o.m)			
7	4.39 (o.m)		72.1	
8	--		58.7	
9	--		203.8	
10	6.266 (s)		75.5	
11			133.1	
12			141.9	
13	6.208 (t)	9.5	72.3	
14	2.29 (o.m)		--	
15			43.3	

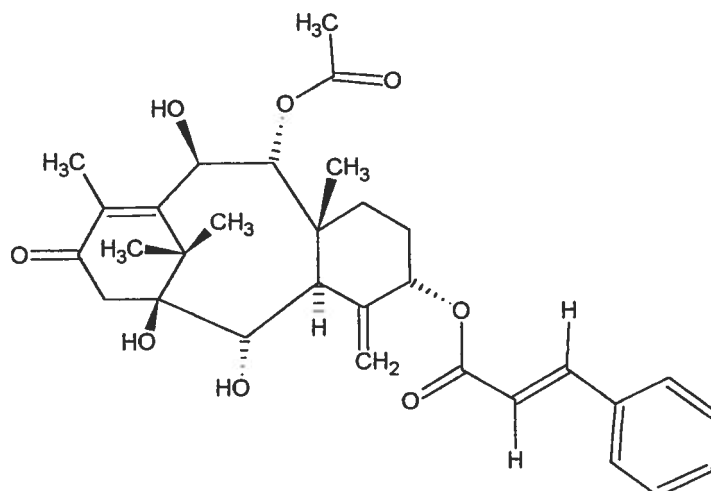
16	1.141 (s)		21.7	1, 11, 15, Me
17	1.25 (o.s)		26.8	1, 11, 15, Me
18	1.797 (o.s)		14.7	11, 12, 13
19	1.673 (o.s)		9.4	3, 7, 8, 9
20a	4.283 (o.d)	8.1	76.3	
20b	4.175 (o.d)	8.1		
OAc	2.381 (o.s)		22.4	
	2.237 (o.s)		20.7	
OBz				
o	8.11 (o.d)		130.0	
m,	7.50 (o.t)		128.5	
p	7.61 (t)		--	
C=O 1'			--	
CH(OH) 2'	4.702 (br.s)		73.2	
CH 3'	5.608 (dd)	9.9, 2.9	54.7	
Ph-3'	7.5-7.3 (m)		128.3	
			126.8	
NH 4'	6.472 (d)	9.1	--	
C=O 5'			--	
C= 6'			--	
Me- (=C6')	1.673 (o.s)		12.2 ?	
=CH 7'	6.423 (qq)	7.0, 1.1		
Me 8'	1.715 (d)	6.5	13.9	
Extra signal	3.65 (broad)		70.5	
Extra Me-CH2...	0.871 (t)	(cosy 1.29)	14.0	
	1.29		29.6,	
			29.0	

ANNEXE 9

Annexe 9: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's sur un composé inconnu des boutures de *T. cuspidata*.

Il s'agit d'un mélange de deux isomères. Le premier, la *O*-cinnamoyltaxicine I est majoritaire tandis que le second, la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I est minoritaire

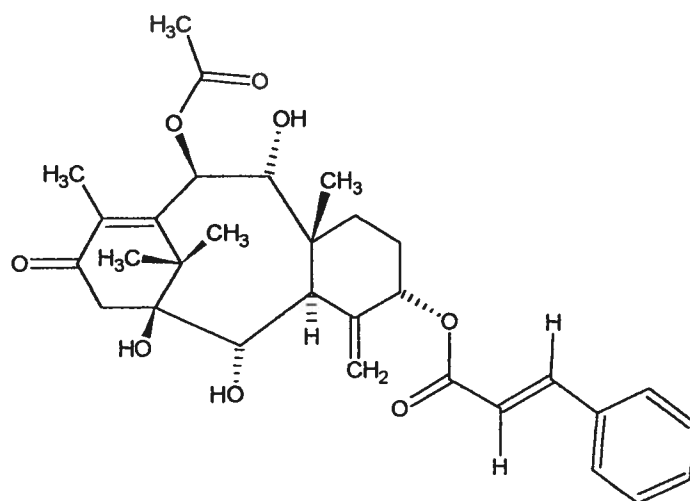
O-cinnamoyltaxicine I :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C	HMBC	NOESY
1	--		77.7		
2	4.019 (d)	6.9	71.4		3, 9, <u>17</u> , <u>19</u>
3	3.391 (d)	6.9	46.5	2, 1/5, 8, 19	
4	--		144.1		
5	5.321 (t)	2.7	77.9		
6a	1.99 (o.m)		28.9		5, <u>6b</u> , 7a
6b	1.74 (o.m)				<u>5</u> , <u>6a</u> , <u>19</u>
7a	1.87		26.3		<u>7b</u> , 19
7b	1.50				
8	--		45.3		<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
9	4.299 (d)	9.7	75.1	7, 8, 10	<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
10	5.867 (d)	9.7	76.5	9, 11, 12, 15, 170.0	<u>7b</u> , <u>18</u>
11	--		153.2		
12	--		137.0		

13	--		199.9		
14a	2.68 (d)	19.6	44.3	1, 2, 13, 15	
14b	2.63 (d)	19.6			
15	--		42.2		
16	1.255 (s)		33.9	1, 11, 15, Me	<u>14, 17</u>
17	1.525 (s)		20.2	1, 11, 15, Me	<u>2, 9, 16</u>
18	2.248 (s)		13.7	11, 12, 13	<u>10, CHα</u>
19	1.183 (s)		17.8	3, 7, 8, 9	<u>2, 6b, 7a 9, 20b</u>
20a	5.468 (s)		117.3	3, 4, 5	<u>5, 20b</u>
20b	5.362 (s)			3, 5	<u>19, 20a</u>
OAc	2.150 (s)		21.2		
Cinn	--				
Ch β	7.635 (d)	16.0	145.6	117.7, o, 134.5	18
CH α	7.375 (d)	16.0	117.4	(C1), 166.3	
Ph-o	7.736 (d)	8.1	128.5	134.5 (C1),	
m/p	7.43-7.41 (m)		129.0, 130.5	166.3	

5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I :



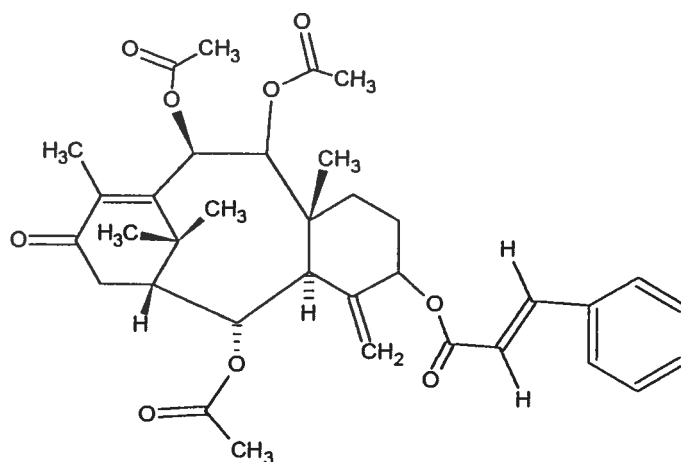
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C		
1	--		77.8		
2	4.119 (d)	6.6	71.4		<u>3, 9, 17, 19</u>
3	3.391 (d)	6.9	46.5		<u>14</u>
4	--		143.5		
5	5.305 (t)	2.5	77.9		

6a	1.99 (o.m)		28.9		
6b	1.74 (o.m)				Voir majoritaire
7a	1.74		27.5		
7b	1.60				
8	--		44.6		
9	5.765 (d)	10.0	78.4	7, 8, 10, 19, 171.6	<u>2, 17, 19</u>
10	5.048 (d)	10.0	71.7	12, 15	<u>7b, 18</u>
11	--		156.6		
12	--		137.0		
13	--		199.9		
14	2.697 (~s)		44.3		
15	--		42.4		
16	1.358 (s)		34.4	1, 11, 15, Me	14, <u>17</u>
17	1.705 (s)		19.7	1, 11, 15, Me	<u>2, 9, 16</u>
18	2.099 (s)		13.8	11, 12, 13	<u>10, CHα</u>
19	0.980 (s)		17.8	3, 7, 8, 9	<u>2, 6b, 9, 20b</u>
20a	5.456 (s)		118.0	3, 4, 5	5, <u>20b</u>
20b	5.421 (s)			3, 5	<u>19, 20a</u>
OAc	2.169 (s)		20.9		
Cinn	--				
CH β	7.635 (d)	16.0	145.6		
CH α	6.380 (d)	15.9	117.4		18
Ph-o	7.736 (d)	8.1	128.5		
m/p	7.43-7.41 (m)		129.0, 130.5		

ANNEXE 10

Annexe 10: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la taxinine des boutures de *T. canadensis*.

Taxinine



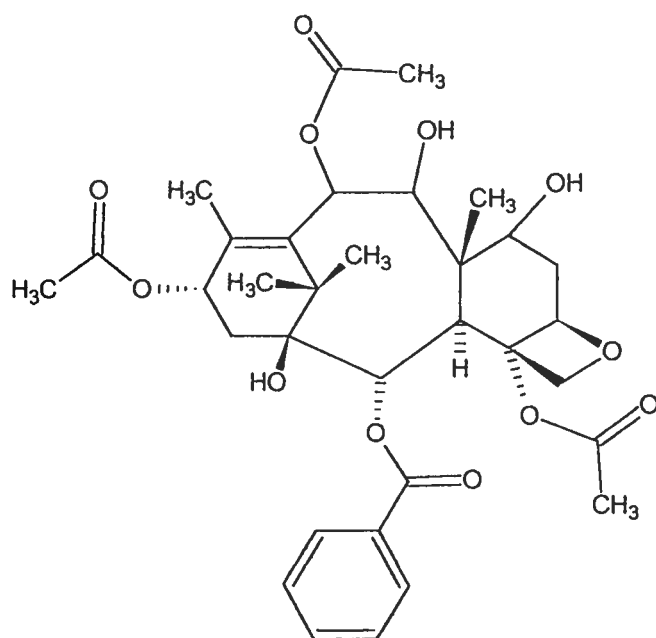
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC	NOESY
1	2.223 (m)		48.59		
2	5.552 (dd)	6.3, 1.7	69.67		
3	3.404 (d)	6.5	43.22	8	
4	--		141.99		
5	5.348 (o.s)		78.23		
6a	1.983 (m)		27.54		
6b	1.73 (o.m)				
7	1.73 (o.m)		27.1		
8	--		44.49		
9	5.888 (d)	10.2	75.92	7, 8, 19, 169.7	
10	6.041 (d)	10.2	73.49	11, 12, 15, 169.5	
11	--		150.61		
12	--		138.00		
13	--		199.4		
14a	2.832 (dd)	19.9,	36.06	13	
14b	2.423 (d)	7.1 20.0		1, 2, 13, 15	
15	--		37.66		
16	1.152 (s)		37.39	1, 11, 15, Me	
17	1.762 (s)		25.21	1, 11, 15, Me	

18	2.275 (s)		14.00	11, 12, 13	
19	0.926 (s)		17.50	3, 7, 8, 9	
20a	5.348 (o.s)		117.23	3	
20b	4.841 (s)			3, 5	
OAc	2.071 (s) 2.057 (s) 2.046 (s)		21.10 20.90 20.72	169.7 169.5 170	
1' CO			166.0		
2' CH= α	6.425 (d)	15.7	117.87	C1Ph, 166.0	
3' CH= β	7.657 (d)	15.7	145.76	C α , C-oph	
Ph-3' o m p	7.755 (d) 7.441 (~t) 7.393 (~t)	7.2 7.2 --	132.98 128.96 128.49 130.37	C β	

ANNEXE 11

Annexe 11: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la 9-dihydro-13-acétylbaccatine III des boutures de *T. canadensis*.

