

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

SOPHIE BÉLAIR

ISOLEMENT DE NOUVEAUX TAXANES ET BIOSYNTHÈSE DU TAXOL

JUIN 1995

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE D'ABRÉVIATIONS	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
SOMMAIRE	X
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. INTRODUCTION	6
2. CLASSIFICATION	10
3. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE	33
3.1 HISTORIQUE	33
3.2 LE TAXOL: UN AGENT ANTIMICROTUBULAIRE	34
3.2.1 ÉTAPES DE LA MITOSE	35
3.2.2 ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU TAXOL	37
4. BIOSYNTHÈSE DES TAXANES	39
4.1 BIOGÉNÈSE DES TAXANES	39
4.2 BIOSYNTHÈSE DES TAXANES	40
4.2.1 BIOSYNTHÈSE DU NOYAU DITERPENE	40
4.2.2 BIOSYNTHÈSE DE LA CHAÎNE LATÉRALE	41
5. TECHNIQUE DE "KINETIC PULSE LABELLING"	50
METHODOLOGIE	53
1. ISOLEMENT DE NOUVEAUX TAXANES	54
1.1 PLANTES UTILISÉES	54
1.2 EXTRACTION DES TAXANES	54
1.2.1 MÉTHODE NO.1	54
1.2.2 MÉTHODE NO.2	54
1.3 ÉLIMINATION DES LIPIDES	55
1.4 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	56
1.4.1 MÉTHODE NO.1	56
1.4.2 MÉTHODE NO.2	57
1.5 SÉPARATION ET PURIFICATION PAR CLHP	58
1.6 LYOPHILISATION	59

1.7	CARACTÉRISATION	60
2.	TECHNIQUE DE "KINETIC PULSE LABELLING"	61
2.1	TECHNIQUE DE "KPL" UTILISANT UNE PRÉPARATION D'AIGUILLES BROYÉES	61
2.1.1	PLANTES UTILISÉES	61
2.2.2	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	62
2.1.2.1	PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'HOAGLAND	62
2.1.2.2	CALCUL DE LA RADIOACTIVITÉ À AJOUTER DANS LES ÉCHANTILLONS	64
2.1.3	L'ÉCHANTILLONNAGE	68
2.1.4	EXTRACTION DES TAXANES	68
2.1.5	ÉLIMINATION DES SELS	69
2.1.6	ANALYSE PAR CLHP	70
2.1.7	MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ	70
2.1.7.1	COURBE DE CONVERSION DES CPM EN DPM POUR LE TRITIUM (³ H)	72
2.1.7.2	CONVERSION DES CPM EN DPM	75
2.2	TECHNIQUE DE "KPL" UTILISANT UN HOMOGENAT	77
2.2.1	PLANTES UTILISÉES	77
2.2.2	PRÉPARATION DE L'HOMOGENAT	77
2.2.3	AJOUT DU PRÉCURSEUR RADIOACTIF	79
2.2.4	L'ÉCHANTILLONNAGE	79
2.2.5	EXTRACTION DES TAXANES	80
2.2.6	ANALYSE PAR CLHP	80
2.2.7	MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ	80
3.	ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON PRÉLEVÉ AU TEMPS 5 HEURES	81
3.1	INJECTION DE L'ÉCHANTILLON 2 (L'EXTRAIT 5H DUPLICATA) AVEC DES STANDARDS	81
3.2	INJECTION DE L'ÉCHANTILLON 1 (5H) ACÉTYLÉ AVEC DES STANDARDS ACÉTYLÉS	82
3.2.1	RÉACTIVITÉ DU TAXOL ET DES TAXANES À L'ACÉTYLATION	82
3.2.1	ACÉTYLATION DES STANDARDS	82
3.2.3	ACÉTYLATION DE L'ÉCHANTILLON 1 (5H)	83
3.2.4	ANALYSE PAR CLHP	83
RÉSULTATS	85
1.	ISOLEMENT ET PURIFICATION DES TAXANES	86
1.1	7,9 DEACETYLBACCATIN VI	86
1.2	1 β -HYDROXY 7,9-DEACETYLBACCATIN I	89
1.3	7-EPI TAXOL	90
2.	ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA BIOSYNTHÈSE DU TAXOL	92
2.1	TECHNIQUE DE "KPL" UTILISANT DES PLANTES BROYÉES	92
2.2	TECHNIQUE DE "KPL" UTILISANT UN HOMOGENAT	95
2.3	POURCENTAGE D'INCORPORATION DANS LE PIC DU TAXOL	101

2.4	ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE DU TAXOL EN UTILISANT LA PHÉNYLALANINE COMME PRÉCURSEUR	102
3.	ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS AU TEMPS 5 HEURES	104
3.1	INJECTION DE L'ÉCHANTILLON 2 (5HD) AVEC DES STANDARDS	105
3.2	INJECTION DE L'ÉCHANTILLON 1(5H) ACÉTYLÉ	109
	DISCUSSION	115
1.	ISOLEMENT ET PURIFICATION DE NOUVEAUX TAXANES	116
2.	ÉTUDE DE BIOSYNTHÈSE	119
2.1	CHOIX DE LA MÉTHODE POUR L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE	119
2.2	POURCENTAGES D'INCORPORATION	119
2.3	"KINETIC PULSE LABELLING"	120
2.4	ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS AU TEMPS 5 HEURES	122
3.	VOIES D'AVENIR	125
	CONCLUSION	126
	REMERCIEMENTS	129
	BIBLIOGRAPHIE	131

LISTE D'ABRÉVIATIONS

CLHP:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CPM:	Counts per minute .
DPM:	Desintegrations per minute
KPL:	Kinetic Pulse Labelling
GTP:	Guanosine triphosphate
IPP:	Isopentény-pyrophosphate
3-ADN:	3-Acétyl-deoxynivalénol
MeOH:	Méthanol
H ₂ O:	Eau
CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
RMN:	Résonance Magnétique Nucléaire
MS:	Spectométrie de Masse
EtAc:	Acétate d'éthyle
DTT:	Dithiothréitol
ESR:	External Standard Ratio
EtOH:	Ethanol
C ³ H ₃ COONa:	Acétate marqué au tritium
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O:	Nitrate de calcium
MgSO ₄ .7H ₂ O:	Sulfate de magnésium
KNO ₃ :	Nitrate de potassium
NH ₄ H ₂ PO ₄ :	Phosphate d'ammonium
EDTA:	Ethylène Diamine Tetraacetic Acid
H ₃ BO ₃ :	Acide borique
MnSO ₄ .H ₂ O:	Sulfate de manganèse
CuSO ₄ .5H ₂ O:	Sulfate cuprique
ZnSO ₄ .7H ₂ O:	Sulfate de zinc
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O:	Molybdate d'ammonium
H ₂ SO ₄ :	Acide sulfurique
PVP:	Polyvinyl pyrrolidar
KH ₂ PO ₄ :	Phosphate de potassium
Na ₂ B ₄ O ₇ :	Borate de sodium

LISTE DES TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU 1	Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20)	11
TABLEAU 2	Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et une chaîne de Winterstein en C-5	14
TABLEAU 3	Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et une chaîne cinnamoyle en C-5	16
TABLEAU 4	Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et un double lien en C-10	19
TABLEAU 5	Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et un pont oxido en C-12(16)	20
TABLEAU 6	Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et un pont entre C-3 et C-11	21
TABLEAU 7	Taxanes possédant un époxyde en C-4(20)	23
TABLEAU 8	Taxanes possédant un époxyde en C-4(20) et une chaîne latérale en C-5	24
TABLEAU 9	Taxanes possédant un cycle oxétane	26
TABLEAU 10	Taxanes possédant un cycle oxétane et une chaîne latérale en C-13	28
TABLEAU 11	Taxanes possédant un cycle pré-oxétane	30
TABLEAU 12	Taxanes possédant une double liaison endocyclique entre C-4 et C-20	32

RÉSULTATS

TABLEAU 13	Radioactivité mesurée dans les trois échantillons	93
------------	---	----

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 1	Squelette-type de taxane	2
FIGURE 2	Structure chimique du taxol	2
FIGURE 3	Structure chimique du composé 10-deacétylbaccatin III	7
FIGURE 4	Structure chimique du taxotère	8
FIGURE 5	Le cycle de la mitose	36
FIGURE 6	Les voies métaboliques des produits naturels (78)	43
FIGURE 7	Biogénèse des terpènes (79)	44
FIGURE 8	Schéma de la biogénèse des taxanes	45
FIGURE 9	La biogénèse des taxanes selon Potier (12)	46
FIGURE 10	Hypothèse sur la formation des taxanes A, B et C (12)	47
FIGURE 11	Biogénèse du cycle oxétane selon Halsall (59)	48
FIGURE 12	Transformation de la phénylalanine en acide de Winterstein (88)	48
FIGURE 13	Biosynthèse des taxanes (81)	48
FIGURE 14	Hypothèse des deux voies métaboliques menant à la formation du taxol	49
FIGURE 15	Etude de biosynthèse du composé 3-ADN dans <u>Fusarium culmorum</u> , effectué à l'aide de la technique de "Kinetic Pulse Labelling" (92)	52

MÉTHODOLOGIE

FIGURE 16	Courbe standard du tritium	73
-----------	----------------------------	----

RÉSULTATS

FIGURE 17	Structure chimique du composé 7,9 deacetylbaccatin VI	86
-----------	---	----

FIGURE 18	Chromatogramme de l'extrait de <u>Taxus canadensis</u> par CLHP analytique	88
FIGURE 19	Structure chimique du composé 1 β -hydroxy 7,9-deacetylbaccatin I	89
FIGURE 20	Structure chimique du composé 7-epitaxol	90
FIGURE 21	Radioactivité contenue dans le pic du taxol (aiguilles broyées)	94
FIGURE 22	Radioactivité contenue dans le pic de 7,9 deacetylbaccatin VI (aiguilles broyées)	94
FIGURE 23	Comparaison entre les extraits d'homogénat prélevés au temps 0 et après 14 jours	96
FIGURE 24	Radioactivité contenue dans le pic du taxol (homogénat)	98
FIGURE 25	Radioactivité contenue dans le pic de 7,9 deacetylbaccatin VI (homogénat)	98
FIGURE 26	Radioactivité contenue dans le pic au temps de rétention du taxol (homogénat 2)	100
FIGURE 27	Radioactivité contenue dans le pic au temps de rétention de 10-deacétyltaxol (homogénat 2)	100
FIGURE 28	Radioactivité contenue dans le pic au temps de rétention de cephalomannine (homogénat 2)	101
FIGURE 29A	Chromatogramme de l'échantillon 2 prélevé au temps 5 heures et analysé à un gradient de 50 minutes	105
FIGURE 29B	Chromatogramme de l'échantillon 2 prélevé au temps 5 heures. injecté avec standards et analysé à un gradient de 50 minutes	106
FIGURE 29C	Chromatogramme de l'échantillon 2 prélevé au temps 5 heures, injecté avec standards et analysé à un gradient de 140 minutes	107
FIGURE 30	Acétylation du taxol et 10-deacetyltaxol	110
FIGURE 31	Acétylation de cephalomannine	111
FIGURE 32A	Chromatogramme de l'échantillon 1 prélevé au temps 5 heures	112
FIGURE 32B	Chromatogramme de l'échantillon 1 prélevé au temps 5 heures, après acétylation	113

FIGURE 32C Chromatogramme de l'échantillon 1 prélevé au temps 5 heures, acétylé et injecté avec les standards acétylés 114

DISCUSSION

FIGURE 33 Structure chimique du composé 9-dihydrotaxol 116

SOMMAIRE

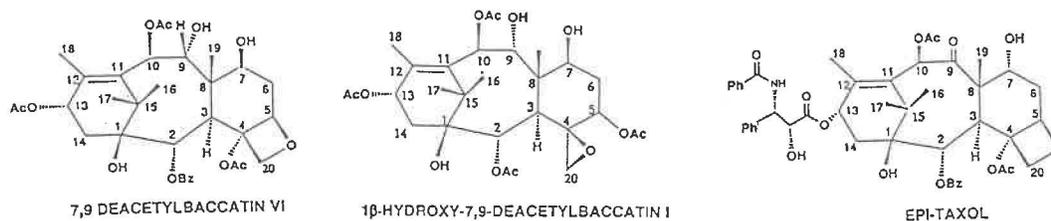
Le taxol, produit naturel extrait de l'écorce de l'if du Pacifique (Taxus brevifolia), possède des propriétés anticancéreuses. Depuis 1993, il est autorisé pour le traitement du cancer ovarien. Le taxol est administré aux patientes dont le cancer résiste aux traitements standards. Les résultats cliniques démontrent que ce médicament est fort prometteur d'autant plus qu'il semble également actif contre le cancer du sein et du poumon.

Le taxol est retrouvé chez plusieurs espèces d'ifs. L'if sur lequel nous travaillons est l'if du Canada ou Taxus canadensis. Ce conifère est un petit arbuste où les taxanes sont extraits à partir des aiguilles. Taxus canadensis a été étudié pour la première fois en 1990 par l'Institut National de Cancer des Etats-Unis (NCI). Lors de ces premiers travaux, le taxol ainsi que deux autres taxanes; cephalomannine et 10-deacetylbaccatin III, ont été isolés.

La découverte de nouveaux taxanes présente un intérêt pour les divers aspects de l'étude du taxol. En effet, la découverte de nouvelles structures a, entre autres, permis l'avancement dans les études de synthèse organique ainsi que dans les études sur l'activité biologique du taxol. L'aspect à lequel nous nous intéressons est la biosynthèse. Nous aimerions connaître les voies biosynthétiques menant à la formation du taxol. La découverte de nouveaux taxanes peut nous aider à construire un schéma de biogénèse du taxol.

La première partie de nos travaux de recherche consistait à trouver quels autres taxanes sont produits par Taxus canadensis. Plusieurs nouveaux taxanes ont été découverts. J'ai participé à l'isolement et à la purification de trois de ces composés. Les composés 7,9-deacetylbaccatin VI et 1 β -hydroxy-7,9-

deacetylbaaccatin I étaient de nouvelles structures tandis que le composé epi-taxol était isolé pour la première fois dans Taxus canadensis.