9-dihydro-13-acétylbaccatine III :



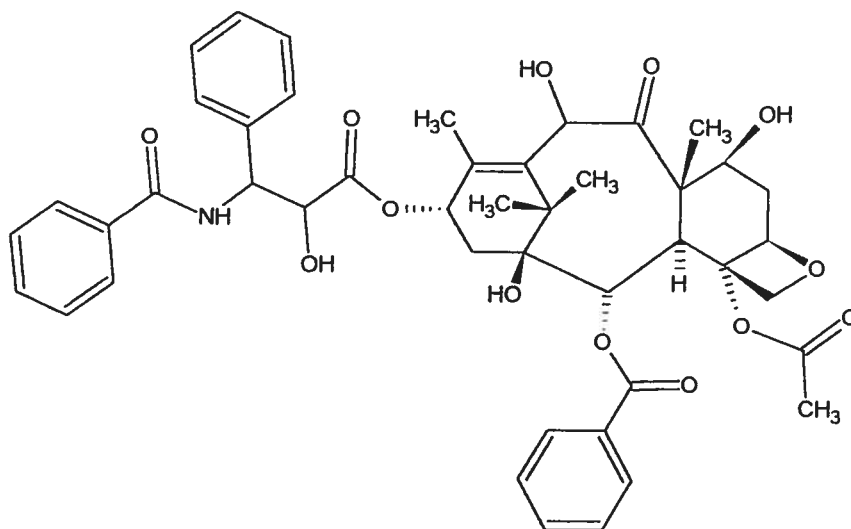
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC
1	--		78.4	
OH-1	1.689 (s)			1, 14
2	5.751 (d)	5.8	73.4	1, 3, 8, 14, 166.7
3	3.043 (d)	5.9	46.7	2, 2/7, 8, 19
4			81.5	
5	4.946 (d)	8.9	83.8	4
6a	2.545 (ddd)	14.6, 9.0, 7.8		
6b	1.919 (o.dd)	14.6, 9.5		
7	4.44 (o.m)		73.8	
8	--		44.9	
9	4.457 (o.dd)	11.0, 7.1	76.7	
OH-9	4.223 (d)	7.2		
10	6.164 (o.d)	10.7	73.2	9, 11, 12, 15, 170.0
11			134.4	
12			139.5	

13	6.16 (o.m)		69.5	
14	2.20 (o.m)		35.1	1, 2, 12, 13, 15
15	--		42.8	
16/17	1.245 (s)		28.0	1, 11, 15, Me
17/16	1.669 (s)		22.4	1, 11, 15, Me
18	1.945 (s)		14.7	11, 12, 13
19	1.813 (s)		12.3	3, 7, 8, 9
20a	4.301 (d)	8.3	76.4	4
20b	4.154 (d)	8.2		5
OAc	2.266 (s)		22.6	168.9
	2.182 (s)		21.0	170.0
	2.131 (s)		21.1	169.8
OBz				166.7
o	8.077 (d)	8.1	129.9	
m	7.468 (t)	7.8	128.4	
p	7.599 (t)	7.4	133.7	

ANNEXE 12

Annexe 12: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour le 10-désacétyltaxol des boutures de *T. canadensis*.

10-désacétyltaxol :



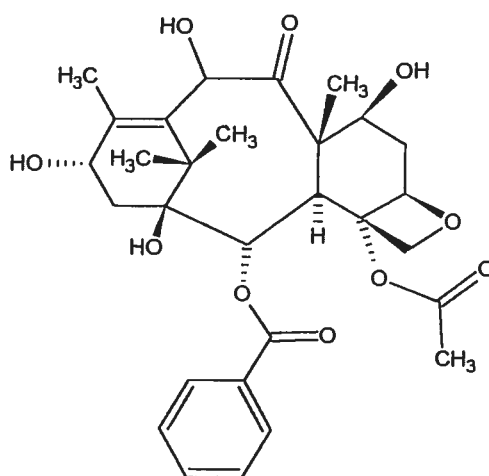
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC
1	--		78.8	
2	5.674 (d)	7.0	74.6	
3	3.904 (d)	6.7	46.2	
4	--			
5	4.930 (d)	9.9	84.0	
6a	2.58 (m)		36.9	
6b	1.84 (m)			
7	4.20 (o.m)		72.0	
OH-7	1.339 (d)	8.1		
8	--		57.7	
9	--		211.3	
10	5.166 (s)		74.4	
OH-10	4.167 (s)			
11	--		136.0	
12	--		138.1	
13	6.195 (t)	9.0	72.3	
14	2.29 (t)	9.6	35.8	
15	--		43.0	

16/17	1.117 (s)		20.4	1, 11, 15, Me
17/16	1.207 (s)		26.4	1, 11, 15, Me
18	1.767 (s)		14.2	11,12, 13
19	1.758 (s)		9.7	3, 7, 8, 9
20a	4.309 (d)	9.2	76.5	
20b	4.204 (o.d)			
OAc	2.381 (s)		22.3	170.4
OBz				
o	8.119 (d)	7.9	130.1	
m	7.501 (o.t)	--	128.6	
p	7.605 (t)	7.2	133.6	
1'	--			
2'	4.777 (br.dd)	4.0, 2.2	73.2	
OH-2'	3.483 (d)	5.0		
3'	5.778 (dd)	9.0, 2.3	54.7	
NH-4'	7.04 (o.d)			
CO 5'				
Ph-6'				
o	7.746 (d)	7.3	126.9	
m	7.40 (o.t)		128.7	
p	7.5 (o.m)		--	
Ph-3'				
o	7.47 (o.d)		127.0	
m	7.40 (o.m)		128.7	
p	7.34 (t)		--	
Extra Me	1.246		29.5	

ANNEXE 13

Annexe 13: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la 10-désacétylbaccatine III des boutures de *T. canadensis*.

10-désacétylbaccatine III :



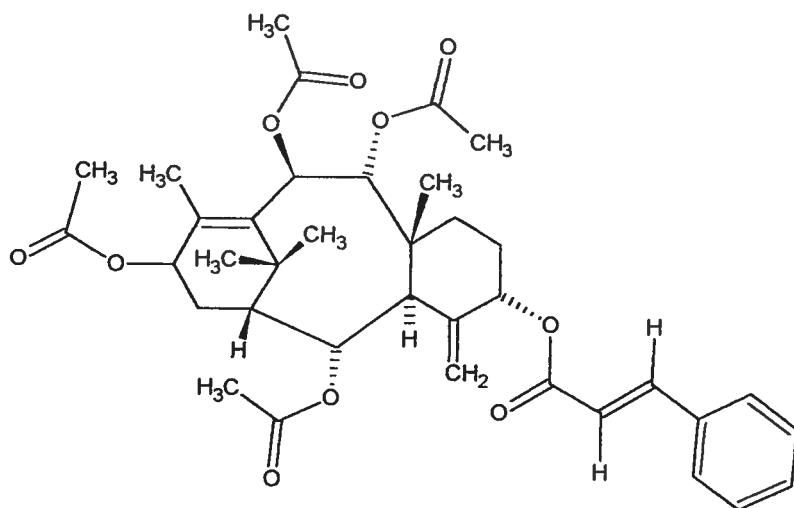
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC	NOESY
1	--		78.9		
OH-1	1.556 (s)			14	
2	5.633 (d)	7.3	74.6	1, 3, 166.9	16/17, 19
3	4.004 (d)	7.1	46.6	1, 8	7, 10, 14
4	--		80.6		
5	4.967 (dd)	9.5, 1.1	83.8		6a,
6a	2.597 (ddd)	14.3, 9.5, 6.7	36.9		5, 6b, 7
6b	1.820 (ddd)	14.7, 10.8, 1.9			6a
7	4.275 (o.m)		72.0		6a, 10, 18
OH-7	1.358 (br.d)	7.3			
8	--		57.7		
9	--		211.9		
10	5.241 (s)		75.0	9, 11, 12, 15	3, 7, 18,
OH-10	4.159 (o.s)				20b/OH10
11	--		134.8		
12	--		142.1		
13	4.874		67.7		14, 16/17,
OH-13	(br.m)	5.0			OH-13

	1.985 (d)				
14	2.27 (o.m)		38.5	1, 2, 13	
15	--		42.6		
16/17	1.089 (o.s)		19.5	1, 11, 15, Me	2, 13, 20b/OH10
17/16	1.089 (o.s)		26.6	1, 11, 15, Me	
18	2.070 (s)		14.9	11, 12, 13	
19	1.740 (s)		9.5	3, 7, 8, 9	2, 20b/OH10
20a	4.313 (d)	8.4	76.4	4	20b
20b	4.169 (o.d)			3, 5	19, 20a
OAc	2.279 (s)		22.4	170.6	
OBz					
o	8.097 (d)	7.7	129.9		
m	7.472 (t)	7.9	128.5		
p	7.600 (t)	7.4	133.5		

ANNEXE 14

Annexe 14: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la taxinine E des boutures de *T. canadensis*.

Cet échantillon renferme des composés possédant une chaîne latérale de cinnamate en C5. Il s'agit d'un mélange d'isomères de Taxinine E, 2 trans et 2 cis. L'un des isomères trans est présent majoritairement dans des proportions d'environ 45%. Le second isomère trans représente 30% du mélange alors que les deux isomères cis sont présents en quantités beaucoup plus petites mais équivalentes. Seul le composé majoritaire est présenté. En effet, aucune région ne présentant chaque composé bien séparé, il a été difficile d'intégrer les données recueillies.