Parallèlement à ces travaux, nous avons développé une méthode pour étudier la biosynthèse du taxol à l'aide de la technique de "kinetic pulse labelling". Cette méthode consiste à ajouter un précurseur radioactif dans un homogénat d'aiguilles de Taxus canadensis et de suivre dans le temps l'incorporation du précurseur dans le taxol ainsi que dans les autres taxanes.

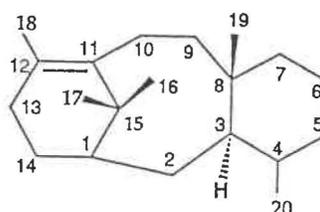
Nos travaux, quoique préliminaires, semble démontrer que le taxol se forme au cours des premières heures d'incubation. Nous avons obtenu une augmentation de l'incorporation du précurseur radioactif dans le pic au temps de rétention du taxol après cinq heures d'incubation.

D'après nos travaux de biosynthèse, le nouveau composé 7,9-deacetylbaaccatin VI ne semble pas être un intermédiaire à la formation du taxol. D'après sa structure chimique très similaire au taxol, ce composé aurait pu être plausiblement un intermédiaire à la biosynthèse du taxol. La radioactivité des composés 1 β -hydroxy-7,9-deacetylbaaccatin I et epi-taxol n'a pu être suivie étant donné que ces composés sont retrouvés en trop faible concentration et que sur le chromatogramme de l'extrait initial, leurs pics ne se différencient pas des autres pics.

INTRODUCTION

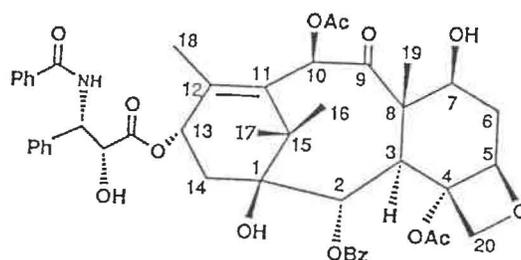
Les taxanes sont des produits naturels retrouvés dans différentes espèces d'arbres communément appelés l'if (*Taxus sp.*). Ces produits sont minoritaires et ils sont concentrés au niveau des parties aériennes de la plante (écorce, tiges, aiguilles). Les taxanes se distinguent par leur squelette-type qui est un diterpène à trois cycles (fig. 1).

Figure 1: Squelette-type de taxane



L'intérêt pour les taxanes a surtout pris de l'ampleur vers la fin des années 60. Ceci coïncide avec l'étude menée en 1964 par l'Institut National de Cancer des Etats-Unis qui visait la découverte de nouveaux produits naturels anticancéreux. Un taxane extrait de l'écorce de *Taxus brevifolia*, ultérieurement identifié et appelé taxol (1), démontra une activité cytotoxique sur différents types de tumeurs murines. Le taxol est caractérisé par son cycle oxétane en C-4(20) et par sa chaîne latérale (groupement N-benzoyl β-phenylisoserine) estérifiée en C-13 (fig. 2).

Figure 2: Structure chimique du taxol



Par la suite, les résultats des études cliniques sur le taxol s'avérèrent très positifs. L'intérêt pour le taxol augmenta d'autant plus lorsque Horwitz en 1979 démontra que le taxol était un agent antimicrotubulaire et que son action d'anti-dépolimérisation sur les microtubules était unique (2). Le taxol est le seul produit connu jusqu'à présent à posséder ce mode d'action.

Depuis 1993, le taxol est autorisé pour le traitement du cancer de l'ovaire, une maladie qui cause la mort de plus de 1300 canadiennes chaque année. Aujourd'hui, le taxol n'est qu'administré aux patientes qui ne répondent plus aux traitements standards. Le taxol semble également prometteur contre d'autres types de cancer dont le cancer du sein et du poumon.

L'inconvénient majeur du taxol réside dans son extraction laborieuse et peu rentable. Le taxol est très peu disponible sur le marché et donc très dispendieux. Les traitements au taxol doivent être ainsi limités. Présentement, le taxol est extrait à partir de Taxus brevifolia. À long terme, les ressources en taxol "naturel" risquent de ne plus subvenir au besoin de la médecine.

Pour pallier à ce problème, plusieurs groupes de chercheurs travaillent sur la synthèse ou sur la semi-synthèse du taxol. D'ailleurs tout récemment, deux groupes ont réussi à effectuer la synthèse totale du taxol (3). Deux autres alternatives sont également considérées et étudiées soient, la découverte de nouveaux taxanes naturels possédant une activité biologique semblable ainsi que la synthèse ou la semi-synthèse de composés analogues au taxol possédant la même ou une meilleure activité biologique que ce dernier.

Du point de vue fondamental, le taxol suscite également beaucoup d'intérêts. Sa structure chimique est tout à fait spéciale. Il serait fort intéressant de comprendre les mécanismes impliqués dans la biosynthèse du taxol. Cependant, pour y parvenir, il faut tout d'abord connaître les produits intermédiaires menant à la formation du taxol.

Mes travaux de recherche ont comporté donc deux parties soient:

- 1) L'isolement de nouveaux taxanes à partir des aiguilles de Taxus canadensis
- 2) L'étude préliminaire de la biosynthèse du taxol à l'aide de la technique de "Kinetic Pulse Labelling"

L'isolement de nouveaux taxanes peut nous aider à construire un schéma de biogénèse du taxol. Suite au développement d'une méthode pour l'étude de biosynthèse et suite à l'établissement du temps selon lequel le taxol se forme, la biosynthèse des autres taxanes pourra être suivie de manière plus approfondie afin d'évaluer si, parmi ces taxanes, certains sont des intermédiaires à la formation du taxol.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

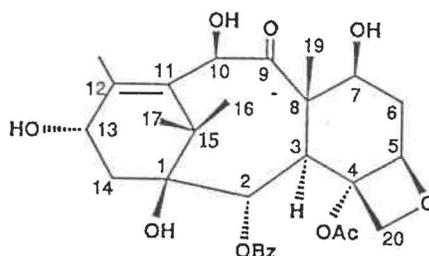
Le taxol a été isolé pour la première fois à partir de l'écorce de Taxus brevifolia (1). Par la suite, plusieurs groupes de chercheurs l'ont isolé dans différentes espèces d'ifs. En 1990, l'Institut National de Cancer des Etats-Unis a rapporté que les tiges et les aiguilles de différentes espèces de Taxus contenaient également du taxol (4). Cette étude incluait Taxus canadensis (l'if du Canada).

Les ifs sont des conifères de taille moyenne. Certaines espèces font cependant exception comme par exemples; Taxus brevifolia est un arbre gigantesque retrouvé le long de la côte Pacifique et Taxus canadensis est un petit arbuste rampant retrouvé notamment dans les forêts canadiennes.

Notre groupe travaille avec Taxus canadensis. Nous extrayons le taxol et les autres taxanes à partir des aiguilles de la plante. Le taxol ainsi que deux autres taxanes, cephalomaninne et 10-deacetylbaaccatin III, ont été isolés pour la première fois dans Taxus canadensis lors des travaux menés par Witherup en 1990 (4). Notre groupe travaille sur l'isolement et l'identification des autres taxanes contenus dans cette espèce d'if.

Des travaux fort intéressants ont été réalisés par le groupe de Potier (5). Ce groupe travaille avec l'if européen, Taxus baccata. Ils ont isolé de cet arbre un taxane identifié, 10-deacetylbaaccatin III (5). Ce composé est un taxane majoritaire dans Taxus baccata, soit dix fois la quantité de taxol. Ce taxane présente un noyau presque identique au taxol (différence: OH en position C-10), cependant il ne possède pas de chaîne latérale en C-13 (fig.3).

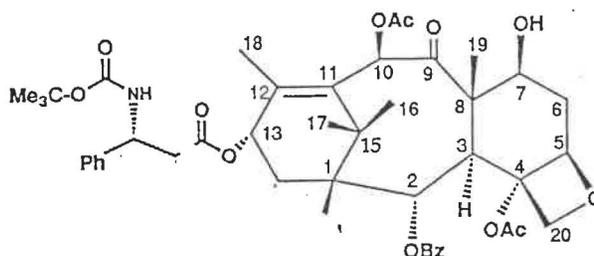
Figure 3: Structure chimique du composé 10-déacétylbaccatin III



Cette chaîne latérale est plus facile à synthétiser que le noyau diterpène (6). En 1988, le groupe de Potier a réussi à attacher cette chaîne au squelette de 10-deacetyl-7-epi-10-baccatin III, pour ainsi former du taxol semi-synthétique (7). L'avantage d'utiliser ce composé pour synthétiser du taxol est que son extraction présente un meilleur rendement que le taxol, soit de 0.02% (du poids sec de la plante) comparativement au rendement du taxol qui est de 0.003% (4). La semi-synthèse du taxol à l'aide de ce composé est une méthode intéressante pour augmenter les ressources en taxol. La compagnie qui vend le taxol, Bristol-Myers Squibb a d'ailleurs l'intention d'utiliser cette méthode pour régler partiellement le problème d'approvisionnement en taxol.

Une autre alternative est la semi-synthèse de composés analogues au taxol. Le groupe de Potier a préparé un composé semi-synthétique, qu'ils ont appelé taxotère (fig.4). Le taxotère a été synthétisé à l'aide de 10-deacetyl-7-epi-10-baccatin III et d'une chaîne latérale modifiée (8).

Figure 4: Structure chimique du taxotère



Les différences entre le taxol et le taxotère se situent premièrement au niveau de la chaîne latérale, le groupement C_6H_5 du taxol est remplacé par un groupement $OC(CH_3)_3$. Au niveau du squelette, le groupement acétyl de la position 10 est remplacé par un groupement OH (même squelette que 10-deacétylbaccatin III). Ces deux modifications améliorent de 25% la solubilité dans l'eau de la molécule (8). Il est important de noter que l'insolubilité du taxol dans l'eau est le problème majeur rencontré lors des études cliniques.

La cytotoxicité du taxotère a été testée sur différents types de cellules murines dont des cellules P388 et J774.2. Ce composé s'est avéré 2.5 fois plus toxique que le taxol (8). Son activité biologique est la même que le taxol. Il interagit avec le système microtubulaire en inhibant la dépolymérisation des microtubules en tubuline. Le taxotère est présentement au stade d'essais cliniques.

Tout récemment, deux groupes de chercheurs ont réussi à synthétiser complètement le taxol, soit le groupe de Robert A. Holton de l'Université de

Floride (9) et celui de K.C. Nicolaou de l'Institut de recherche Scripps en collaboration avec l'Université de Californie (10). Ces deux groupes travaillent indépendamment et leur approche synthétique est différente. Ces travaux sont très intéressants, toutefois, ces synthèses nécessitent de nombreuses étapes ce qui a pour effet de donner un faible rendement global.

De nombreux travaux sont en cours pour essayer de mieux connaître cette molécule qu'est le taxol. L'activité biologique ainsi que la biosynthèse du taxol sont entre autres, des aspects qui suscitent de nombreuses questions et qui doivent être grandement étudiés.

2. CLASSIFICATION DES TAXANES

Les taxanes forment une classe unique de produits naturels. Cette classe est caractérisée par le squelette tout à fait spécial des taxanes, dont la structure-type est formée par un diterpène à trois cycles (fig. 1).

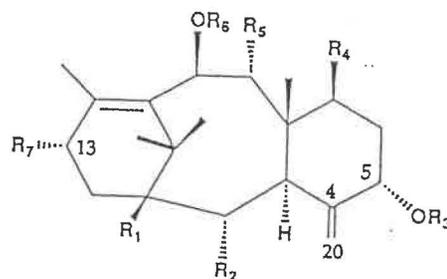
Les tableaux 1 à 12 présentent une classification des différents taxanes retrouvés naturellement dans les différentes espèces d'ifs (11). Dans ces tableaux les taxanes sont tout d'abord classés selon la classification de Potier, c'est-à-dire selon le type d'oxygénation retrouvé au carbone 20 du squelette terpénoïque (12). Les taxanes sont par la suite subdivisés selon la présence ou l'absence d'une chaîne latérale estérifiée au squelette ainsi que selon le type de cette chaîne latérale.

La classification de Potier divise les taxanes en quatre groupes;

A) Les taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20)

Ces taxanes sont retrouvés dans les tableaux 1 à 6. Ce groupe comprend la majorité des taxanes. Il est formé principalement de trois types de taxanes soient des taxanes constitués uniquement du noyau diterpène, des taxanes possédant une chaîne latérale basique en C-5 appelé chaîne de Winterstein ainsi que des taxanes possédant un autre type de chaîne latérale, c'est-à-dire une chaîne cinnamoyle estérifiée également en C-5. Il est à noter que le tableau 5 présente des composés ayant une structure fort intéressante. Ces taxanes possèdent un pont oxido entre C-12 et C-17.

TABLEAU 1: Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20)

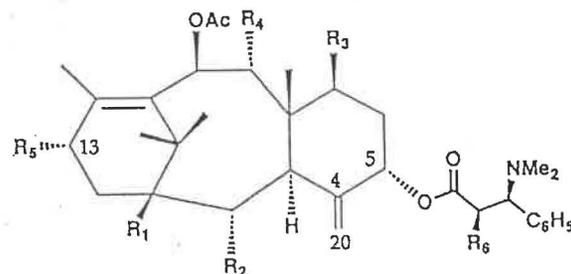


COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
5 α ,9 α ,10 β ,13 α -Tetraacetoxy-4(20),11-taxadiène	H	H	Ac	H	OAc	Ac	OAc	<i>T. baccata</i> <i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i> <i>T. mairei</i> <i>T. cuspidata</i>	13 14 15 16 17
5 α ,9 α ,10 β ,13 α -Tetrahydroxy-4(20),11-taxadiène	H	H	H	H	OH	H	OH	<i>T. baccata</i>	18
9 α ,10 β -Diacetoxy-5 α ,13 α -dihydroxy-4(20),11-taxadiène	H	H	H	H	OAc	Ac	OH	<i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i>	13 16
5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -Pentaacetoxy-4(20),11-taxadiène	H	H	Ac	OAc	OAc	Ac	OAc	<i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i>	13 19
7 β ,9 α ,10 β -Triacetoxy-2 α ,5 α ,13 α -Trihydroxy-(4)20,11-taxadiène	H	OH	H	OAc	OAc	Ac	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
2 α ,5 α ,Dihydroxy-7 β ,9 α ,10 β ,13 α -Tetraacetoxy-(4)20,11-taxadiène	H	OH	H	OAc	OAc	Ac	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2 α ,5 α ,9 α ,10 β ,13 α -Pentaacetoxy-(4)20,11-taxadiène	H	OAc	Ac	H	OAc	Ac	OAc	<i>T. baccata</i>	13

COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Decinnamoyltaxinine J	H	OAc	H	OAc	OAc	Ac	OAc	<i>T. brevifolia</i> <i>Austrotaxus</i> <i>spicata</i>	22 21
2 α ,5 α ,7 β ,10 β ,13 α -Hexaacetoxy-(4)20,11-taxadiène	H	OAc	Ac	OAc	OAc	Ac	OAc	<i>T. baccata</i>	13
2 α - α -Methyl butyryloxy-5 α -7 β ,10 β -triacetoxy(4)20,11-taxadiène	H	OCOiBu	Ac	OAc	H	Ac	H	<i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i>	13 19
5 α ,Hydroxy-2 α - α -Methyl butyryloxy-7 β ,9 α ,10 β -Triacetoxy-(4)20,11-taxadiène	H	OCOiBu	H	OAc	OAc	Ac	H	<i>T. baccata</i>	13
2 α - α -Methyl Butyryloxy-5 α -7 β ,9 α ,10 β -Tetraacetoxy-(4)20,11-taxadiène	H	OCOiBu	Ac	OAc	OAc	Ac	H	<i>T. baccata</i>	13
1 β ,2 α ,5 α ,9 α ,10 β ,13 α -Hexahydroxy-(4)20,11-taxadiène	OH	OH	H	H	OH	H	OH	<i>T. chinensis</i>	23
2 α -Benzoyloxy-9 α ,10 β -Diacetoxy-1 β ,5 α ,13 α -Trihydroxy-(4)20,11-taxadiène	OH	OCOC ₆ H ₅	H	H	OAc	Ac	OH	<i>T. chinensis</i>	23
2 α -Benzoyloxy-10 β ,13 α -Diacetoxy-1 β ,5 α ,9 α -Trihydroxy-(4)20,11-taxadiène	OH	OCOC ₆ H ₅	H	H	OH	Ac	OAc	<i>T. chinensis</i>	23
Brévifoliol	OH	H	H	OCOC ₆ H ₅	OAc	Ac	OH	<i>T. brevifolia</i>	24
Taxinine A	H	OAc	h	H	OAc	Ac	= O	<i>T. cuspidata</i> <i>T. chinensis</i>	25 26
Taxinine H	H	OAc	Ac	H	OAc	Ac	= O	<i>T. cuspidata</i>	25
13-Acetylbrévifoliol	OH	H	H	OCOC ₆ H ₅	OAc	Ac	OAc	<i>T. wallichiana</i>	27
7,13-Diacetyl-7-Debenzoylbrévifoliol	OH	H	H	OAc	OAc	Ac	OAc	<i>T. wallichiana</i>	27
7-Debenzoyl-10 β -Hydroxybrévifoliol	OH	H	H	H	OAc	H	OH	<i>T. wallichiana</i>	27
7-Acetyl-10-Deacetyl-7-Debenzoylbrévifoliol	OH	H	H	OAc	OAc	H	OH	<i>T. wallichiana</i>	27
2 α -Acetoxybrévifoliol	OH	OAc	H	OCOC ₆ H ₅	OAc	Ac	OH	<i>T. baccata</i>	28
Taxchinin A	C(CH ₃) ₂ OH	OAc	H	OAc	OAc	OCOC ₆ H ₅	OH	<i>T. chinensis</i>	29

COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxchinin D	C(CH ₃) ₂ OH	OAc	H	OAc	OAc	OCOC ₆ H ₅	OAc	<i>T. chinensis</i>	30
Taxchinin G	C(CH ₃) ₂ OH	OAc	H	OAc	OAc	H	OH	<i>T. chinensis</i>	30

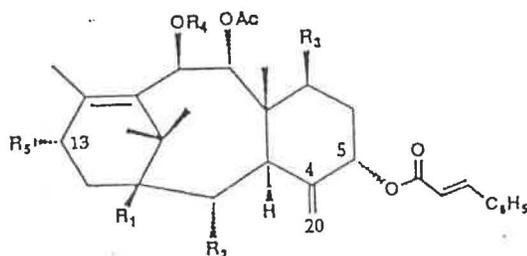
TABLEAU 2 : Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et une chaîne de Winterstein en C-5



COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Austrospicatine	H	H	OAc	OAc	OAc	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2 β ,Deacetylaustrospicatine	H	H	OAc	OAc	OAc	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
7 β ,Deacetylaustrospicatine	H	H	OH	OAc	OAc	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
7 β ,9 α ,Bisdeacetylaustrospicatine	H	H	OH	OH	OAc	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2 β ,7 β ,9 α -Trisdeacetylaustrospicatine	H	H	OH	OH	OAc	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2 β -Déacetoxyaustrospicatine	H	H	OAc	OAc	OAc	H	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2 α ,Acetoxyaustrospicatine	H	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2 α -Acetoxy-2 β -deacetylaustrospicatine	H	OAc	OAc	OAc	OAc	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
Comptonine	H	H	OAc	OAc	= O	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
2 α -Hydroxy-2 β -deacetoxyaustrospicatine	H	OH	OAc	OAc	OAc	H	<i>Austrotaxus spicata</i>	21

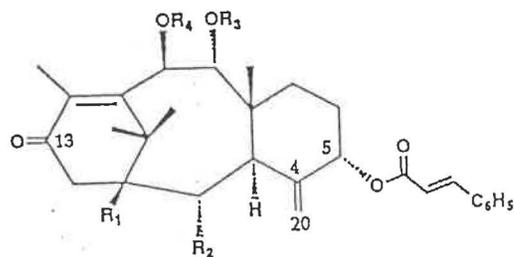
COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxine B	OH	OH	H	OH	= O	H	<i>T. baccata</i> <i>T. baccata</i>	31 32,33
Taxine I	OH	OAc	H	OAc	= O	H	<i>T. baccata</i>	28
Taxine II	H	OAc	H	OAc	= O	H	<i>T. baccata</i>	28

TABLEAU 3 : Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et une chaîne cinnamoyle en C-5



COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
5 α -Cinnamoyloxy-9 α ,10 β ,13 α - triacetoxy-taxa-4(20),11-diène	H	H	H	Ac	OAc	<i>T. mairei</i> <i>T. chinensis</i>	34 35
5 α -Cinnamoyloxy-2 α ,13 α - dihydroxy-9 α ,10 β -diacetoxy- 4(20),11-taxadiene	H	OH	H	Ac	OH	<i>T. chinensis</i>	35
5 α -Cinnamoyloxy-10 β -hydroxy- 2 α ,9 α ,13 α -triacetoxy-taxa- 4(20),11-taxadiene	H	OAc	H	H	OAc	<i>T. chinensis</i>	35
5 α -Cinnamoyloxy-2 α ,9 α ,10 β ,13 α -tetraacetoxy-4(20),11- taxadiene	H	OAc	H	Ac	OAc	<i>T. mairei</i>	19
2 α -Benzoyloxy-5 α - cinnamoyloxy-9 α ,10 β -diacetoxy- 1 β ,13 α -dihydroxy-1 β ,13 α - dihydroxy-4(20),11-taxadiene	OH	OCOC ₆ H ₅	H	Ac	OH	<i>T. chinensis</i>	23,46
Taxinine	H	OAc	H	Ac	= O	<i>T. baccata</i> <i>T. chinensis</i> <i>T. cuspidata</i> <i>T. mairei</i>	36,37,38 26 25 16

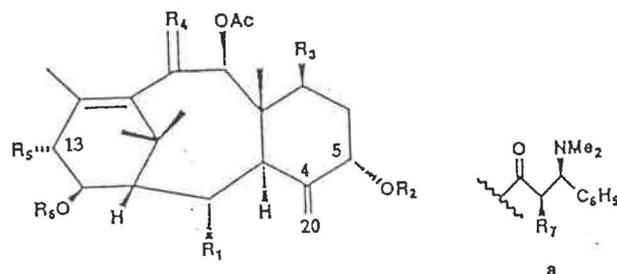
COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxinine E	H	OAc	H	Ac	OAc	<i>T. cuspidata</i>	39
Taxinine J	H	OAc	OAc	Ac	OAc	<i>T. mairei</i>	40
2 α -Deacetoxytaxinine J	H	H	OAc	Ac	OAc	<i>T. cuspidata</i>	39
Taxinine B	H	OAc	OAc	Ac	= O	<i>T. mairei</i> <i>T. cuspidata</i> <i>T. mairei</i>	41 39 19
O-cinnamoyl-taxicin I	OH	OH	H	H	= O	<i>T. baccata</i>	36
O-cinnamoyl-taxicin I	OH	OAc	H	Ac	= O	<i>T. cuspidata</i>	25



COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
5-Cinnamoyl-9-acetyltaxicin-I	OH	H	Ac	H	<i>T. baccata</i>	42
5-Cinnamoyl-10-acetyltaxicin-I	OH	H	H	Ac	<i>T. baccata</i>	42
5-Cinnamoyl-10-acetyltaxicin-II	H	H	H	Ac	<i>T. baccata</i>	42

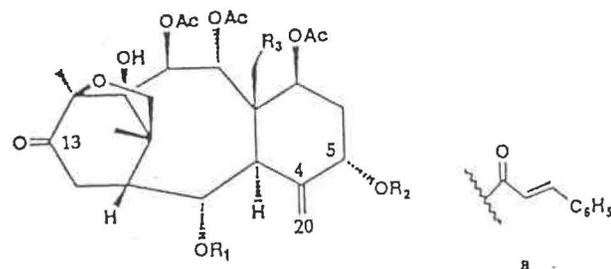
COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
2-Dehydro-5-cinnamoyl-9-acetyltaxicin-II	H	= O	Ac	H	<i>T. baccata</i>	42
2-Dehydro-5-cinnamoyl-10-acetyltaxicin-II	H	= O	H	Ac	<i>T. baccata</i>	42

TABLEAU 4 : Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et un double lien en C-10



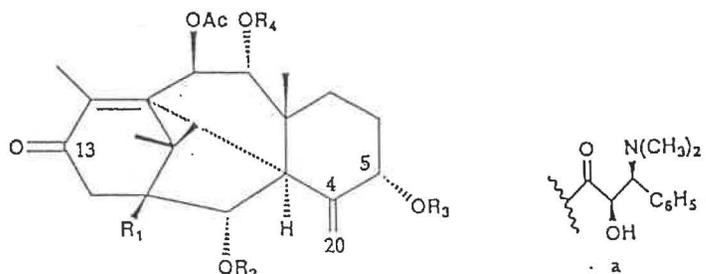
COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Austrotaxine	H	a	OAc	O	OAc	Ac	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2'-Deacetylaustrotaxine	H	a	OAc	O	OAc	Ac	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	21
2'-Deacetoxy-austrotaxine	H	a	OAc	O	OAc	Ac	H	<i>austrotaxus spicata</i>	21
2 β ,13 α ,14 β -Trisdeacetylaustrotaxine	H	a	OAc	O	OH	H	OH	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
7 β ,9 α -Diacetoxy-5 α ,13 α ,14 β -trihydroxy-10-oxo-(4)20,11-taxadiène	H	H	OAc	O	OH	H	-	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
Taiwanxan	OAc	H	H	β -OAc	H	CO'bu	-	<i>T. mairei</i> <i>T. mairei</i>	43 44

TABLEAU 5 : Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et un pont oxido en C-12(16)



COMPOSÉS	R1	R2	R3	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxagifine	Ac	a	H	<i>T. cuspidata</i> <i>T. chinensis</i> <i>T. baccata</i>	45 46,47 48,49
2 α -Deacetyl-5 α -decinnamoyltaxagifine	H	H	H	<i>T. chinensis</i>	35,50
5 α -Decinnamoyltaxagifine	Ac	H	H	<i>T. chinensis</i>	46,47
5 α -Acetyl-5 α -decinnamoyl-taxagifine	Ac	Ac	H	<i>T. chinensis</i>	46,47
Taxinine M	Ac	H	OCOC ₆ H ₅	<i>T. brevifolia</i>	51
Taxacin	Ac	a	OCOC ₆ H ₅	<i>T. cuspidata</i>	45

TABLEAU 6 : Taxanes possédant un double lien exocyclique en C-4(20) et un pont entre C-3 et C-11

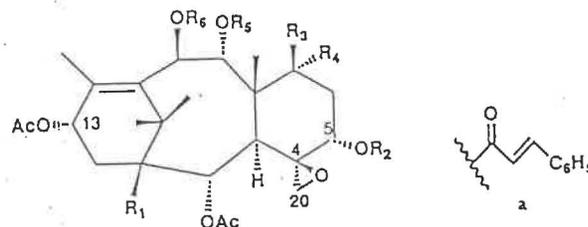


COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxinine K	H	OAc	H	OAc	<i>T. cuspidata</i>	25
Taxinine L	H	OAc	Ac	OAc	<i>T. cuspidata</i>	25
Spicadeledonine	H	OAc	O	OAc	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
5-Cinnamoyl-10-acetylphototaxicin I	OH	OH	O	OH	<i>T. baccata</i>	52

B) Les taxanes possédant un époxyde en C-4(20)

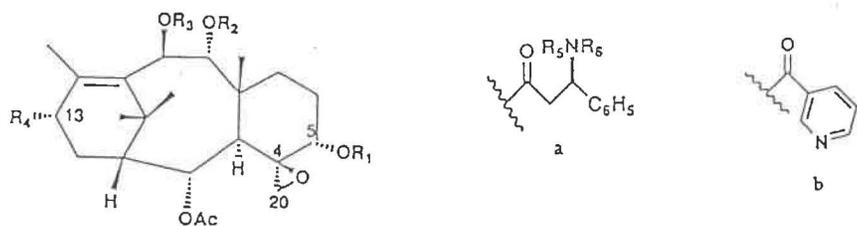
Les taxanes du groupe B sont présentés dans les tableaux 7 et 8. On y retrouve quelques taxanes constitués uniquement du noyau diterpène, mais la majorité possède une chaîne latérale attachée en C-5 de type cinnamoyle ou de type Winterstein. Quelques taxanes de ce groupe possèdent un acide nicotinique estérifié en C-9. Ce type de taxanes a jusqu'à présent, été isolé seulement à partir d'Austrataxus spicata.