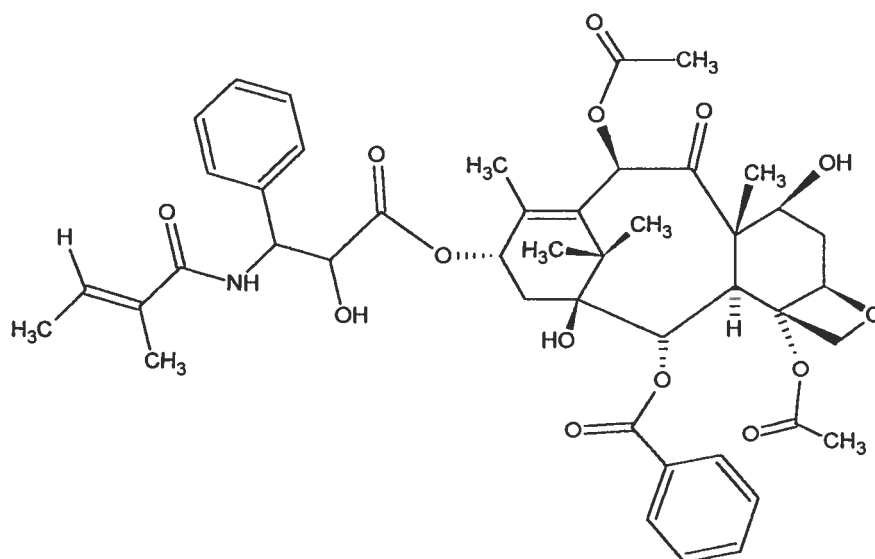
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	
1	1.91		48.6	
2	5.49 (o.dd)	6.8, 1.7	71.9	
3	3.372 (d)	6.2	43.5	
4	--			
5	5.47 (br.s)		78.4	
6	2.61 1.9?			
7	??		27.2	
8	--		44.2	
9	5.945 (d)	10.4	76.5	7, 10, 169.9
10	6.058 (d)	10.6	72.2	12, 15, 169.9

11	--		133.9	
12	--		137.2	
13	5.80 (o.m)		70.2	
14a	2.66			
14b	1.49			
15	--		37.6	
16/17	1.107 (s)		31.2	1, 11, 15, Me
17/16	1.761 (s)		26.6	1, 11, 15, Me
18	2.311 (s)		15.3	11, 12, 13
19	0.918 (s)		17.7	3, 8, 9, 27.2(7)
20a	5.41 (s)		118.1	
20b	4.95 (s)			
OAc	1.789 (s) 2.063, 2.026, 2.010			170.7 169.9
Cinn				
Ch β	7.779 (o.d)	16.1	145.4	128.1
CH α	6.674 (d)	16.0	118.6	134.4
Ph-o	7.49 (o.m)			
m/p	7.40-7.36 (m)			

ANNEXE 15

Annexe 15: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour la cephalomannine des boutures de *T. canadensis*.

Céphalomannine :



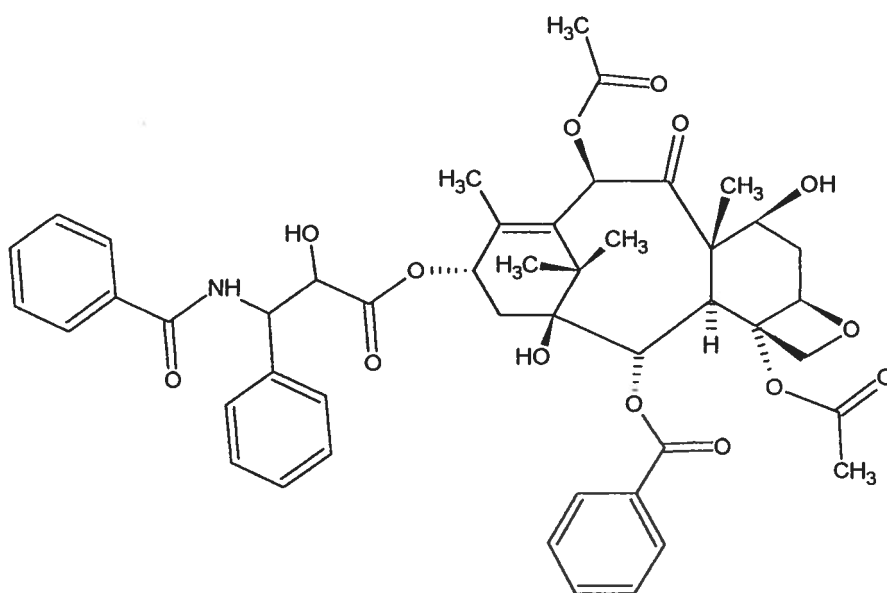
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)
1	--		
2	5.663 (d)	7.2	
3	3.780 (d)	7.0	
4	--		
5	4.931 (d)	9.3	
6a	2.54 (m)		
6b	1.87 (m)		
7	4.39 (br.m)		
8	--		
9	--		
10	6.266 (s)		
11	--		
12	--		
13	6.206 (br.t)	8.9	
14	2.28 (o.m)		
15	--		

16/17	1.141 (s)		
17/16	1.25 (o.s)		
18	1.79 (o.s)		
19	1.674 (s)		
20a	4.284 (d)	8.7	
20b	4.178 (d)	8.5	
OAc	2.353 (s) 2.236 (s)		
OBz			
o	8.110 (d)	7.5	
m	7.498 (t)	7.9	
p	7.606 (t)	7.4	
1' (CO)	--		
2'	4.70 (br)		
3'	5.607 (dd)	9.2, 2.9	
4' NH	6.471 (d)	9.3	
5' (CO)	--		
6' =C(Me)	-- 1.79 ?		
7' =CH			
8' Me	1.713 (d)	6.1	
Ph-3'	7.4-7.3 m		

ANNEXE 16

Annexe 16: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour le Taxol® des boutures de *T. canadensis*.

Taxol :



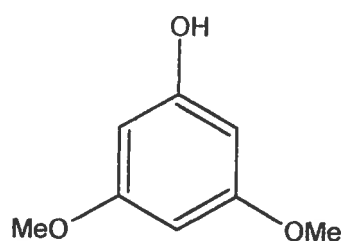
Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C)	HMBC
1	--		79.0	
OH-1	1.707 (s)			1, 14
2	5.667 (d)	7.0	74.8	1, 3, 8, 14, 167.0
3	3.793 (d)	7.2	45.6	
4	--		81.2	
5	4.939 (dd)	9.4, 1.3	84.3	
6a	2.543 (ddd)	14.9, 9.4, 6.6	35.8	
6b	1.877 (ddd)	14.3, 11.3, 2.3		
7	4.939 (br.t)	~ 8.1	72.1	
8	--		58.6	
9	--		203.8	
10	6.263 (s)		75.4	9, 11, 12, 15, 171.2
11	--		133.4	
12	--		141.9	
13	6.228 (t)	9.2	72.2	

14a	2.354 (o.dd)	15.7, 8.9	35.6	1, 15
14b	2.277 (dd)	15.3, 8.8		
15	--		43.1	
16	1.237 (s)		26.8	1, 11, 15, Me
17	1.137 (s)		21.8	1, 11, 15, Me
18	1.788 (s)		14.8	11, 12, 13
19	1.679 (s)		9.5	3, 7, 8, 9
20a	4.296 (d)	8.5	76.3	4
20b	4.192 (d)	8.3		3, 5
OAc	2.380 (s)		22.6	170.4
	2.232 (s)		20.8	171.2
OBz				167.0
o	8.128 (d)	7.5	130.1	
m	7.504 (o.t)		128.6	
p	7.607 (t)	7.3	133.5	
Chain:				
1'	--			
2'	4.784 (br.s)		73.1	
OH-2'	3.49 (br.s)			
3'	5.783 (dd)	8.9, 2.1	55.0	
Phenyl	7.47-7.33		128.7	
			128.2	
4' NH	6.949 (d)	8.5		
5' Ph				
o	7.734 (d)	7.5	126.8	
m	7.468 (o.m)		126.8	
p			131.9	
EXTRA	3.64 (br.m)		70.2	
	0.872 (~t)	7.2	14.0	
	1.30 (m)		29.6,	
			29.0	

ANNEXE 17

Annexe 17: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour un composé inconnu isolé des boutures de *T. canadensis*.

Il ne s'agit pas d'un taxane

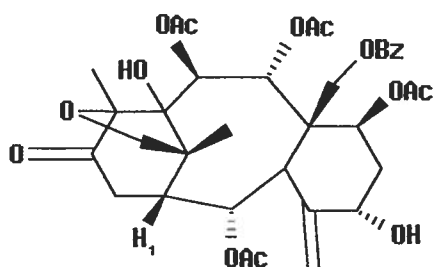


Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ (C) - HMQC
Ph-H4	6.065 (t)	2.0	93.0
Ph-H2/6	6.012 (d)	2.0	94.0
OMe x2	3.749 Z(s)		55.2
OH	4.75 (br)		--

ANNEXE 18

Annexe 18: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour un composé inconnu isolé des boutures de *T. cuspidata*.

Il s'agit de la Taxinine M :



position	δH - mult	J (Hz)	δC	HMBC	NOESY
1	2.465 (br.dd)	$\sim 11.8, \sim 1.6$	48.5		<u>2, 14a, 16b, 17</u>
2	6.129 (dd)	2.5, 10.3	70.0	169.7	<u>1, 9, 17, 20a</u>
3	3.689 (d)	10.2	38.8	1, 5, 7, 8/15, 2/9, 19, 20	<u>7, 10, 14b</u>
4	---		144.8		
5	4.421 (o.t)		72.7		See 19b
6a	2.208 (ddd)	2.2, 6.1, 14.4	39.2		<u>5, 6b</u>
6b	1.685 (o.ddd)	3.7, 10.7, 14.4		7	<u>5, 6a, 7</u>
7	5.501 (dd)	6.2, 10.8	68.6	3, 8, 9, 19, 167.9	<u>3, 6a, 10</u>
8	--		49.8		
9	5.354 (d)	2.8	69.9	8, 11, 19, 172.4	<u>2, 16a, 17</u>
10	5.297 (d)	2.8	63.9	9, 15/8, 12, 168.2	<u>3, 7, 18</u>
11	--		80.3		
12	--		91.4		
13	--		204.1		
14a	2.982 (dd)	12.0, 19.3	34.0	1, 2, 13	<u>3, 14b</u>
14b	2.730 (d)	19.1		1, 2, 12, 13, 15	<u>1, 14a</u>
15	--		49.7		
16a	4.0704(o.d)	~ 8.0	82.1	1, 11, 12, 15, 17	<u>16b, 17, 18, 9</u>
16b	3.616 (d)	8.1		1, 11, 12, 15,	<u>1, 16a, 17</u>
17	1.281 (s)		15.5	1, 11, 15, 16	<u>1, 2, 9, 16a,</u>
18	1.156 (s)		12.0	11, 12, 13	10, 16a, Ac-10
19a	5.117 (d)	12.1	61.2	3, 8, 9, 166.6	2, <u>19b</u>
19b	4.402 (o.d)			3, 8, 9, 166.6	<u>19a, 20a, 6a, 6b</u>
20a	5.386 (s)		113.3	3, 4, 5, 8	<u>5/19b, 20b</u>
20b	4.672 (s)			3, 4, 5, 8	<u>2, 20a</u>
Ac *4	2.129 (s)		20.7	172.3 (9)	
	2.094 (s)		20.6	168.4 (10)	
	2.010 (s) x2		21.2	167.9 (7)	

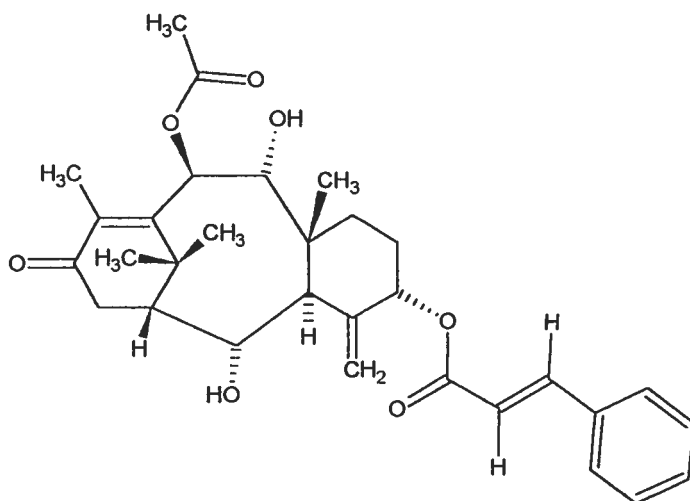
			21.2	169.8 (2)	
Bz-o	8.150 (d)	7.8	129.8	Bz-p, Bz-o, 166.7	<u>Bz-m</u>, 2
Bz-m	7.497 (t)	7.9	128.4		
Bz-p	7.595 (t)	7.3	133.4		

ANNEXE 19

Annexe 19: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour un composé inconnu isolé des boutures de *T. cuspidata*.