TABLEAU 7 : Taxanes possédant un époxyde en C-4(20)



COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Baccatin I	H	Ac	OAc	H	Ac	Ac	<i>T. baccata</i>	53
5 α -Deacetylbaccatin I	H	H	OAc	H	Ac	Ac	<i>T. baccata</i>	53
1 β -Hydroxybaccatin I	OH	Ac	OAc	H	Ac	Ac	<i>T. wallichiana</i> <i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i>	54 53 55
1 β -Hydroxy-5 α -deacetylbaccatin I	OH	H	OAc	H	Ac	Ac	<i>T. yunnanensis</i>	55
1 β -Acetoxy-5 α -deacetylbaccatin I	OAc	H	OAc	H	Ac	Ac	<i>T. mairei</i>	56
1 β -Hydroxy-7 β -deacetoxy-7 α -hydroxy-baccatin I	OH	Ac	H	OH	Ac	Ac	<i>T. baccata</i>	57
Spicatine	H	a	H	H	H	Ac	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
9 α -Acetyl-10 β -deacetyl-spicatine	H	a	H	H	Ac	H	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
10 β -Deacetylspicatine	H	a	H	H	H	H	<i>Austrotaxus spicata</i>	20

TABLEAU 8 : Taxanes possédant un époxyde en C-4(20) et une chaîne latérale en C-5



COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	R6	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Spicatine	a	H	Ac	OAc	CH ₃	CH ₃	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
9 α -Acetyl 10 β -deacetylspicataxine	a	Ac	H	OAc	CH ₃	CH ₃	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
Nicaustrine	a	b	Ac	OAc	CH ₃	CH ₃	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
N-Demethyl-nicaustrine	a	b	Ac	OAc	H	CH ₃	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
5 α -O-(3'-methylamino 3'-phenylpropionyl) nicotaxine	a	b	Ac	= O	H	CH ₃	<i>Austrotaxus spicata</i>	20
5 α -O-(3'-amino 3'-phenylpropionyl) nicotaxine	a	b	Ac	= O	H	H	<i>austrotaxus spicata</i>	20
Nicotaxine	H	b	Ac	= O	-	-	<i>Austrotaxus spicata</i>	20

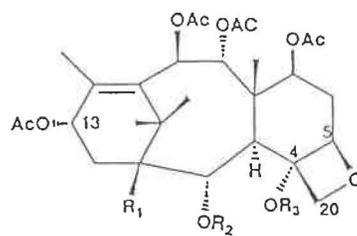
C) Les taxanes possédant un cycle oxétane

Ce groupe est de loin le plus intéressant car il comprend le taxol ainsi que son précurseur semi-synthétique: 10-deacetylbaaccatin III. C'est dans ce groupe que l'on pourrait inclure tous les analogues du taxol préparés semi-synthétiquement tel que, le taxotère.

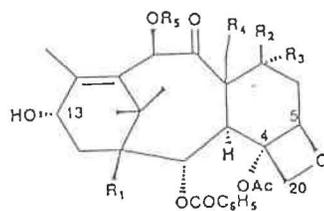
Le tableau 9 regroupe les taxanes sans chaîne latérale dont notamment baaccatin et ses dérivés. Dans le tableau 10, on retrouve les taxanes possédant en C-13 une chaîne latérale fort complexe (groupement N-benzoyl- β -phénylisosérine). Cette chaîne latérale ainsi que le cycle oxétane sont d'ailleurs associés à l'activité biologique de ces taxanes (58). Ce dernier tableau présente également une série de dérivés xylosyl du taxol et de céphalomanine, tous isolés de l'écorce de Taxus baaccata.

Tout récemment, deux taxanes fort intéressants ont été isolés de Taxus mairei. Ils sont présentés dans le tableau 11. La découverte de ces deux taxanes vient appuyer l'hypothèse émise par Halsall (59). Ce dernier proposait cette structure-type comme intermédiaire à la formation du cycle oxétane. C'est pour cette raison que ces taxanes sont appelés des pré-oxétanes et qu'ils sont classés dans ce groupe-ci même s'ils ne possèdent pas comme tel, le cycle oxétane.

TABLEAU 9 : Taxanes possédant un cycle oxétane



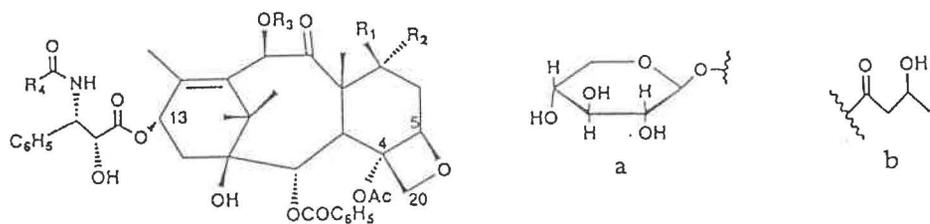
COMPOSÉS	R1	R2	R3	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Baccatin IV	OH	Ac	Ac	<i>T. baccata</i>	60
1β-Acetylbaccatin IV	OAc	Ac	Ac	<i>T. yunnanensis</i>	55
1β-Dehydroxybaccatin IV	H	Ac	Ac	<i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i>	60 40
1β-Dehydroxy-4α-Deacetylbaccatin IV	H	Ac	H	<i>T. mairei</i>	56
Baccatin VI	OH	COC6H5	Ac	<i>T. baccata</i> <i>T. baccata</i> <i>T. mairei</i>	57 60 40
1β-Dehydroxybaccatin VI	H	COC6H5	Ac	<i>T. mairei</i>	40
Baccatin VII	OH	COC5H11	Ac	<i>T. baccata</i>	60



COMPOSES	R1	R2	R3	R4	R5	ESPECES	REFERENCES
Baccatin III	OH	OH	H	H	Ac	<i>T. baccata</i> <i>T. wallichiana</i>	57 54,61

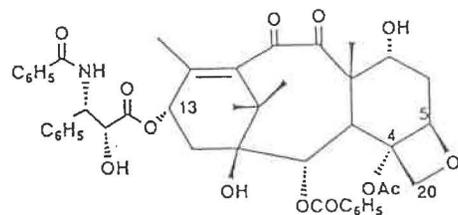
COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	R5	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
10-Deacetylbaaccatin III	OH	OH	H	H	H	<i>T. baccata</i> <i>T. yunnanensis</i> <i>T. brevifolia</i>	49 37 22
19-Hydroxybaaccatin III	OH	OH	H	OH	Ac	<i>T. baccata</i> <i>T. yunnanensis</i> <i>T. wallichiana</i>	49 37 62
1-Deahydroxybaaccatin III	H	OH	H	H	Ac	<i>T. yunnanensis</i>	37
19-Hydroxy-7-epibaaccatin III	OH	H	OH	OH	Ac	<i>T. chinensis</i>	63
Baaccatin V	OH	H	OH	H	Ac	<i>T. baccata</i>	59
10-Deacetyl-10-oxobaaccatin V	OH	H	OH	H	= O	<i>T. chinensis</i>	63

TABLEAU 10 : Taxanes possédant un cycle oxétane et une chaîne latérale en C-13



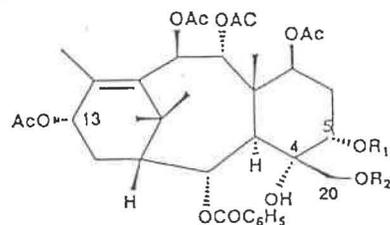
COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxol	OH	H	Ac	C ₆ H ₅	<i>T. brevifolia</i> <i>T. brevifolia</i> <i>T. wallichiana</i> <i>T. wallichiana</i> <i>T. baccata</i>	64 22 61 54 57
7-epitaxol	H	OH	Ac	C ₆ H ₅	<i>T. brevifolia</i>	65
10-Deacetyltaxol	OH	H	H	C ₆ H ₅	<i>T. wallichiana</i> <i>T. baccata</i>	62 57
1-(β-xylosyl)-taxol	a	H	Ac	C ₆ H ₅	<i>T. baccata</i>	57
1-(β-xylosyl)-10-Deacetyltaxol	a	H	H	C ₆ H ₅	<i>T. baccata</i>	57
10-(β-Hydroxybutyryl)-10-Deacetyltaxol	OH	H	b	C ₆ H ₅	<i>T. baccata</i>	57
Cephalomannine	OH	H	Ac		<i>T. baccata</i> <i>T. wallichiana</i> <i>T. baccata</i>	57 54,61 49
10-Deacetyl-cephalomannine	OH	H	H		<i>T. wallichiana</i> <i>T. baccata</i>	62 57
7-(β-xylosyl)-cephalomannine	a	H	Ac		<i>T. baccata</i>	57

COMPOSÉS	R1	R2	R3	R4	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
7-(β-xylosyl)-10-Deacetylcephalomannine	a	H	H		<i>T. baccata</i>	57
10-(β-Hydroxybutyryl)-10-Deacetylcephalomannine	OH	H	b		<i>T. baccata</i>	57
7-(β-xylosyl)-taxol C	a	H	Ac	C ₅ H ₁₁	<i>T. baccata</i>	57
7-(β-xylosyl)-10-Deacetyltaxol C	a	H	H	C ₅ H ₁₁	<i>T. baccata</i>	57



COMPOSÉS	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
10-Deacetyl-10-oxo-7-epitaxol	<i>T. brevifolia</i>	65

TABLEAU 11 : Taxanes possédant un cycle pré-oxétane

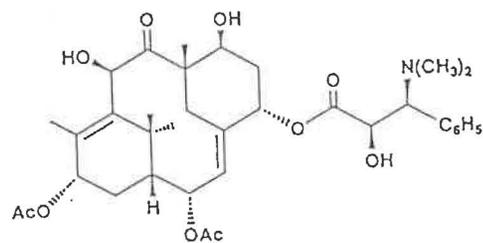


COMPOSÉS	R1	R2	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -Pentaacetoxy-2 α -benzoyloxy-4 α - σ -dihydroxytax-11-ene	Ac	H	<i>T. mairei</i>	66
7 β ,9 α ,10 β ,13 α ,20-pentaacetoxy-2 α -benzoyl-4 α ,5 α -dihydroxytax-11-ene	H	Ac	<i>T. mairei</i>	66

D) Les taxanes possédant une double liaison endocyclique entre C-4 et C-20

Ce groupe ne possède qu'un seul représentant: Taxine A. Sa structure diffère légèrement du squelette de base de tous les taxanes connus jusqu'à présent.

TABLEAU 12 : Taxanes possédant une double liaison endocyclique entre C-4 et C-20



COMPOSÉS	ESPÈCES	RÉFÉRENCES
Taxine A	<i>T. baccata</i>	67,68

3. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

3.1 HISTORIQUE

La toxicité de l'if est connue depuis fort longtemps. D'après certains mythes, cette toxicité était connue dès l'Antiquité (69). On raconte, entre autres, que les Gaulois utilisaient des feuilles d'ifs pour empoisonner leurs flèches.

Comme mentionné précédemment, l'intérêt pour les produits contenus dans l'if a surtout pris de l'ampleur vers la fin des années 60, lors de l'étude menée par l'Institut National de Cancer (NCI) des Etats-Unis. Ce programme visait la découverte de produits naturels possédant des propriétés cancéreuses. Lors de cette étude, un extrait de l'écorce de Taxus brevifolia démontra une très grande toxicité envers plusieurs types de cellules murines leucémiques (1). En 1971, l'agent responsable de cette toxicité fut isolé et appelé taxol (1). Étant donné les problèmes d'approvisionnement en taxol ainsi que son insolubilité dans l'eau, le taxol ne fut pas immédiatement considéré comme un agent anticancéreux potentiel et les études cliniques sur le taxol prirent un certain temps à être développées (70).

L'intérêt pour le taxol augmenta d'autant plus lorsqu'il fut démontré que le taxol possédait une activité biologique unique (2). Le taxol est un agent antimicrotubulaire qui agit en inhibant la dépolymérisation des microtubules. Tous les agents antimicrotubulaires connus jusqu'à présent agissent, contrairement au taxol, en inhibant la polymérisation des microtubules.

La phase I des études cliniques s'amorça au début des années 80 (71). Ces études ont permis de déterminer la dose optimale de taxol nécessaire pour les traitements ainsi que la méthode d'administration du taxol aux patientes. Les problèmes majeurs rencontrés au cours de cette phase étaient dus à l'insolubilité du taxol dans l'eau. Le taxol doit donc être administré avec des adjuvants ce qui cause parfois des problèmes d'allergies et de nombreux effets secondaires (11).

La phase II débuta en 1985 (11). Les résultats s'avérèrent spectaculaires comparativement à d'autres traitements anticancéreux. Les meilleurs résultats notés furent contre le cancer ovarien. Ces essais démontrèrent un taux de réponses positives allant jusqu'à 30% (71,72). Ces résultats étaient très encourageants d'autant plus que le taxol n'était qu'administré aux patientes ayant un cancer très avancé ou un cancer résistant aux autres traitements standards. Le taxol a été autorisé pour le traitement du cancer de l'ovaire en 1993. Il est présentement au stade d'essais cliniques pour d'autres types de cancer dont le cancer du poumon et du sein (73).

3.2 LE TAXOL: UN AGENT ANTIMICROTUBULAIRE

Comme mentionné précédemment, le taxol interagit avec le système microtubulaire des cellules (2). Les microtubules sont formés par la polymérisation de dimères de protéines, appelés tubuline. Cette polymérisation a lieu lors de la division cellulaire.