Il s'agit d'un mélange de deux isomères. Le premier, la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine II est majeur tandis que le second, la 5-cinnamoyl-9-acétyltaxicine II est mineur.

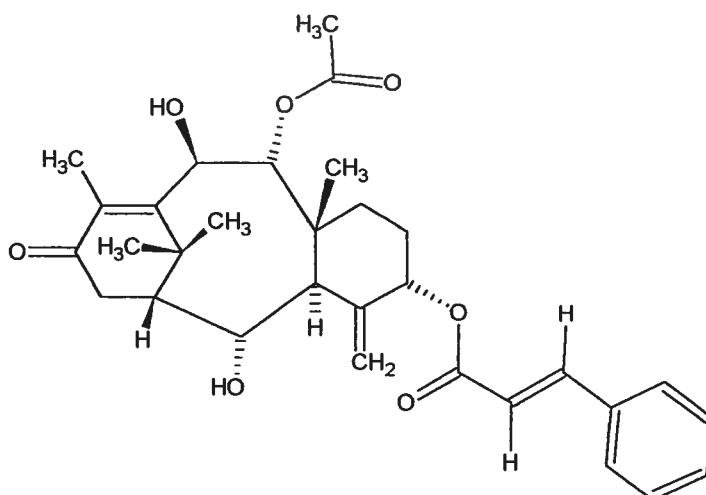
5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine II :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C	HMBC
1	2.365 (br.t)	~6.8	51.3	
2	4.190 (br.d)	~6	67.9	
3	3.258 (d)	6.5	45.2	
4	--			
5	5.338 (t)	3.0	78.0	
6a	1.99 (o.m)		27.4	
6b	1.74 (o.m)			
7a	1.85		26.3	
7b	1.50			
8	--		?45.2?	
9	4.216 (d)	10.1	75.6	
10	5.823 (d)	9.6	76.8	
11	--		154.5	
12	--		137.3	

13	--		199.6	
14a	2.83 (o.dd)		35.7	
14b	2.18 (o.m)			
15	--		51.2	
16	1.166 (o.s)		37.4	1, 11, 15, Me
17	1.573 (s)		25.6	1, 11, 15, Me
18	2.253 (s)		13.7	11, 12, 13
19	1.166 (o.s)		17.8	3, 7, 8, 9
20a	5.435 (s)		117.1	
20b	5.373 (s)			
OAc	2.139 (s)		21.2	170.2
Cinn	--			
Ch β	7.641 (o.d)	16.0	145.5	
CH α	6.402 (o.d)	15.9	117.7	
Ph-o	7.749 (o.d)	7.9	128.4	
m/p	7.43-7.30 (m)		128.8, 130.3	

5-cinnamoyl-9-acétyltaxicine II :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C	HMBC
1	2.365 (o.m)		51.3	
2	4.291 (d)	~5.5	67.9	
3	3.258 (o.d)	6.5	45.2	
4	--			
5	5.322 (t)	3.3	78.0	
6a	1.99 (o.m)		--	
6b	1.74 (o.m)			
7a	1.7		27.5	

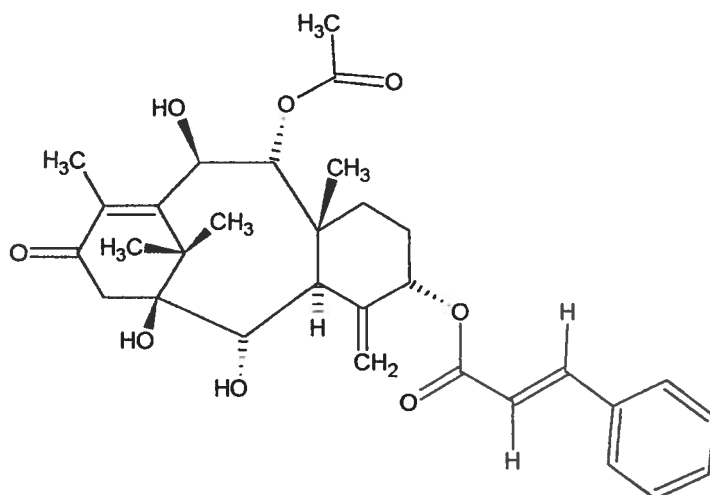
7b	1.6			
8	--		44.6	
9	5.681 (d)	9.9	78.9	
10	5.009 (d)	9.8	71.9	
11	--		154.5	
12	--		135.2	
13	--		200.1	
14	2.8 (o.m)		--	
15	--		37.8	
16	1.268 (o.s)		37.9	1, 11, 15, Me
17	1.754 (s)		25.4	1, 11, 15, Me
18	2.111 (s)		13.9	11, 12, 13
19	0.961 (s)		17.7	3, 7, 8, 9
20a	5.42 (o.s)		117.7	
20b	5.34 (o.s)			
OAc	2.166 (s)		20.9	
Cinn	--			
CH β	7.641 (o.d)	16.1		
CH α	6.404 (o.d)	15.9		
Ph-o	7.749 (o.d)	7.9		
m/p	7.43-7.30 (m)			

ANNEXE 20

Annexe 20: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour un composé inconnu isolé des boutures de *T. cuspidata*.

Il s'agit d'un mélange de deux isomères. Le premier, la *O*-cinnamoyltaxicine I est majoritaire tandis que le second, la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I est minoritaire

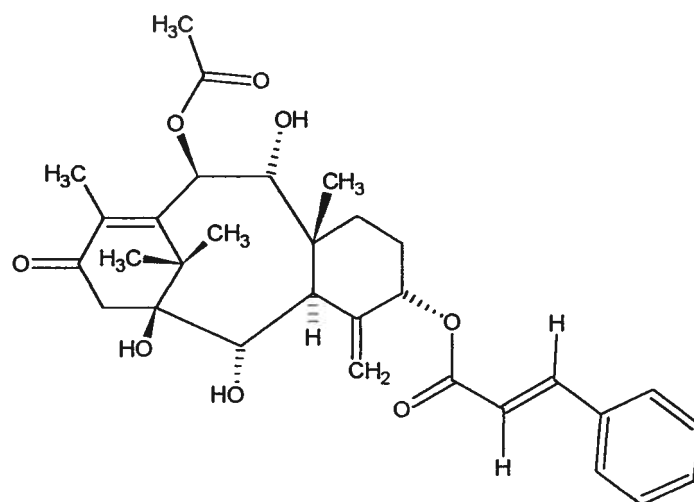
O-cinnamoyltaxicine I :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C	HMBC	NOESY
1	--		77.7		
2	4.019 (d)	6.9	71.4		3, 9, <u>17</u> , <u>19</u>
3	3.391 (d)	6.9	46.5	2, 1/5, 8, 19	
4	--		144.1		
5	5.321 (t)	2.7	77.9		
6a	1.99 (o.m)		28.9		5, <u>6b</u> , 7a
6b	1.74 (o.m)				<u>5</u> , <u>6a</u> , <u>19</u>
7a	1.87		26.3		<u>7b</u> , 19
7b	1.50				
8	--		45.3		<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
9	4.299 (d)	9.7	75.1	7, 8, 10	<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
10	5.867 (d)	9.7	76.5	9, 11, 12, 15, 170.0	<u>7b</u> , <u>18</u>
11	--		153.2		

12	--		137.0		
13	--		199.9		
14a	2.68 (d)	19.6	44.3	1, 2, 13, 15	
14b	2.63 (d)	19.6			
15	--		42.2		
16	1.255 (s)		33.9	1, 11, 15, Me	14, 17
17	1.525 (s)		20.2	1, 11, 15, Me	2, 9, 16
18	2.248 (s)		13.7	11, 12, 13	10, CHα
19	1.183 (s)		17.8	3, 7, 8, 9	2, 6b, 7a 9, 20b
20a	5.468 (s)		117.3	3, 4, 5	5, 20b
20b	5.362 (s)			3, 5	19, 20a
OAc	2.150 (s)		21.2		
Cinn	--				
Ch β	7.635 (d)	16.0	145.6	117.7, o, 134.5	18
CH α	7.375 (d)	16.0	117.4	(C1), 166.3	
Ph-o	7.736 (d)	8.1	128.5	134.5 (C1),	
m/p	7.43-7.41 (m)		129.0, 130.5	166.3	

5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C		
1	--		77.8		
2	4.119 (d)	6.6	71.4		3, 9, 17, 19
3	3.391 (d)	6.9	46.5		14
4	--		143.5		

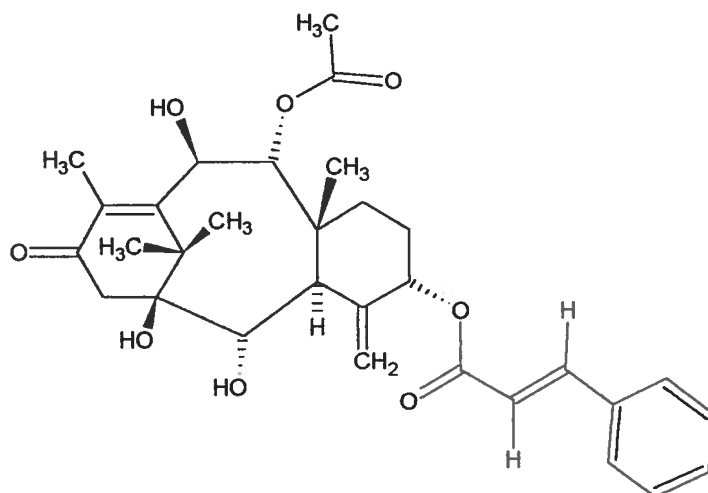
5	5.305 (t)	2.5	77.9		
6a	1.99 (o.m)		28.9		Voir majoritaire
6b	1.74 (o.m)				
7a	1.74		27.5		
7b	1.60				
8	--		44.6		
9	5.765 (d)	10.0	78.4	7, 8, 10, 19, 171.6	<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
10	5.048 (d)	10.0	71.7	12, 15	<u>7b</u> , <u>18</u>
11	--		156.6		
12	--		137.0		
13	--		199.9		
14	2.697 (~s)		44.3		
15	--		42.4		
16	1.358 (s)		34.4	1, 11, 15, Me	14, <u>17</u>
17	1.705 (s)		19.7	1, 11, 15, Me	<u>2</u> , <u>9</u> , <u>16</u>
18	2.099 (s)		13.8	11, 12, 13	<u>10</u> , CH α
19	0.980 (s)		17.8	3, 7, 8, 9	<u>2</u> , <u>6b</u> , <u>9</u> , 20b
20a	5.456 (s)		118.0	3, 4, 5	5, <u>20b</u>
20b	5.421 (s)			3, 5	<u>19</u> , <u>20a</u>
OAc	2.169 (s)		20.9		
Cinn	--				18
CH β	7.635 (d)	16.0	145.6		
CH α	6.380 (d)	15.9	117.4		
Ph-o	7.736 (d)	8.1	128.5		
m/p	7.43-7.41 (m)		129.0, 130.5		

ANNEXE 21

Annexe 21: Résultats des analyses en résonance magnétique nucléaire effectuées par Françoise Sauriol à l'Université de Queen's pour un composé inconnu isolé des boutures de *T. cuspidata*.

Il s'agit d'un mélange de deux isomères. Le premier, la *O*-cinnamoyltaxicine I est majoritaire tandis que le second, la 5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I est minoritaire

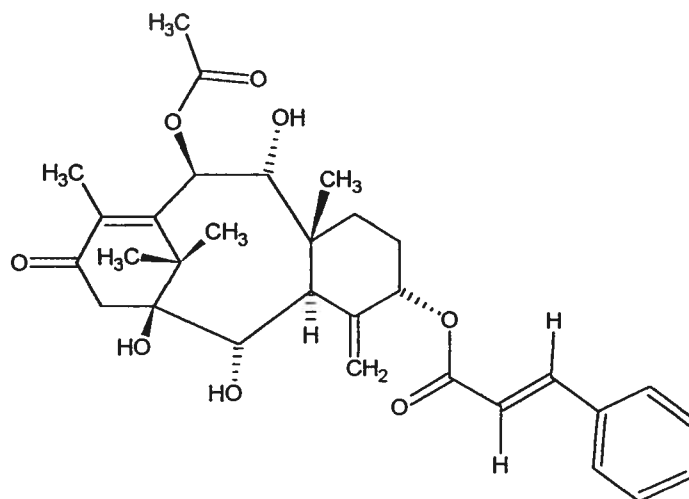
O-cinnamoyltaxicine I :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C	HMBC	NOESY
1	--		77.7		
2	4.019 (d)	6.9	71.4		3, 9, <u>17</u> , <u>19</u>
3	3.391 (d)	6.9	46.5	2, 1/5, 8, 19	
4	--		144.1		
5	5.321 (t)	2.7	77.9		
6a	1.99 (o.m)		28.9		5, <u>6b</u> , 7a
6b	1.74 (o.m)				<u>5</u> , <u>6a</u> , <u>19</u>
7a	1.87		26.3		<u>7b</u> , <u>19</u>
7b	1.50				
8	--		45.3		<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
9	4.299 (d)	9.7	75.1	7, 8, 10	<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
10	5.867 (d)	9.7	76.5	9, 11, 12, 15, 170.0	<u>7b</u> , <u>18</u>
11	--		153.2		

12	--		137.0		
13	--		199.9		
14a	2.68 (d)	19.6	44.3	1, 2, 13, 15	
14b	2.63 (d)	19.6			
15	--		42.2		
16	1.255 (s)		33.9	1, 11, 15, Me	<u>14, 17</u>
17	1.525 (s)		20.2	1, 11, 15, Me	<u>2, 9, 16</u>
18	2.248 (s)		13.7	11, 12, 13	<u>10, CHα</u>
19	1.183 (s)		17.8	3, 7, 8, 9	<u>2, 6b, 7a 9, 20b</u>
20a	5.468 (s)		117.3	3, 4, 5	<u>5, 20b</u>
20b	5.362 (s)			3, 5	<u>19, 20a</u>
OAc	2.150 (s)		21.2		
Cinn	--				
Ch β	7.635 (d)	16.0	145.6	117.7, o, 134.5	18
CH α	7.375 (d)	16.0	117.4	(C1), 166.3	
Ph-o	7.736 (d)	8.1	128.5	134.5 (C1),	
m/p	7.43-7.41 (m)		129.0, 130.5	166.3	

5-cinnamoyl-10-acétyltaxicine I :



Position	δ (H) - mult	J (Hz)	δ C		
1	--		77.8		
2	4.119 (d)	6.6	71.4		<u>3, 9, 17, 19</u>
3	3.391 (d)	6.9	46.5		14
4	--		143.5		

5	5.305 (t)	2.5	77.9		
6a	1.99 (o.m)		28.9		Voir majoritaire
6b	1.74 (o.m)				
7a	1.74		27.5		
7b	1.60				
8	--		44.6		
9	5.765 (d)	10.0	78.4	7, 8, 10, 19, 171.6	<u>2</u> , <u>17</u> , <u>19</u>
10	5.048 (d)	10.0	71.7	12, 15	<u>7b</u> , <u>18</u>
11	--		156.6		
12	--		137.0		
13	--		199.9		
14	2.697 (~s)		44.3		
15	--		42.4		
16	1.358 (s)		34.4	1, 11, 15, Me	14, <u>17</u>
17	1.705 (s)		19.7	1, 11, 15, Me	<u>2</u> , <u>9</u> , <u>16</u>
18	2.099 (s)		13.8	11, 12, 13	<u>10</u> , CH α
19	0.980 (s)		17.8	3, 7, 8, 9	<u>2</u> , <u>6b</u> , <u>9</u> , 20b
20a	5.456 (s)		118.0	3, 4, 5	5, <u>20b</u>
20b	5.421 (s)			3, 5	19, <u>20a</u>
OAc	2.169 (s)		20.9		
Cinn	--				18
CH β	7.635 (d)	16.0	145.6		
CH α	6.380 (d)	15.9	117.4		
Ph-o	7.736 (d)	8.1	128.5		
m/p	7.43-7.41 (m)		129.0, 130.5		

ANNEXE 22

Annexe 22: Solution nutritive d'Hoagland

1. Solution de macronutriments

Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,0 mM
Sulfate de magnésium	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 mM
Nitrate de potassium	KNO_3	6,0 mM
Phosphate d'ammonium	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0 mM

La solution se conserve 2 semaines à 4°C à l'obscurité

2. Solution de micronutriments

Acide borique	H_3BO_3	28 g/L
Sulfate manganéux	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	34 g/L
Sulfate cuivrique	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
Sulfate de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,2 g/L
Molybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
Acide sulfurique	H_2SO_4 (conc.)	5,0 mL

La solution se conserve 3 mois à 4°C à l'obscurité.

3. Solution stock de fer

Acide éthylènediamine tétraacétique	EDTA	26,1 g
Eau distillée	dH ₂ O	286 mL
Hydroxyde de potassium	KOH	19,0 g
Dissoudre le KOH dans l'eau et ajouter l'EDTA		

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,9 g
H_2O	500 mL

Dissoudre le fer dans l'eau et ajouter lentement au premier mélange en agitant vigoureusement. Compléter le volume à 1 litre. Ajouter 2,5 mL de cette solution ferrique à la solution de micronutriments.

4. Ajouter 1,0 mL de la solution de micronutriments à 1 litre de la solution de macronutriments et ajuster le pH à 6,7.
5. Ajouter l'engrais fertilisant Plantex 10-52-10 à raison de 1,67 mL par litre de solution.

ANNEXE 23

Annexe 23: Résultats des analyses réalisées en spectrométrie de masse par le Dr. Orval Mamer et son équipe.

Étant donné la nature des expériences réalisées, la présence de Tween de même que de sodium a été observée dans tous les échantillons, rendant parfois difficile ou ambiguë l'analyse des résultats.

Tableau 1. Essai 3 de nutrition des tissus sur des broyats d'aiguilles de *T. canadensis* à l'aide de mévalonate (^{14}C) et de phénylalanine (^3H)

TAXANE CIBLE	M/Z ATTENDUE	M/Z OBSERVÉE
CEP	831	832 (m + H) 854 (m + Na)
DAB	543	544 (m + H)-
DHB	630	631 (m + H) 653 (m + Na)
TXL	853	854 (m + H) 876 (m + Na)

Tableau 2. . Essai 3 de nutrition des tissus sur des broyats d'aiguilles de *T. canadensis* à l'aide de glucose (^{14}C) et de phénylalanine (^3H)

TAXANE CIBLE	M/Z ATTENDUE	M/Z OBSERVÉE
CDN	594	-
CEP	831	832 (m + H) 854 (m + Na)
DAB	543	544 (m + H)-
DHB	630	653 (m + Na)
TXL	853	854 (m + H) 876 (m + Na)

Tableau 3. Essai de nutrition des tissus sur des boutures de *T. cuspidata* à l'aide de mévalonate (^{14}C) et de phénylalanine (^3H)

TAXANE CIBLE	M/Z ATTENDUE	M/Z OBSERVÉE
CEP	831	832 (m + H) 854 (m + Na)
DHB	630	631 (m + H)

TXL	853	854 (m + H) 876 (m + Na)
-----	-----	-----------------------------

Tableau 4. Essai de nutrition des tissus sur des boutures de *T. canadensis* à l'aide de mévalonate (^{14}C) et de phénylalanine (^3H)

TAXANE CIBLE	M/Z ATTENDUE	M/Z OBSERVÉE
CDN	594	-
CEP	831	832 (m + H) 854 (m + Na)
DAB	543	544 (m + H)-
DHB	630	653 (m + Na)
TXL	853	854 (m + H) 876 (m + Na)

Tableau 5. Essai de nutrition des tissus sur des boutures de *T. canadensis* à l'aide de glucose (^{14}C) et de phénylalanine (^3H)

TAXANE CIBLE	M/Z ATTENDUE	M/Z OBSERVÉE
CDN	594	-
CEP	831	832 (m + H) 854 (m + Na)
DAB	543	544 (m + H)-
DHB	630	653 (m + Na)
TXL	853	854 (m + H) 876 (m + Na)

Tableau 6. Essai de nutrition des tissus sur des boutures de *T. canadensis* à l'aide de acétate (^{14}C) et de phénylalanine (^3H)

TAXANE CIBLE	M/Z ATTENDUE	M/Z OBSERVÉE
CDN	594	-
CEP	831	832 (m + H) 854 (m + Na)
DAB	543	544 (m + H)-
DHB	630	653 (m + Na)
TXL	853	854 (m + H) 876 (m + Na)