La figure suivante présente les différentes étapes de cette division cellulaire, appelée "mitose" (74).

3.2.1 Étapes de la mitose (fig.5)

Au cours de la première phase (la prophase), les contours du noyau s'estompent, tandis que la masse d'acides nucléiques (ADN) qu'il contient s'individualise en chromosomes. Simultanément le centrosome, petit organite présent dans le cytoplasme de la cellule se dédouble en deux centrioles. Ces deux centrioles s'éloignent l'un de l'autre pour aller occuper les deux pôles de la cellule. Puis entre les deux centrioles s'édifient les microtubules, organisés en fuseau et constitués de tubuline.

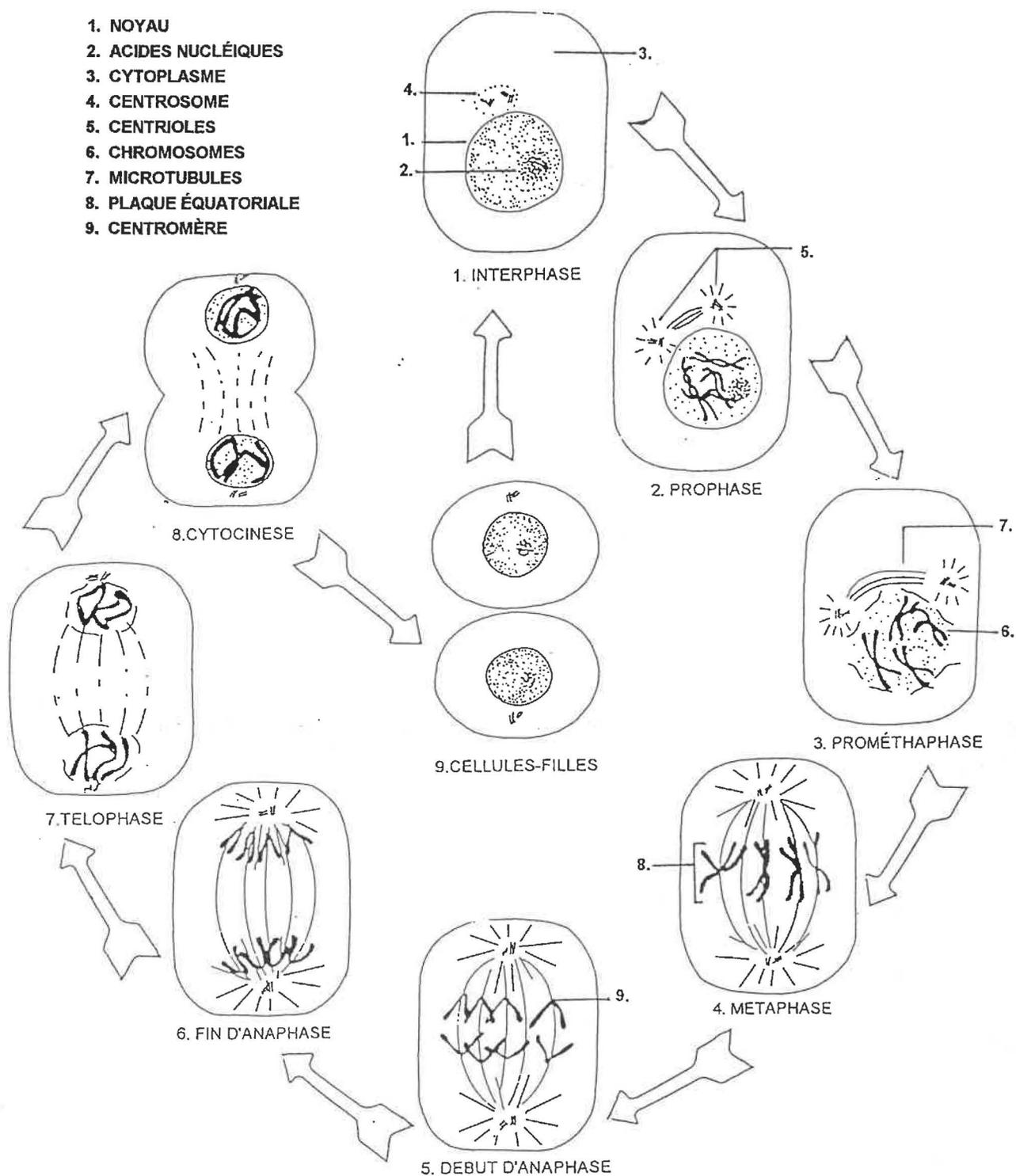
Ensuite apparaît la deuxième phase (la métaphase), au cours de laquelle les chromosomes sont disposés au centre de la cellule et forment ce qu'on appelle la "plaque équatoriale". Chaque chromosome est attaché par son centromère aux microtubules. C'est au cours de cette phase que les chromosomes vont se dédoubler pour former deux chromosomes-fils.

Pendant la troisième phase (anaphase) les deux chromosomes-fils se séparent et migrent vers des pôles opposés, guidés par les faisceaux de microtubules. Enfin la dernière étape avant la cytokinèse (division de la cellule en deux cellules-filles) est la télophase. Durant cette étape les chromosomes-fils se rassemblent aux pôles de la cellule et en même temps les microtubules du fuseau se désagrègent, c'est-à-dire qu'ils se dépolimérisent en tubuline pour permettre par la suite la division cellulaire.

FIGURE 5: Le cycle de la mitose

LÉGENDE

1. NOYAU
2. ACIDES NUCLÉIQUES
3. CYTOPLASME
4. CENTROSOME
5. CENTRIOLES
6. CHROMOSOMES
7. MICROTUBULES
8. PLAQUE ÉQUATORIALE
9. CENTROMÈRE



3.2.2 Activité biologique du taxol

Le taxol se lie aux microtubules (75). Les microtubules deviennent alors très stables et leur dépolymérisation qui a lieu à la télophase, est inhibée. La division cellulaire ne peut donc être complétée, elle se termine au stade de la télophase. Même la présence de facteurs induisant ordinairement la dépolymérisation comme par exemples, une basse température ou la présence d'ions de calcium, ne provoqueront pas le désassemblage des microtubules (2,75). Un autre effet du taxol sur les microtubules est qu'il réduit le temps de polymérisation de la tubuline en microtubules. De plus, il induit cette polymérisation même en l'absence de GTP, un facteur habituellement nécessaire pour que cette réaction ait lieu (2).

La cytotoxicité du taxol sur les cellules cancéreuses semble directement reliée à cette activité biologique. L'hypothèse la plus populaire sur les causes de cette cytotoxicité est que le taxol en se liant aux microtubules, empêcherait leur dépolymérisation. la division cellulaire serait bloquée au stade de la télophase et la multiplication des cellules cancéreuses seraient ainsi inhibées (76). Certains auteurs suggèrent qu'il existe fort probablement dans les cellules animales, des molécules interagissant avec les microtubules selon lesquelles s'apparentent certains alcaloïdes de plantes tels le taxol et la colchicine (2).

Pour posséder une cytotoxicité, les taxanes doivent nécessairement être munis d'une chaîne latérale en C-13 comme celle du taxol (58). Cette chaîne latérale peut cependant être modifiée à certaines positions sans toutefois faire perdre la toxicité de la molécule (ex: le taxotère). La chaîne latérale seule n'a par contre, aucun effet sur les microtubules. Le cycle oxetane et le groupement

benzoate en C-2 du squelette des taxanes semblent également nécessaires à la cytotoxicité des taxanes (58).

Des travaux ont démontré que les taxanes sans chaîne latérale, présentent également une affinité avec la tubuline, sans toutefois inhiber la dépolymérisation des microtubules (58). Il semblerait donc que le squelette des taxanes s'attacherait à la tubuline et que la chaîne latérale stabiliserait les microtubules (58). Par contre jusqu'à présent aucune information n'est connue sur les sites d'attachement des taxanes à la tubuline.

D'autres hypothèses ont été émises sur l'activité biologique du taxol. Le taxol en se liant sur la tubuline pourrait altérer la régulation des canaux calciques situés sur la membrane cellulaire. Le calcium joue un rôle important lors de la polymérisation et la dépolymérisation de la tubuline (11). Donc l'altération de cette régulation, causerait le dérèglement de la division cellulaire. Une autre hypothèse est que le taxol n'agirait pas seulement sur les microtubules. Tout récemment, il a été démontré que le taxol activait les macrophages murins qui, on le sait, possèdent une action tumoricide. Le taxol, en plus de son action cytotoxique sur les cellules cancéreuses via les microtubules de ces cellules, pourrait également induire les défenses du système immunitaire (77).

Beaucoup de travaux restent à faire afin d'élucider toutes les questions générées par cette activité biologique unique que possède le taxol.

4. BIOSYNTHÈSE DES TAXANES

4.1 BIOGÉNÈSE DES TAXANES

Les taxanes sont des composés terpénoïques constitués de trois cycles. La biosynthèse des terpènes fait partie du vaste champ d'étude de la biosynthèse des produits naturels. La figure 6 montre les différentes voies métaboliques générant les produits naturels (78).

La biosynthèse des terpènes est aujourd'hui très bien connue grâce aux travaux de Bloch et de Lynen (79). Leurs travaux ont démontré que tous les terpénoïdes étaient formés à partir d'unités d'isopentényl-pyrophosphate (IPP). Les terpènes seraient tous formés à partir de la condensation d'une molécule de diméthylallyl-pyrophosphate, c'est-à-dire une molécule d'isopentényl-pyrophosphate ayant subi l'action d'une isomérase ainsi que d'une ou plusieurs molécules d'isopentényl-pyrophosphate, selon le type de terpènes (mono, sesqui, diterpène). Comme il est indiqué à la figure 7, les diterpènes seraient formés à partir d'une molécule de diméthylallyl-pyrophosphate et de trois molécules d'isopentényl-pyrophosphate pour former du géranyl-géraniol-pyrophosphate (79). Les taxanes sont fort probablement le résultat d'une cyclisation de ce composé (80). La biogénèse des taxanes peut être résumée comme à la figure 8.

Potier a émis l'hypothèse que la cyclisation du géranyl-géraniol-pyrophosphate pourrait se faire de deux façons et ainsi donner lieu à la formation de taxanes de différents groupes (12). La figure 9 présente cette hypothèse. Lors des mêmes travaux, Potier a également présenté un schéma de biogénèse sur les

3.2.2 Activité biologique du taxol

Le taxol se lie aux microtubules (75). Les microtubules deviennent alors très stables et leur dépolymérisation qui a lieu à la télophase, est inhibée. La division cellulaire ne peut donc être complétée, elle se termine au stade de la télophase. Même la présence de facteurs induisant ordinairement la dépolymérisation comme par exemples, une basse température ou la présence d'ions de calcium, ne provoqueront pas le désassemblage des microtubules (2,75). Un autre effet du taxol sur les microtubules est qu'il réduit le temps de polymérisation de la tubuline en microtubules. De plus, il induit cette polymérisation même en l'absence de GTP, un facteur habituellement nécessaire pour que cette réaction ait lieu (2).

La cytotoxicité du taxol sur les cellules cancéreuses semble directement reliée à cette activité biologique. L'hypothèse la plus populaire sur les causes de cette cytotoxicité est que le taxol en se liant aux microtubules, empêcherait leur dépolymérisation. la division cellulaire serait bloquée au stade de la télophase et la multiplication des cellules cancéreuses seraient ainsi inhibées (76). Certains auteurs suggèrent qu'il existe fort probablement dans les cellules animales, des molécules interagissant avec les microtubules selon lesquelles s'apparentent certains alcaloïdes de plantes tels le taxol et la colchicine (2).

Pour posséder une cytotoxicité, les taxanes doivent nécessairement être munis d'une chaîne latérale en C-13 comme celle du taxol (58). Cette chaîne latérale peut cependant être modifiée à certaines positions sans toutefois faire perdre la toxicité de la molécule (ex: le taxotère). La chaîne latérale seule n'a par contre, aucun effet sur les microtubules. Le cycle oxetane et le groupement

benzoate en C-2 du squelette des taxanes semblent également nécessaires à la cytotoxicité des taxanes (58).

Des travaux ont démontré que les taxanes sans chaîne latérale, présentent également une affinité avec la tubuline, sans toutefois inhiber la dépolymérisation des microtubules (58). Il semblerait donc que le squelette des taxanes s'attacherait à la tubuline et que la chaîne latérale stabiliserait les microtubules (58). Par contre jusqu'à présent aucune information n'est connue sur les sites d'attachement des taxanes à la tubuline.

D'autres hypothèses ont été émises sur l'activité biologique du taxol. Le taxol en se liant sur la tubuline pourrait altérer la régulation des canaux calciques situés sur la membrane cellulaire. Le calcium joue un rôle important lors de la polymérisation et la dépolymérisation de la tubuline (11). Donc l'altération de cette régulation, causerait le dérèglement de la division cellulaire. Une autre hypothèse est que le taxol n'agirait pas seulement sur les microtubules. Tout récemment, il a été démontré que le taxol activait les macrophages murins qui, on le sait, possèdent une action tumoricide. Le taxol, en plus de son action cytotoxique sur les cellules cancéreuses via les microtubules de ces cellules, pourrait également induire les défenses du système immunitaire (77).

Beaucoup de travaux restent à faire afin d'élucider toutes les questions générées par cette activité biologique unique que possède le taxol.

4. BIOSYNTHÈSE DES TAXANES

4.1 BIOGÉNÈSE DES TAXANES

Les taxanes sont des composés terpénoïques constitués de trois cycles. La biosynthèse des terpènes fait partie du vaste champ d'étude de la biosynthèse des produits naturels. La figure 6 montre les différentes voies métaboliques générant les produits naturels (78).