BIBLIOGRAPHIE

1. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. 1996. An immobilized cell system for Taxol production. *CHEMTEC* **26**(3):41-45.
2. ANDO, M., SAKAI, J. I., ZHANG, S., WATANABE, Y., KOSUGI, K., SUZUKI, T., HAGIWARA, H. 1997. A new basic taxoid from *Taxus cuspidata*. *J. Nat. Prod.* **60**:499-501.
3. APPENDINO, G. 1995. The phytochemistry of the Yew tree. *Nat. Prod. Reports.* 349-360.
4. BACH, T. J. 1995. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants, a review. *Lipids.* **30**(3):191-202.
5. BALOGLU, E., KINGSTON, D. G. I. 1999. The taxanes diterpenoids. *J. Nat. Prod.* **62**:1448-1472.
6. BENTLEY, R. 1999. Secondary metabolites biosynthesis: The first century. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**(1):1-40.
7. BITSCH, F., MA, W., MACDONALD, F., NIEDER, M., SHACKLETON, C. H. L. 1993. Analysis of taxol and related diterpenoids from cell cultures by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatography* **615**:273-280.
8. BOGDAN, C., DING, A. 1992. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor α and interleukin-1 in macrophages. *J. Leuk. Biol.* **52**:119-121.
9. BOULANGER, Y., KHIAT, A., ZHOU, Z. H., CARON, G., ZAMIR, L. O. 1996. NMR and molecular modeling study of paclitaxel putative precursors. *Tetrahedron* **52**(27):8957-8968.
10. CASS, B. J., SCOTT, D. S., LEGGE, R. L. 1999. Determination of Taxane concentrations in *Taxus canadensis* clippings using high performance liquid chromatographic analysis with an internal standard. *Phytochem. Anal.* **10**:88-92.
11. CHATTOPADHYAY, S. K., KULSHRESTHA, M., TRIPATHI, V., SAHA, G. C., SHARMA, R. P., METHA, V. K. 1999. Studies on the Hymalayan yew *Taxus wallachiana*: Part VII- The taxoids and phenolic constituents of the roots of *Taxus wallachiana*. *Ind. J. Chem.* **38B**:701-704.
12. CHENG, K., FANG, W., YANG, Y., XU, H., MENG, C., KONG, M., HE, W., FANG, Q. 1996. C-14 oxygenated taxanes from *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Phytochem.* **42**(1):73-75.
13. CHOI, M. S., KWAK, S. S., LIU, J. R., PARK, Y. G., LEE, M. K., AN, N. H. 1995. Taxol and related compounds in Korean native yews (*Taxus cuspidata*). *Planta Med.* **61**:264-266.
14. CIDDI, V., SRINIVASAN, V., SHULER, M. L. 1995. Elicitation of *Taxus* sp. Cell cultures for production of Taxol. *Biotechnol. Letters.* **17**(12):1343-1346.
15. CREELMAN, A. R., MULLET, J. E. 1997. Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates : non traditionnal regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant cell.* **9**:1211-1223.
16. DAS, B., KASHINATHAM, A., ANJANI, G. 1999. Advances in contemporary research, Natural taxoids. *Ind. J. Chem.* **38B**:1018-1024.
17. DELLA CASA DE MERCANO, D. P., HALSALL, T.G. 1975. Structure of some taxane diterpenoids, baccatin III, IV, VI and VIII and I-dihydroxybaccatin IV, possessing an oxetane ring. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **365**

18. DING, A. H., PORTEU, F., SANCHEZ, E., NATHAN, C. F. 1990. Shared actions of endotoxins and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science* **248**:370-372.
19. DORRELL, S. 1998. Towards the biosynthesis of an alternative to Taxol. *Molecular Medicine Today*, Novembre p.460.
20. ELLIS, D. D., ZELDIN, E. L., BRODHAGEN, M., RUSSIN, W.A., MCCROWN, B. H. 1996. Taxol production in nodule cultures of *Taxus*. *J. Nat. Prod.* **59**(3):246-250.
21. ELISOHLY, H. N., CROOM, E. M., EL-KASHOURY, E., ELISOHLY, M. A., MCCHESENEY, J. D. 1994. Taxol content of stored fresh and dried *Taxus* clipping. *J. Nat. Prod.* **57**(7):1025-1028.
22. ELISOHLY, H. N., EL-KASHOURY, E. M., CROOM, J., ELISOHLY, M. A., COCHRAN, K. D., MCCHESENEY, J. D. 1995. Effect of drying *Taxus* needles on their Taxol content: the impact of drying intact clippings. *Planta Med.* **61**:290-291.
23. ELISOHLY, H. N., CROOM, J., EL-KASHOURY, E. A., JOSHI, A. S., KOPYCKI, W. J., MCCHESENEY, J. D. 1997. Effect of drying conditions on the taxane content of the needles of ornamental *Taxus*. *Planta Med.* **63**:83-85.
24. EISENREICH, W., MENHARD, B., HYLANDS, P. J., ZENK, M. H., BACHER, A. 1996. Studies on the biosynthesis of taxol : the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6431-6436.
25. FARMER, E. E., RYAN, C. A. 1990. Interplant communication : airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:7713-7716.
26. FETT-NETO, A. G., DICOSMO, F. 1992. Distribution and amounts of Taxol in different shoot parts of *Taxus cuspidata*. *Planta Med.* **58**:464-466.
27. FETT-NETO, A. G., DICOSMO, F., REYNOLDS, W. F., SAKATA, K. 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Biotechnology* **10**:1572-1575.
28. FETT-NETO, A. G., MELANSON, S. J., NICHOLSON, S. A., PENNINGTON, J. J., DICOSMO, F. 1994. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioengineering* **44**(8):967-971.
29. FETT-NETO, A. G., ZHANG, W. Y., DICOSMO, F. 1994. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioengineering* **44**(2):205-210.
30. FETT-NETO, A. G., MELANSON, S. J., SAKATA, K., DICOSMO, F. 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Biotechnology* **11**:731-734.
31. FISHER, R., EMANS, N., SCHUSTER, F., HELLWIG, S., DROSSARD, J. 1999. Review. Towards molecular farming in the futur: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:109-112.
32. FLEMMING, P. E., MOCEK, U., FLOSS, H. G. 1993. Biosynthesis of taxoids. Mode of formation of the taxol side chain. *Am. Chem. Soc.* **115**(2):805-807.
33. FLEMMING, P. E., FLOSS, H. G., HAERTEL, M., KNAGGS, A. R., LANSING, A., MOCEK, M., WALKER, K. D. 1994. Biosynthetic studies on taxol. *Pure Appl. Chem.* **66**(10-11):2045-2048.

34. FLEMMING, P. E., KNAGGS, A. R., HE, X.-G., MOCEK, U., FLOSS, H. G. 1994. Biosynthesis of taxoids. Mode of attachment of the taxol side chain. *J. Am. Chem. Soc.* **116**(9):4137-4138.
35. FRÈRE MARIE-VICTORIN. 1995. Flore Laurentienne. Troisième édition, Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, pp.137-138.
36. FLOSS, H. G. 1997. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Nat. Prod. Report.* **14**(5):433-452.
37. FLOSS, H. G., MOCEK, U. 1995. Biosynthesis of taxol. *Taxol :Science and application (chapitre 7)* pp.191-207.
38. GUÉNARD, D., GUÉRITTE-VOEGELEIN, F., POTIER, P. 1993. Taxol and Taxotère: discovery, chemistry and structure-activity relationships. *Acc. Chem. Res.* **26**(4):160-167.
39. GUÉRITTE-VOEGELEIN, F., GUÉNARD, D., DUBOIS, J., WAHL, A., POTIER, P. 1994. Recherches chimiques et biologiques autour du Taxol® (paclitaxel et du Taxotère® (Docetaxel), nouveaux agents antitumoraux. *J. Pharm. Belg.* **49**(3):193-205.
40. GUÉRITTE-VOEGELEIN, F., GUÉNARD, D., POTIER, P. 1987. Taxol derivatives : a biogenetic hypothesis. *J. Nat. Prod.* **50**(1):9-18.
41. GUNAWARDANA, G. P., PREMACHANDRAN, U., BURREN, N. S., WHITTERN, D. N., HENRY, R., SPANTON, S., MCALPINE, J. B. 1992. Isolation of 9-dihydro-13-acetylbaccatin III from *Taxus canadensis*. *J. Nat. Prod.* **55**(11):1686-1689.
42. HEFNER, J., RUBENSTEIN, S. M., KETCHUM, R. E. B., GIBSON, D. M., WILLIAMS, R. M., CROTEAU, R. 1996. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem. Biol.* **3**(6):479-489.
43. HEFNER, J., KETCHUM, R. E. B., CROTEAU, R. 1998. Cloning and functional expression of cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. *Arch. Biochem. Biophys.* **360**(1):62-74.
44. HEINSTEIN, P. F., CHANG, C.-J. 1994. Taxol. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**:663-674.
45. HEINSTEIN, P., ZHOU, J. Y., WANG, M., LIU, Y. C., CHEN, X. Y., CHEN, D., HOKE, S. H., GRAHAM COOKS, R., CHANG, C. J. 1996. Taxol and taxanes formation in plant cell culture. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*:845-851.
46. HEZARI, M., CROTEAU, R. 1997. Taxol biosynthesis: An update. *Planta. Med.* **63**:291-295.
47. HEZARI, M., KETCHUM, R. E. B., GIBSON, D. M., CROTEAU, R. 1997. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**(2):185-190.
48. HOLTON, R. A., SOMOZA, C., KIM, H. B., LIANG, F., BIEDIGER, R. J., BOATMAN, P. D., SHINDO, M., SMITH, C. C., KIM, S., NADISADEH, H., SUZUKI, Y., TAO, C., VU, P., TANG, S., ZHANG, P., MURTHI, K. K., GENTILE, L. N., LIU, J. H. 1994. First total synthesis of Taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J. Am. Chem. Soc.* **116**:1597-1598.