La biosynthèse des terpènes est aujourd'hui très bien connue grâce aux travaux de Bloch et de Lynen (79). Leurs travaux ont démontré que tous les terpénoïdes étaient formés à partir d'unités d'isopentényl-pyrophosphate (IPP). Les terpènes seraient tous formés à partir de la condensation d'une molécule de diméthylallyl-pyrophosphate, c'est-à-dire une molécule d'isopentényl-pyrophosphate ayant subi l'action d'une isomérase ainsi que d'une ou plusieurs molécules d'isopentényl-pyrophosphate, selon le type de terpènes (mono, sesqui, diterpène). Comme il est indiqué à la figure 7, les diterpènes seraient formés à partir d'une molécule de diméthylallyl-pyrophosphate et de trois molécules d'isopentényl-pyrophosphate pour former du géranyl-géranol-pyrophosphate (79). Les taxanes sont fort probablement le résultat d'une cyclisation de ce composé (80). La biogénèse des taxanes peut être résumée comme à la figure 8.

Potier a émis l'hypothèse que la cyclisation du géranyl-géranol-pyrophosphate pourrait se faire de deux façons et ainsi donner lieu à la formation de taxanes de différents groupes (12). La figure 9 présente cette hypothèse. Lors des mêmes travaux, Potier a également présenté un schéma de biogénèse sur les

mécanismes de formation des taxanes des groupes A, B et C (fig. 10). Les taxanes du groupe B, c'est-à-dire les taxanes possédant un époxyde seraient les intermédiaires à la formation du cycle oxétane des taxanes du groupe C dont le taxol fait partie. Cette hypothèse présentée à la figure 11 fut émise entre autres par Halsall et ses collaborateurs (59). Cette hypothèse est très intéressante car tout récemment, deux taxanes ayant la structure type de l'intermédiaire proposé ont été isolés à partir de Taxus mairei (66). Ces deux taxanes forment le groupe des pré-oxétanes. Cette découverte vient appuyer les hypothèses de Halsall et de Potier (59,12).

4.2 BIOSYNTHÈSE DES TAXANES

4.2.1 Biosynthèse du noyau diterpène

Malgré toutes ces hypothèses, jusqu'à présent très peu de travaux ont été publiés sur la biosynthèse des taxanes, surtout en ce qui attrait à la biosynthèse du noyau terpenoïque des taxanes.

Le groupe de Zamir a été le premier à confirmer que le noyau terpenoïque du taxol était formé de l'acétate et du mévalonate, tandis que la chaîne latérale était formée à partir de la phénylalanine (fig.12). Ces travaux (81) consistaient à incuber ces précurseurs marqués radioactivement en présence d'aiguilles broyées, d'homogénat ou de petites branches de Taxus canadensis. L'incorporation dans le taxol était ensuite mesurée. Un des volets des travaux de

recherche présentés dans les prochaines sections consiste à poursuivre cette étude mais en utilisant la technique de "Kinetic Pulse Labelling".

Strobel et ses collaborateurs ont également noté l'incorporation de l'acétate et de la phénylalanine dans le taxol, lors de leur étude sur les facteurs influençant la production de taxol dans Taxus brevifolia (82). Cette étude a été effectuée à l'aide de morceaux d'écorce de l'if du Pacifique incubés en présence de différents précurseurs marqués radioactivement et d'inhibiteurs de synthèse de stérols.

4.2.2 Biosynthèse de la chaîne latérale

Il y a quelques décennies Winterstein a obtenu, par hydrolyse acide d'un mélange de taxanes appelé taxine, un acide qu'il a appelé Winterstein (83,84). Cet acide est retrouvé dans la chaîne latérale de quelques taxanes, dont taxol et cephalomannine. Par la suite, des études ont démontré que dans Taxus baccata, l'acide de Winterstein était formé à partir de phénylalanine (85). Le précurseur marqué (DL-phénylalanine 3-¹⁴C) a été incorporé et transformé en acide de Winterstein (fig.13).

Les récents travaux de Floss (86) ont démontré que la chaîne latérale du taxol était formée via la voie métabolique de la phénylalanine (fig.14). Ces travaux consistaient à marquer radioactivement les intermédiaires des deux voies métaboliques proposées (voies de la phénylalanine et de l'acide cinnamique) et d'incuber séparément ces précurseurs en présence d'écorce de Taxus brevifolia selon la méthode décrite par Strobel (82).

Lors de l'incubation de la β -phénylalanine et de la phénylisosérine une incorporation a été notée dans les chaînes latérales du taxol et de

cephalomannine. De plus, d'après le spectre de masse de la chaîne latérale du taxol, il semblerait que la β -phénylalanine et la phénylisosérine auraient été incorporées dans le cycle benzoyl présent sur cette chaîne latérale. La conclusion des travaux de Floss est donc que la chaîne latérale se forme via la voie métabolique de la phénylalanine (voies a/d ou voies d/e de la figure 14) et non via l'acide cinnamique.

FIGURE 6: LES VOIES MÉTABOLIQUES DES PRODUITS NATURELS (78)

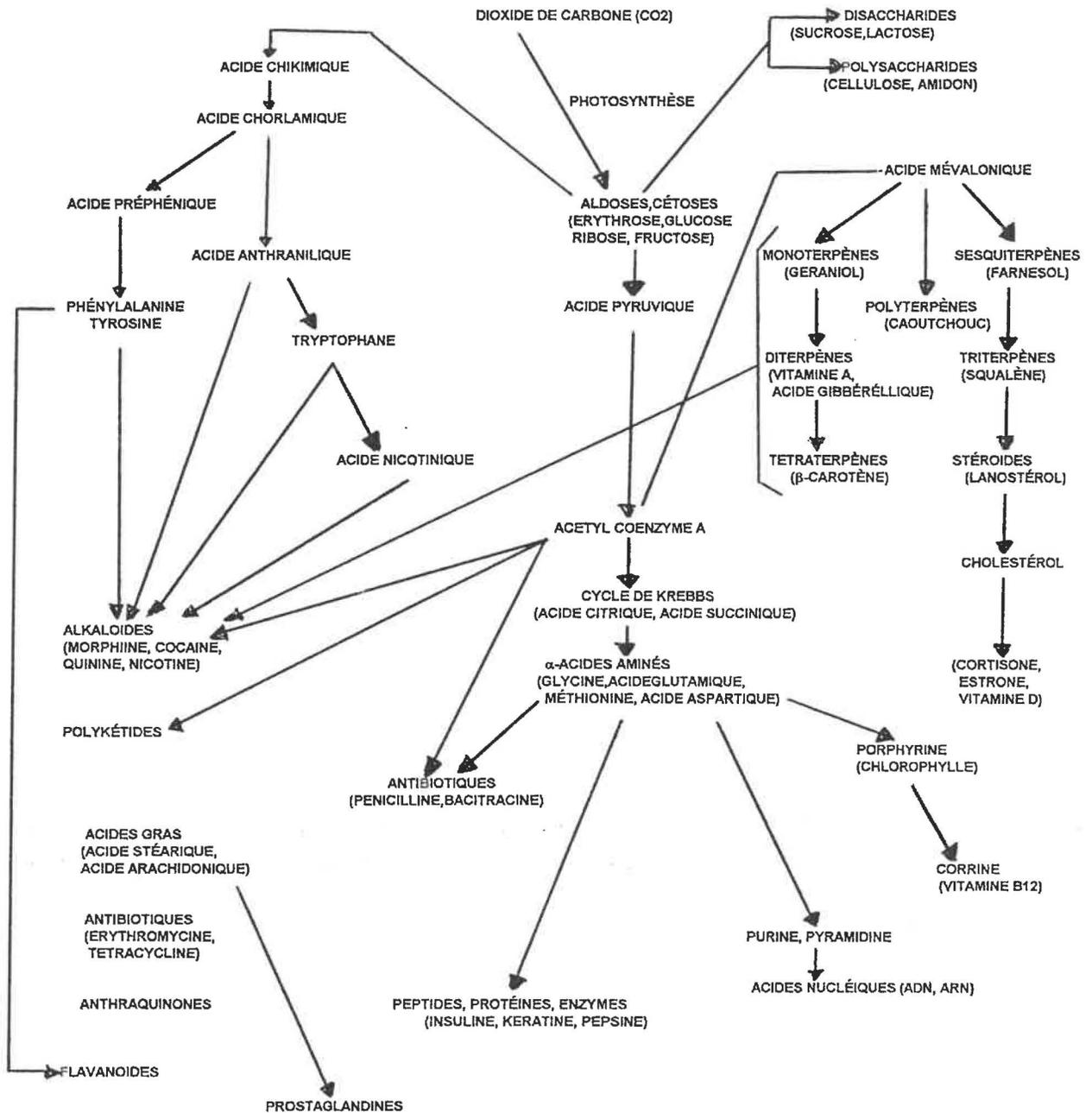


FIGURE 7: BIOGÉNÈSE DES TERPÈNES (79)

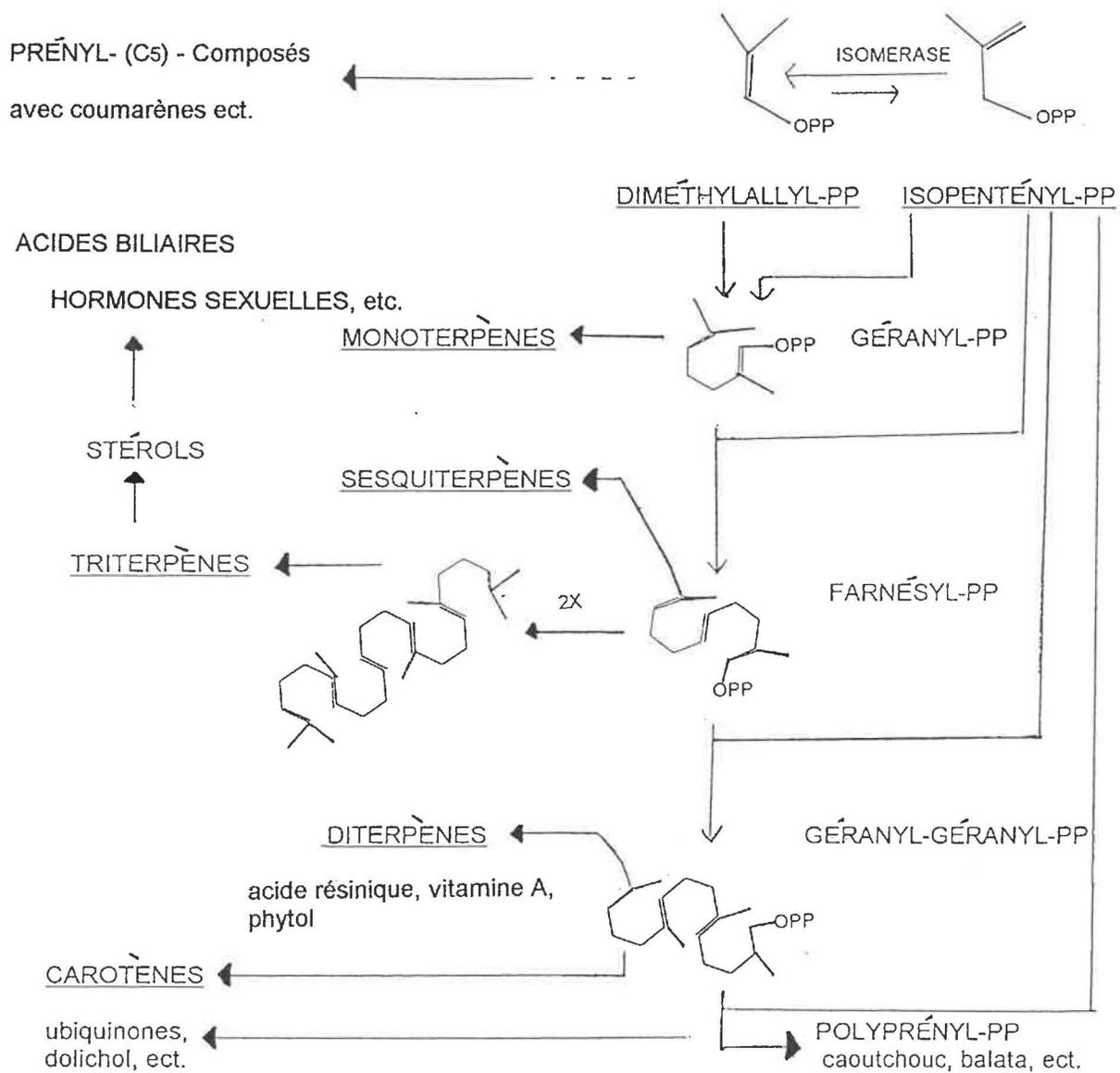


FIGURE 8: SCHÉMA DE LA BIOGÉNÈSE DES TAXANES

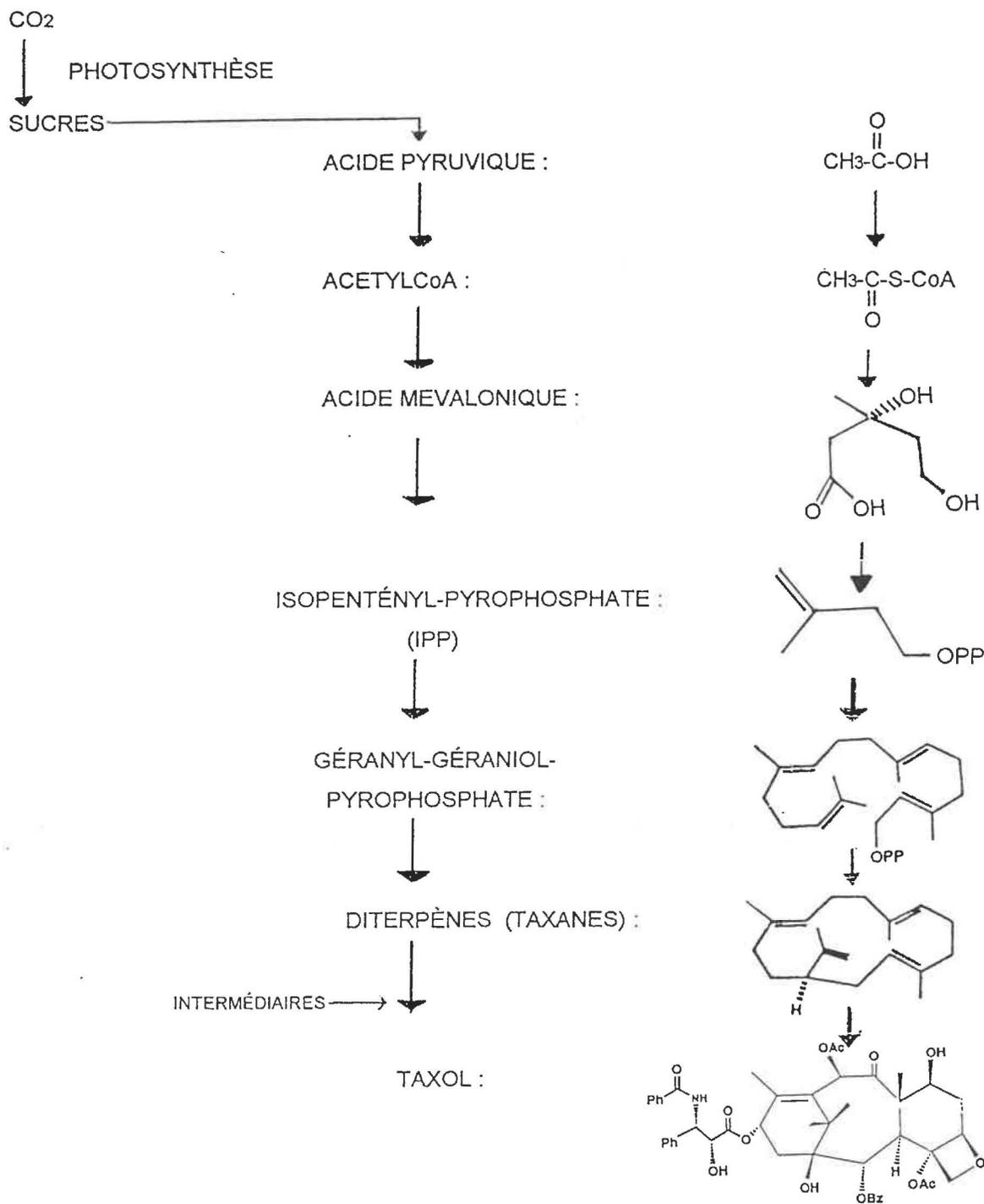


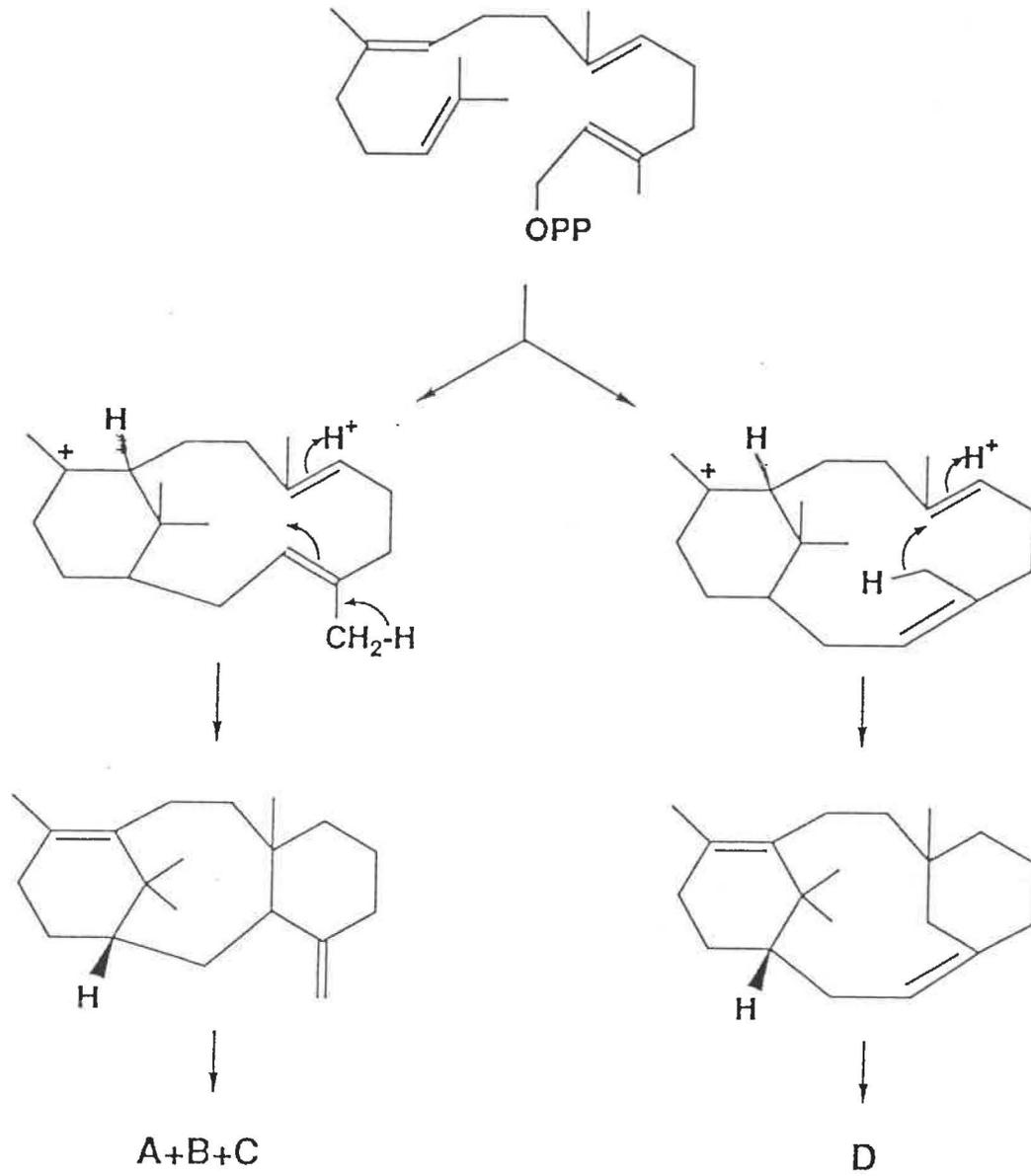
FIGURE 9: LA BIOGÉNÈSE DES TAXANES SELON POTIER (12)

FIGURE 10: HYPOTHÈSE SUR LA FORMATION DES TAXANES A, B ET C (12)

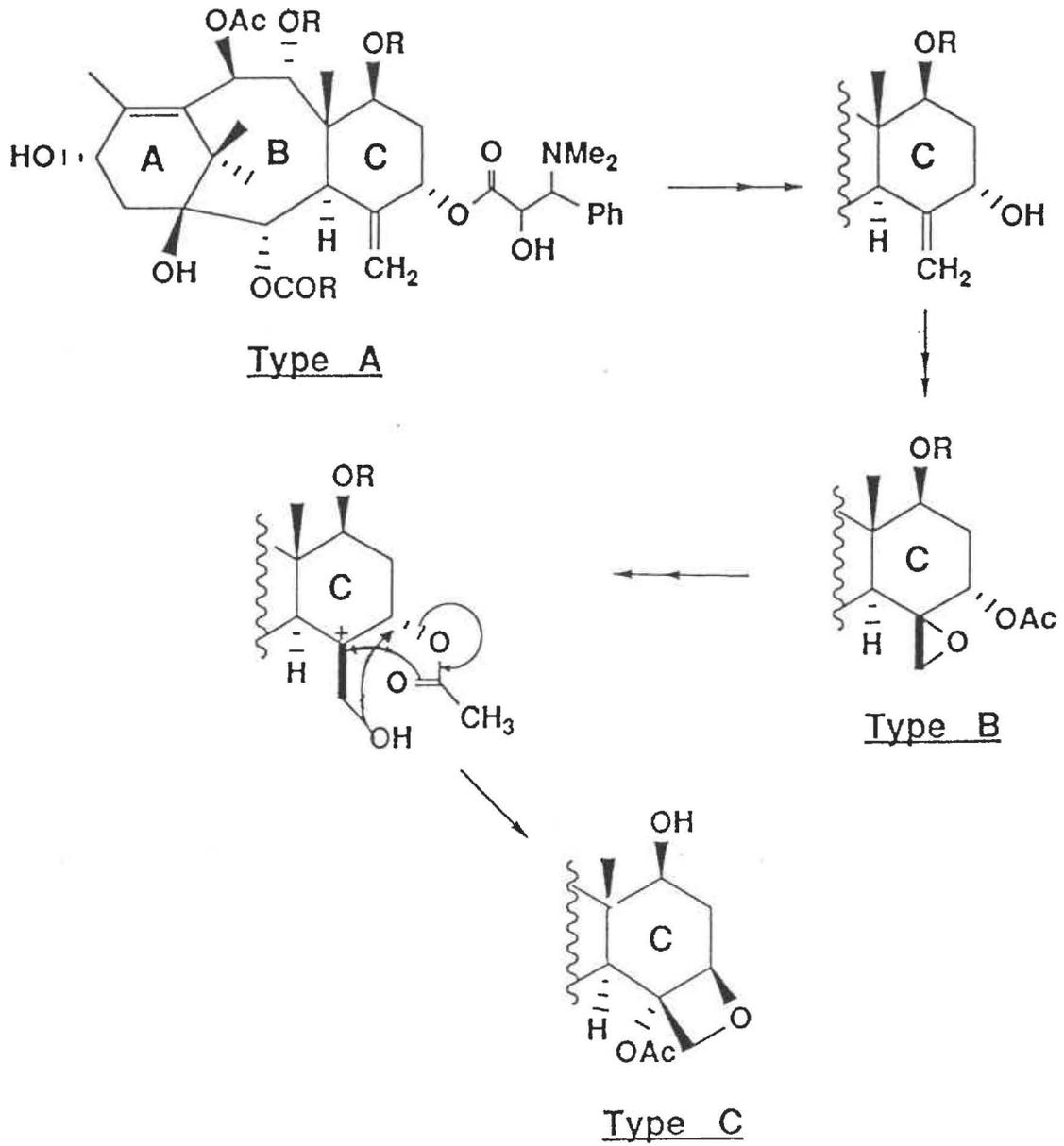


FIGURE 11: BIOGÉNÈSE DU CYCLE OXÉTANE SELON HALSALL (59)

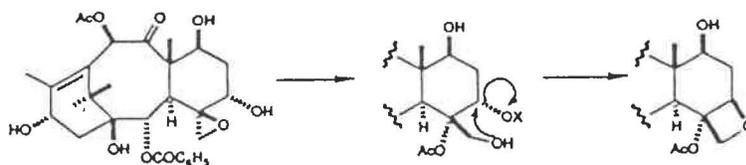
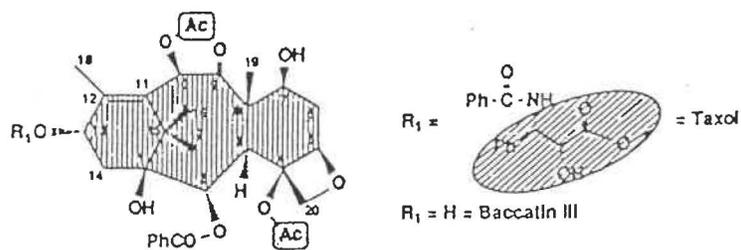


FIGURE 12: TRANSFORMATION DE LA PHÉNYLALANINE EN ACIDE DE WINTERSTEIN (88)

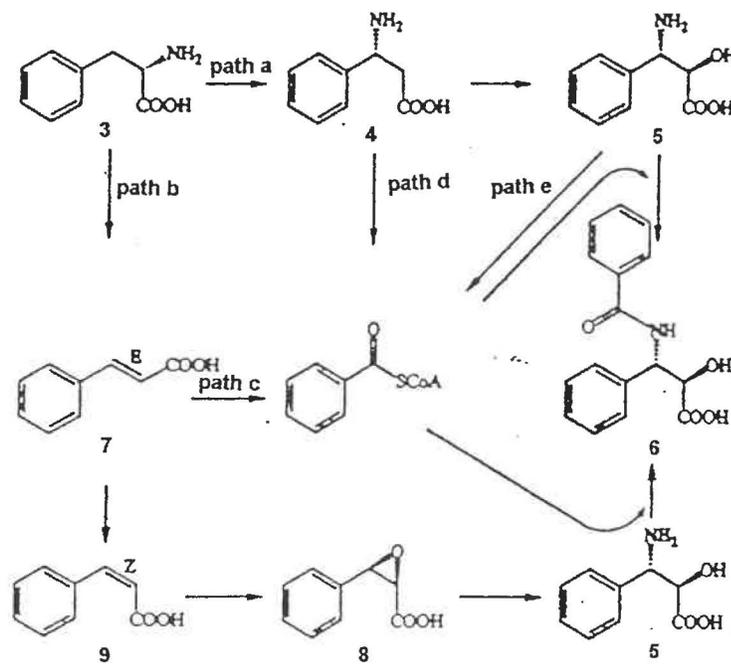


FIGURE 13: BIOSYNTHÈSE DES TAXANES (81)



Scheme 1: Biosynthesis of taxol: the different shadings emphasize the building blocks: acetate (.....), mevalonate (|||||) and phenylalanine (///).

FIGURE 14: HYPOTHÈSE DES DEUX VOIES MÉTABOLIQUES MENANT À LA FORMATION DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU TAXOL (86) (3. α -PHÉNYLALANINE, 4. β -PHÉNYLALANINE, 5. PHÉNYLISOSÉRINE, 6. CHAÎNE LATÉRALE DU TAXOL, 7. ACIDE CINNAMIQUE, 8. ACIDE CINNAMIQUE AVEC EPOXYDE.)



5. TECHNIQUE DE "KINETIC PULSE LABELLING"

La technique de "kinetic pulse labelling" (KPL) a été développée par Calvin lors de ses études sur la photosynthèse (87,88). Cette technique consiste à fournir aux algues un précurseur marqué aux radioisotopes (^{14}CO) et de suivre dans le temps l'incorporation du précurseur dans les différents produits extraits des algues. Le principe de base de cette technique est en fait de pouvoir suivre à l'aide de la radioactivité, l'ordre dans lequel sont formés *in vivo* différents métabolites.