49. HORWITZ, S. B. 1994. Taxol (paclitaxel): Mechanisms of action. *Ann. Oncol.* **5**(6):S3-S6.
50. HORWITZ, S. B., LOTHSTEIN, L., MANFREDI, J. J., MELLADO, W., PARNES, J., ROY, S. N., SCHIFF, P. B., SORBARA, L., ZEHEB, R. 1993. Taxol : Mechanisms of action and resistance. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **15**:55-61.
51. HUANG, K. X., HUANG, Q. L., WILDUNG, M. R., CROTEAU, R. SCOTT, A. I. 1998. Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the Taxol biosynthetic pathway. *Protein Expression and Purification.* **13**:90-96.
52. KAPOOR, V. K., MAHINDROO, N. 1997. Recent advances in structure modifications of Taxol (Paclitaxel). *Ind. J. Chem.* **36B**:639-652.
53. KELLOGG, B. A., POULTER, C.D. 1997. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**:570-578.
54. KETCHUM, R. E. B., GIBSON, D. M., CROTEAU, R. B., SHULER, M. L. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol. Bioengineering* **62**(1):97-105.
55. KIM, J. H., YUN, J. H., HWANG, Y. S., BYUN, S. Y., KIM, D. I. 1995. Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar. *Biotechnol. Lett.* **17**(1):101-106.
56. KIRIKAE, T., OJIMA, I., MA, Z., KIRIKAE, F., HIRAI, Y., NAKANO, M. 1998. Structural significance of the benzoyl group at the C-3'-N position of paclitaxel for nitric acid oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages. *Biochemical and Biophysical research communication.* **245**(3):698-704.
57. KINGSTON, D. G. I., 1994. Taxol: the chemistry and structure-activity relationship of a novel anticancer agent. *Trends Biotechnol.* **12**(6):222-227.
58. KOBAYASHI, J., HOSOYAMA, H., SHIGEMORI, H., KOISO, Y., IWASAKI, S. 1995. Taxuspine D, a new taxane diterpene from *Taxus cuspidata* with potent inhibitory activity against Ca^{2+} -induced depolymerization of microtubules. *Experientia* **51**:592-595.
59. KOBAYASHI, J., INUBISHI, A., HOSOYAMA, H., YOSHIDA, N., SASAKI, T., SHIGEMORI, H. 1995. Taxuspines E-H and J, new taxoids from the Japanese yew *Taxus cuspidata*. *Tetrahedron* **51**(21):5971-5978.
60. KOEPP, A. E., HEZARI, M., ZAJICEK, J., STOFER VOGEL, B., LAFEVER, R. E., LEWIS, N. G., CROTEAU, R. 1995. Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5),11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific Yew. *J. Biol. Chem.* **270**(15):8686-8690.
61. KRIBII, R., SOUSTRE, I., KARST, F. 1999. Biosynthèse des isoprénoides. *Acta. Bot. Gall.* **146**(1):5-24.
62. KRIS, M. G., O'CONNEL, J. P., GRALLA, R. J., WERTHEIM, M. S., PARENTE, R. M., SCHIFF, P. B., YOUNG, C. W. 1986. Phase I trial of Taxol given as 3-hour infusion every 21 days. *Cancer Treat. Rep.* **70**(5) :605-607.
63. LANSING, A., HAERTEL, M., GORDON, M., FLOSS, H. G. 1991. Biosynthetic studies on Taxol. *Planta Med.* **57** supplement issue 2:A83.
64. LASKARIS, G., DEJONG, C. F., JAZIRI, M., VAN DER HEIJDEN, R., THEODORIDIS, G., VERPOORTE, R. 1999. Geranylgeranyl diphosphate synthase activity and taxane production in *Taxus baccata* cells. *Phytochem.* **50**:939-946.

65. LEETE, E. 1983. Biosynthesis of cocaine and cuscohygrine from [1-¹⁴C]Acetate and [4-³H]Phenylalanine in *Erythroxylon coca*. *Phytochem.* **22**(3):699-704.
66. LEETE, E. 1990. Biogenesis of taxanes: hypotheses. *Planta Med.* **56**:339-354.
67. LEETE, E., BODEM, G. B. 1966. The biosynthesis of 3-dimethylamino-3-phenylpropanoic acid in yew. *Tetrahedron Lett.* 3925-3955.
68. LI, J. Y., STROBEL, G., SIDHU, R., HESS, W. M., FORD, E. J. 1996. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology* **142**:2223-2226.
69. LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., DISCH, A., ROHMER, M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway. *FEBS Letters.* **400**:271-274.
70. LICHTENTHALER, H. K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **50**:47-65.
71. LIN, X., HEZARI, M., KOEPP, A. E., FLOSS, H. G., CROTEAU, R. 1996. Mechanism of Taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *Biochemistry* **35**(9):2968-2977.
72. LONG, B. H., CARBONI, J. M., WASSERMAN, A. J., CORNELL, L. A., CASAZZA, A. M., JENSEN, P. R., LINDEL, T., FENICAL, W., FAIRCHILD, C. R. 1998. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res.* **58**:1111-1115.
73. LYNEN, F. 1967. Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure Appl. Chem.* **14**(1):137-167.
74. MASTERS, J. J., LINK, J. T., SNYDER, L. B., YOUNG, W. B., DANISHEFSKY, S. J. 1995. A total synthesis of taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**(16):1723-1726.
75. MCGARVEY, D. J., CROTEAU, R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* **7**:1015-1026.
76. MENHARD, B., ZENK, M.H. 1999. Purification and characterization of acetyl coenzyme A: 10-hydroxytaxane O-acetyltransferase from cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Phytochem.* **50**:763-774.
77. MILLER, R. W. 1980. A brief survey of *Taxus* alkaloids and other taxane derivatives. *J. Nat. Prod.* **43**(3):425-437.
78. MIRJALILI, N., LINDEN, J. C. 1996. Methyl jasmonate induced production of Taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models. *Biotechnol. Prog.* **12**(1):110-118.
79. MONACELLI, B., PASQUA, G., CUTERI, A., VARUSIO, A., BOTTA, B., DELLE MONACHE, G. 1995. Histological study of callus formation and optimization of cell growth in *Taxus baccata*. *Cytobios* **81**:159-170.
80. MORITA, H., GONDA, A., WEI, L., YAMAMURA, Y., TAKEYA, K., ITOKAWA, H. 1997. Taxuspinananes A and 8 new taxoids from *Taxus cuspidata* var. *nana*. *J. Nat. Prod.* **60**(4):390-392.
81. MORITA, H., WEI, L., GONDA, A., TAKEYA, K., ITOKAWA, H. 1997. A taxoid from *Taxus cuspidata* var. *nana*. *Phytochem.* **46**(3):583-586.
82. MURAKAMI, R., SHI, Q. W., HORIGUCHI, T., ORITANI, T. 1999. A novel rearranged taxoid from needles of the Japanese yew, *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**(9):1660-1663.

83. NOH, M. J., YANG, J. G., KIM, K. S., YOON, Y. M., KANG, K. A., HAN, H. Y., SHIM, S. B., PARK, H. J. 1999. Isolation of a novel microorganism, *Pestalotia heterocornis* producing Paclitaxel. *Biotechnol. Bioeng.* **64**(5):620-623.
84. NICOLAOU, K. C., GUY, R. K., POTIER, P. 1996. Taxoids : new weapons against cancer. *Scientific American* June:94-98.
85. NICOLAOU, K. C., YANG, Z., LIU, J. J., UENO, H., NANTERMET, P. G., GUY, R. K., CLAIBORNE, C. F., RENAUD, J., COULADOUROS, E. A., PAULVANNAN, K., E. J. SORENSEN. 1994. Total synthesis of Taxol. *Nature* **367**:630-634.
86. NICOLAOU, K. C., NANTERMET, P. G., UENO, H., GUY, R. K., COULADROS, E. A., SORENSEN, E. J. 1995. Total synthesis of Taxol 1" Retrosynthesis, degradation and reconstitution. *J. Am. Chem. Soc.* **117**(2):624-633.
87. NICOLAOU, K. C., YANG, Z., LIU, J. J., NANTERMET, P. G., CLAIBORNE, C. F., RENAUD, J., GUY, R. K., SHIBAYAMA, K. 1995. Total synthesis of Taxol 3. Formation of taxol's ABC ring skeleton. *J. Am. Chem. Soc.* **117**(2):645-652.
88. O'BRIEN, J. M., WEWERS, M. D., MOORE, S. A., ALLEN, J. N. 1995. Taxol and colchicine increase LPS-Induced Pro-IL-1 β production, but do not increase IL-1 β secretion. A role for microtubules in the regulation of IL-1 β production. *J. Immunol.* **154**(8):4113-4122.
89. PARMAR, V. S., JHA, A., BISHT, K. S., TANEJA, P., SINGH, S. K., KUMAR, A., JAIN, R., OLSEN, C. E. 1999. Constituents of the yew trees. *Phytochem.* **50**:1267-1304.
90. PATEL, R. N. 1998. Tour de Paclitaxel: Biocatalysis for semisynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* **98**:361-395.
91. PESTCHANKER, L. J., ROBERTS, S. C., SHULER, M. L. 1996. Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* **19**:256-260.
92. PEZZUTO, J. 1996. Taxol production in plant cell culture comes of age. *Nature Biotechnol.* **14**:1083.
93. PHISALAPHONG, M., LINDEN, J. C. 1999. Kinetic studies of paclitaxel production by *Taxus canadensis* cultures in batch and semicontinuous with total cell recycle. *Biotechnol. Prog.* **15**:1072-1077.
94. RAO, K. V., BHAKUNI, R. S., JUCHUM, J., DAVIES, R. M. 1996. A large scale process for paclitaxel and other taxanes from the needles of *Taxus media hicksii* and *Taxus floridana* using a reverse phase column chromatography. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **19**(3):427-447.
95. RINGEL, I., HORWITZ, S. B. 1987. Taxol is converted to 7-epitaxol, a biologically active isomer, in cell culture medium. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics.* **242**(2):692-698.
96. RIZZO, J., RILEY, C., VON HOFF, D., KHUN, J., PHILLIPS, J., BROWN, T. 1990. Analysis of anticancer drugs in biological fluids : determination of Taxol with application to clinical pharmacokinetics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**(2) :159-164.
97. ROBERTS, S. C., SHULER, M. L. 1997. Large-scale plant cell culture. *Curr. Opinion Biotechnol.* **8**:154-159.

98. RODI, D. J., JANES, R. W., SANGANEE, H. J., HOLTON, R. A., WALLACE, B. A., MAKOWSKI, L. 1999. Screening of a library of Phage-displayed peptides identifies human Bcl-2 as a Taxol-binding protein. *J. Mol. Biol.* **285**:197-203.
99. ROHMER, M. 1998. Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs. *Prog. Drug. Res.* **59**:135-154.
100. ROHMER, M. 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoids biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**:565-574.
101. ROHMER, M., KNANI, M., SIMONIN, P., SUTTER, B., SAHM, H. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**:517-524.
102. ROHR, J. 1997. Biosynthesis of Taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**(20):2190-2195.
103. ROWINSKI, E. K., DONEHIWER, R. C., JONES, R. J., TUCKER, R. W. 1988. Microtubule changes in cytotoxicity in leukemic cell lines treated with Taxol. *Cancer Res.* **48**(14):4093-4100.
104. ROWINSKI, E. K. 1994. Update on the antitumor activity of paclitaxel in clinical trials. *Ann. Pharmacol.* **28**:S18-S22.
105. RUBENSTEIN, S. M., WILLIAMS, R.M. 1995. Studies on the biosynthesis of Taxol: Total synthesis of taxa-4(20),11(12)-diene and taxa-4(5),11(12)-diene. The first committed biosynthetic intermediate. *J. Org. Chem.* **60**(22):7215-7223.
106. SCHWENDER, J., SEEMANN, M., LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M. 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chain of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* **316**:73-80.
107. SCHIFF, P. B., FANT, J., HORWITZ, S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* **227**:665-667.
108. SCHULER, M. L. 1994. Bioreactor engineering as an enabling technology to tap biodiversity: the case of taxol. *Ann. NY Acad. Sci.* **30**(745):455-461.
109. SEKI, M., OHZORA, C., TAKEDA, M., FURUSAKI, S. 1996. Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioengineering* **53**:214-219.
110. SEMBDNER, G., PARTHIER, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**:569-589.
111. SERVICE, R. F. 2000. Hazel trees offer new source of cancer drug. *Science* **288**:27-28.
112. SETO, H., WATANABE, H., FURIHATA, K. 1996. Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioovifer*. *Tetrahedron Letters*. **37**(44):7979-7982.
113. SHEN, Y. C., TAI, H. R., CHEN, C. Y. 1996. New taxane diterpenoids from the roots of *Taxus mairei*. *J. Nat. Prod.* **59**:173-176.
114. SHEN, Y. C., CHEN, C. Y., CHEN, Y. J. 1999. Taxumairol M: A new bicyclic taxoid from seeds of *Taxus mairei*. *Planta Med.* **65**:582-584.

115. SHI, Q. W., ORITANI, T., SUGIYAMA, T., MURAKAMI, R., WEI, H. Q. 1999. Six new taxane diterpenoids from the seeds of *Taxus chinensis* var. *mairei* and *Taxus yunnanensis*. J. Nat. Prod. **62**:1114-1118.
116. SHI, Q. W., ORITANI, T., SUGIYAMA, T. 1999. Three novel bicyclic taxane diterpenoids with verticillene skeleton from the needles of chinese yew, *Taxus chinensis* var. *maiei*. Planta Med. **65**:356-359.
117. SHI, Q. W., ORITANI, T., SUGIYAMA, T., KIYOTA, H., HORIGUCHI, T. 1999 Three new rearranged taxane diterpenoids from the bark of *Taxus chinensis* var. *mairei* and the needles of *Taxus cuspidata*. Heterocycles **51**(4):841-850.
118. SHI, Q. W., ORITANI, T., SUGIYAMA, T., HORIGUCHI, T., MURAKAMI, R., ZHAO, D., ORITANI, T. 1999. Three new taxane diterpenoids from seeds of *Taxus yunnanensis* Cheng. et L. K. and *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. Tetrahedron **55**:8365-8376.
119. SHIGEMORI, H., SAKURAI, C. A., HOSOYAMA, H., KOBAYASHI, A., KAJIYAMA, S., KOBAYASHI, J. 1999. Taxezopidines J, K and L, new taxoids from *Taxus cuspidata* inhibiting Ca^{2+} -induced depolymerization of microtubules. Tetrahedron **55**:2553-2558.
120. SHIGEMORI, H., WANG, X. X., YOSHIDA, N., KOBAYASHI, J. 1997. Taxuspines X-Z, New taxoids from japanese yew *Taxus cuspidata*. Chem. Pharm. Bull. **45**(7):1205-1208.
121. SHU, Y. Z. 1998. Recent natural products based drug developpment: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod. **61**(8):1053-1071.
122. SPENCER, C. M., FAULDS, D. 1994. Pacltaxel, a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. Drugs **48**(5):794-847.
123. SRINIVASAN RAO, C., CIDDI, V., BRINGI, V., SCHULER, M. L. 1996. Metabolic inhibitors, elicitors and precursors as tools for probing yield limitation in taxanes production by *Taxus chinensis* cell cultures. Technol. Prog. **12**(4):457-465.
124. STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. 1993. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science **260**:214-216.
125. STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., GROTHAUS, P., BIGNAMI, G. 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. J. Nat. Prod. **58**(9):1315-1324.
126. STÖCKIGT, J., OBITZ, P., FALKENHAGEN, H., LUTTERBACH, R., ENDREß, S. 1995. Natural products and enzymes from plants cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **43**: 97-109.
127. STROBEL, G. A., STIERLE, A., VAN KUIJK, F. J. G. M. 1992. Factors influencing in vitro production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia*. Plant Science **84**:65-74.
128. STROBEL., G. A., STIERLE, A., HESS, W. M. 1993. Taxol formation in yew-*Taxus*. Plant Science **92**:1-12.
129. STROBEL, G., YANG, X., SEARS, J., KRAMER, R., SIDHU, R. S., HESS, W. M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology **142**:435-440.

130. TONG, X. J., FANG, W. S., ZHOU, J. Y., HE, C. H., CHEN, W. M., FANG, Q. C. 1995. Three new taxane diterpenoids from needles and stems of *Taxus cuspidata*. J. Nat. Prod. **58**(2):233-238.
131. TORREGIANI, E., RAFAIANI, G., BARBONI, L., APENDINO, G. 1995. A serendipitous clue to the biogenesis of taxchins. Tetrahedron Letters **36**(39):7127-7128.
132. ULRICH WENDT, K., SCHULTZ, G. E., 1998. Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. Structure. **6**:127-133.
133. VANCE, N. C., KELSEY, R. G., SABIN, T. E. 1994. Seasonal and tissue variation in taxane concentration of *Taxus brevifolia*. Phytochemistry **36**(5):1241-1244.
134. VANEK, T., MALA, J., SAMAN, D., SILHAVA, I. 1999. Production of taxanes in a bioreactor by *Taxus baccata* cells. Planta Med. **65**:275-277.
135. VAN ROZENDAL, E. L. M., KURSTJENS, S. J. L., VAN BEEK, T. A., VAN DEN BERG, R. G. 1999. Chemotaxonomy of *Taxus*. Phytochem. **52**:427-433.
136. VAN ROZENDAL, E. L. M., LELYVELD, G. P., VANBEEK, T. A. 2000. Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. Phytochem. **53**:383-389.
137. VIDENSEK, N., LIM, P., CAMPBELL, A., CARLSON, C. 1990. Taxol content in bark, root, leaf, twig and seedling from several *Taxus* species. J. Nat Prod. **53**(6):1609-1610.
138. WALKER, K., CROTEAU, R. 1999. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-*O*-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sc. **97**(2):583-587.
139. WALKER, K., KETCHUM, R. E. B., HEZARI, M., GATFIELD, D., GOLENIOWSKI, M., BARTHOL, A., CROTEAU, R. 1999. Partial purification of acetyl coenzyme A : taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol *O*-Acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. **364**(2):273-279.
140. WALKER, D. G., STANDRIDGE, R.T., SWIGOR, J. E. 1994. Synthesis of paclitaxel-C3'-¹⁴C. J. of labelled compounds and radiopharmaceuticals **36**(5):479-492.
141. WANG, X. X., SHIGEMORI, H., KOBAYASHI, J. 1997. Taxezopidine A, a novel taxoid from seeds of Japanese Yew *Taxus cuspidata*. Tetrahedron Lett. **38**(43):7587-7588.
142. WANG, H. Q., YU, J. T., ZHONG, J. J. 2000. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy. Proc. Biochem. **35**:479-483.
143. WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P., McPHAIL, A. T. 1971. J. Am. Chem. Soc. **93**:2325-2327.
144. WHEELER, N. C., JECH, K., MASTERS, S. 1992. Effects of genetic, epigenetic and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. J. Nat. Prod. **55**(4):432-440.
145. WIERNIK, P. H., SCHWARTZ, E. L., STRAUMAN, J. J., DUTCHER, J. P., LIPTON, R. B., PAIETTA, E. 1987. Phase I clinical and pharmacokinetics study of Taxol. Cancer Res. **47**(9) :2486-2493.

146. WITHERUP, K. M., LOOK, S. A., STASKO, M. W., GHJORZI, T. J., MUSCHIK, G. M., CRAGG, G. M. 1990. *Taxus* spp. Needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia* : analysis and isolation. *J. Nat. Prod.* **53**(5):1249-1255.
147. WU, J. H., ZAMIR, L. O. 2000. A rational design of bioactive taxanes with side chains situated elsewhere than on C-13. *Anti-Cancer Drug Design* **15**(1):73-78.
148. YUKIMUNE, Y., TABATA, H., HIGASHI, Y., HARA, Y. 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnol.* **14**:1129-1132.
149. ZAMIR, L. O., DEVOR, K. A., NADEAU, Y., SAURIOL, F. 1987. Structure determination and biosynthesis of a novel metabolites of *Ipsum culmorum*, apotrichodiol. *J. Biol. Chem.* **262**(32):15354-15358.
150. ZAMIR, L. O., NEDEA, M. E., GARNEAU, F. X. 1992. Biosynthetic building blocs of *Taxus canadensis* taxanes. *Tetrahedron lett.* **33**(36):5235-5236.
151. ZAMIR, L. O., NEDEA, M. E., ZHOU, Z. H., CARON, G., SAURIOL, F., MAMER, O. 1996 Isolation and semi-synthesis of a bioactive taxane from *Taxus canadensis*. *Phytochem.* **41**(3):803-805.
152. ZAMIR, L.O., ZHOU, Z. H., CARON, G., NEDEA, M. E., SAURIOL, F., MAMER, O. 1995. Isolation of a putative biogenetic precursor from *Taxus canadensis* needles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 529-530.
153. ZAMIR, L. O., NEDEA, M. E., ZHOU, Z. H., BÉLAIR, S., CARON, G., SAURIOL, F., JACQUMAIN, E., JEAN, F. I., GARNEAUX, F. X., MAMER, O. 1995. *Taxus canadensis* taxanes: structures and stereochemistry. *Can. J. Chem.* **73**:655-665.
154. ZAMIR, L. O., ZHANG, J., KUTTERER, K., SAURIOL, F., MAMER, O., KHIAT, A. BOULANGER, Y. 1998. 5-epi-canadensene and other novel metabolites of *Taxus canadensis*. *Tetrahedron* **54**:15845-15860.
155. ZAMIR, L. O., ZHANG, J., WU, J.H., SAURIOL, F. ET MAMER, O. 1999. Novel taxanes from the needles of *Taxus canadensis*. *Tetrahedron* **55**:14323-14340.
156. ZAMIR, L. O., ZHANG, J., WU, J., SAURIOL, F., MAMER, O. 1999. Five novel taxanes from *Taxus canadensis*. *J. Nat. Prod.* **62**:1268-1273.
157. ZAMIR, L. O., MAMER, O., SAURIOL, F., CHERESTES, A., CARON, G., NIKOLAKAKIS, A. 2000. *Taxus canadensis* abundant taxane :conversion to paclitaxel and rearrangements. *Bioorg. Med. Chem.* **8**(6):1269-1280.
158. ZHANG, S., CHEN, W. M., CHEN, Y. H. 1992. Isolation and identification of two new taxane diterpenes from *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. *Yao Hsueh Hsueh Pao* **27**(4):268-272.
159. ZHANG, J., SAURIOL, F., MAMER, O., ZAMIR, L. O. 2000. Taxoids from the needles of the Canadian yew. *Phytochem.* **54**:221-230.
160. ZHANG, J., SAURIOL, F., MAMER, O., ZAMIR, L. O. 2000. New taxanes from the needles of *Taxus canadensis*. *J. Nat. Prod.* **63**:929-933.
161. ZHIRI, A. JAZIRI, M., GUO, Y., VANHAELAN-FASTRÉ, R., VANHAELAN, M., HOMES, J., YOSHIMATSU, K., SHIMOMURA, K. 1995. Tissue cultures of *Taxus baccata* as a source of 10-deacetylbaaccatin III, a precursor for the hemisynthesis of Taxol. *Biol. Chem.* **376**:583-586.

162. ZOCHER, R., WECKEWERTH, W., HACKER, C., KAMMER, B., HORNBOGEN, T., EWALD, D. 1996. Biosynthesis of taxol : enzymatic acetylation of 10-deacetylbaccatin-III to baccatin-III in crude extract from roots of *Taxus baccata*. Biochemical and Biophysical research communication **229**(1):16-20.