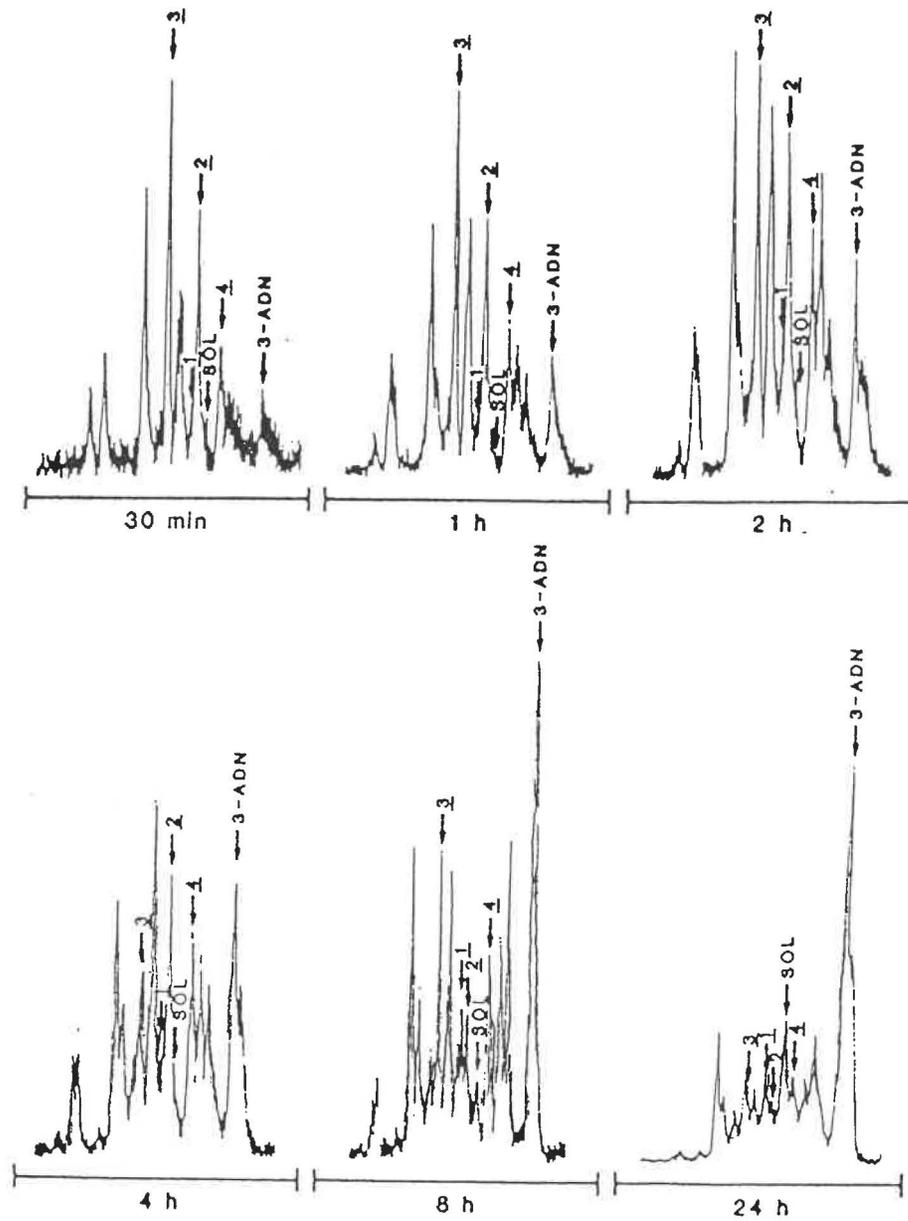
Cette technique qui n'a toutefois pas été très exploitée à des études de biosynthèse a été, par la suite, utilisée pour étudier la biosynthèse des terpénoïdes (89) et des alcaloïdes (90) chez les plantes. Elle a également servi à l'étude de la biosynthèse de métabolites secondaires produits par les champignons dont Penicillium patulum (91) et Fusarium culmorum (92).

La figure 15 présente un bel exemple des résultats d'un "Kinetic Pulse Labelling" effectué avec Fusarium culmorum (92). Cette expérience a été effectuée à l'aide d'un système de CLHP (chromatographie liquide à haute performance) muni d'un moniteur à radioactivité. Les pics représentés sur les chromatogrammes indiquent donc la radioactivité de chaque composé. Ce qui est intéressant de noter sur ces chromatogrammes est qu'au même moment où la formation de 3-acétyl-déoxynivalénol (3-ADN) a eu lieu, c'est-à-dire lors de l'augmentation du pic de radioactivité de 3-ADN, certains pics (2,3 et 4) diminuaient. Cela indiquait donc aux auteurs de cet article, que ces pics pouvaient

être des métabolites intermédiaires lors de la biosynthèse de 3-ADN, ce qui fut effectivement prouvé par la suite.

La technique de KPL est une méthode rapide permettant de différencier les intermédiaires biosynthétiques des composés ne menant pas au produit final ("dead-end metabolites"). Toutefois cette technique demeure qualitative. Pour une étude plus rigoureuse, il est nécessaire de fournir aux plantes ou aux champignons selon le cas, l'intermédiaire biosynthétique marqué pour s'assurer que celui-ci est bien transformé en un autre intermédiaire ou en le produit final du métabolisme étudié.

FIGURE 15: Étude de biosynthèse du composé 3-acétyldeoxynivalénol (3-ADN) dans *Fusarium culmorum*, effectuée à l'aide de la technique de "Kinetic Pulse Labelling" (92).



MÉTHODOLOGIE

1. ISOLEMENT DE NOUVEAUX TAXANES

1.1 Plantes utilisées

Les plantes de Taxus canadensis (aiguilles et petites tiges) utilisées dans cette expérience provenaient d'une forêt située dans la localité de St-Jean (sud de Montréal). Ces plantes ont été récoltées aux mois d'octobre 1991 et novembre 1992. Après leur récolte, les plantes ont été placées dans une chambre froide (en l'absence de lumière) dont la température était d'environ 4°C. Les plantes ont été placées dans des contenants remplis de terre humide jusqu'à leur utilisation. Ces conditions permettaient de garder les plantes fraîches.

1.2 Extraction des taxanes

1.2.1 Méthode no. 1

Les aiguilles et les petites tiges (120 grammes de plantes fraîches) ont tout d'abord été broyées (broyeur de marque Sunbeam, modèle Osterizer 10). Les plantes broyées ont par la suite, été placées dans un extracteur à soxhlet avec du dichlorométhane (1l) pendant 24 heures. Le solvant a été retiré et du nouveau solvant a été ajouté afin de poursuivre l'extraction pour une autre période de 24 heures. Le solvant des deux extractions, après filtration (filtres Whatman no.1), a été évaporé sous vide (évaporateur de marque Büchi, modèle RE121, muni d'un bain à température contrôlée, modèle 461).

1.2.2 Méthode no. 2

Les aiguilles et les petites tiges (170 grammes de plantes sèches) ont été broyées (Sunbeam, modèle Osterizer 10). Les plantes broyées ont été placées

dans un erlenmeyer de deux litres et un mélange de 1500 ml contenant du méthanol et du dichlorométhane (1:1) a été ajouté. L'erlenmeyer a été agité (agitateur à environnement contrôlé de marque New Brunswick Scientific) pour une période de 24 heures, à la température de la pièce. Le solvant a été retiré et du nouveau solvant a été ajouté aux plantes afin de poursuivre l'extraction pour une autre période de 24 heures. Le solvant des deux extractions a été filtré (filtres Whatman no.1) puis évaporé.

1.3 Élimination des lipides

Après l'évaporation, le résidu a été dissous dans un mélange d'eau et de méthanol, selon un rapport de 1:1. La quantité de solvant utilisée était en fonction de la solubilisation du résidu (environ 200 ml pour la méthode no.1 et 500 ml pour la méthode no. 2). La solution a été transvidée dans une ampoule à décanter, de l'hexane a été ajouté et le tout a été bien mélangé. Après la séparation des deux phases, la fraction hexane, contenant entre autres les produits lipidiques de la plante, a été éliminée. Ces étapes ont été répétées jusqu'à ce que la fraction hexane ne présente plus une coloration verte, c'est-à-dire lorsque la majeure partie des lipides (ex: la chlorophylle) a été éliminée (de 1000 à 2000 ml d'hexane au total)

La fraction polaire (MeOH et H₂O) a ensuite été extraite avec du dichlorométhane, solvant dans lequel les taxanes sont très solubles. L'extraction a été répétée jusqu'à ce la fraction polaire ne présente plus de coloration (de 1000 à 2000 ml de CH₂Cl₂ au total). Les fractions de dichlorométhane récupérées ont été asséchées quelques minutes avec du sulfate de magnésium, filtrées (filtres Whatman no.1) puis évaporées.

1.4 Fractionnement de l'extrait par chromatographie sur colonne

1.4.1 Méthode no.1

La méthode suivante a déjà été décrite par Whiterup et al (4). Les résidus de la fraction de dichlorométhane (2.42 grammes) ont été solubilisés dans de l'acétate d'éthyle (40 ml). Cette solution a été mélangée à 48.5 grammes de Celite-545 (Fisher Scientific), puis le tout a été transvidé dans un ballon. Le ballon a été placé à l'évaporateur à rotation à une température d'environ 40°C (Buchi, modèle RE121, muni d'un bain à température contrôlée, modèle 461). Après l'évaporation complète de l'acétate d'éthyle, la celite contenant les résidus a été compactée dans une colonne de 3 cm de diamètre contenant un "lit" de celite fraîche (environ 2.5 cm). Les solvants suivants ont ensuite été passés à travers la colonne: hexane (600 ml), CH₂Cl₂ (400 ml), MeOH (400 ml), EtOAc (400 ml). Un débit d'air était fourni au haut de la colonne afin d'obtenir un débit de solvant d'une goutte par minute ("Flash chromatography"). Le taxol et les autres taxanes étaient retrouvés dans la fraction de CH₂Cl₂. L'analyse par CLHP analytique des deux fractions suivantes (MeOH et EtOAc) a été effectuée dans le but de s'assurer que tous les taxanes avaient été élués dans la fraction CH₂Cl₂.

Le solvant de la fraction contenant les taxanes a été évaporé. Le résidu obtenu a été solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et mélangé à de la celite-545 (environ 10 grammes). Le tout a été placé à l'évaporateur (40°C) afin d'éliminer toute trace d'acétate d'éthyle.

Entre temps, une colonne de 3 cm de diamètre a été compactée de 12 cm de silicagel 60 (EM Science). La grosseur des particules de Silicagel était de 0.040-0.063 mm et de 230-400 de mèches. La celite contenant l'extrait a été compactée au dessus du silicagel. Un gradient de solvants (hexane et acétone) variant de 5% a été passé à travers la colonne. Le premier mélange de solvants était constitué de 75% d'hexane (300 ml) et 25% d'acétone (100 ml). Les mélanges suivants étaient constitués d'un rapport de solvants de: 70:30 (300 ml au total), 65:35 (300 ml), 60:40 (300 ml) et ainsi de suite jusqu'à ce que le solvant soit constitué à 100% d'acétone (300 ml). Toutes les fractions ont été analysées par CLHP analytique. Les taxanes étaient identifiés à l'aide de leur temps de rétention et leur spectre UV.

Les taxanes étaient concentrés dans les fractions 3 et 4, soit lors de l'élution des gradients de solvants constitués des rapports de 65:35 (hexane:acétone) et 60:40 (hexane:acétone). Les fractions ainsi obtenues ont été évaporées et les extraits ont été pesés (fr3: 137 mg et fr4 : 72 mg).

1.4.2 Méthode no. 2

L'extrait obtenu après l'élimination des lipides (16.1 grammes) a été solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle. Cette solution a été transvidée dans un ballon contenant 120 grammes de celite-545 et le tout a été bien mélangé avant de procéder à l'évaporation de l'acétate d'éthyle. La celite contenant l'extrait a ensuite été compactée dans une colonne contenant 150 grammes de Silicagel. Les mélanges suivants ont été passés à travers la colonne:

- 2000 ml de mélange de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (85:15)
- 2000 ml de mélange d'hexane et d'acétone (65:35)
- 800 ml de mélange d'hexane et d'acétone (60:40)
- 800 ml de mélange d'hexane et d'acétone (55:45)

Un débit d'air a été appliqué à la partie supérieure de la colonne afin d'obtenir en débit de solvant d'une goutte par minute ("flash chromatography"). Le solvant était collecté dans des erlenmeyers de 125 ml, chaque erlenmeyer (chaque fraction) contenait environ 75 ml de solvant. Les taxanes étaient concentrés dans les fractions où le gradient d'élution était de 65:35 (hexane:acétone). Les fractions collectées lors de l'élution des mélanges suivants ont été analysées par CLHP analytique, afin de s'assurer qu'il n'y avait plus présence de taxanes. Le solvant des fractions contenant les taxanes a été évaporé.

1.5 Séparation et purification par chromatographie liquide à haute performance

Les produits de la plante contenus dans les fractions intéressantes ont tout d'abord été séparés par CLHP semi-préparatif afin d'effectuer une première purification. L'avantage de travailler en CLHP semi-préparatif est que l'on peut injecter une plus grande quantité de produits à la fois.

La séparation a été réalisée à l'aide d'un instrument de Waters modèle Delta Prep 3000, relié à un détecteur UV modèle Lambda-Max 481 à longueur d'ondes ajustable et à un enregistreur de Perkin-Elmer modèle 024. Deux colonnes ODS-2 Mag-9 (Whatman) à phase inversée étaient reliées en série (9.4mm X 500 mm) et le débit de la phase mobile était de 3 ml/ min. Cette phase

mobile était constituée d'un mélange de deux solvants soit de l'eau déionisée et de l'acétonitrile (grade CLHP). La séparation a été effectuée à l'aide d'un gradient de solvants linéaire de 70 minutes. Initialement, le rapport de solvants était de 75:25 (eau: acétonitrile) alors qu'après 70 minutes l'acétonitrile constituait 100% de la phase mobile. Le détecteur UV était ajusté à 227 nm. Les échantillons étaient solubilisés dans du méthanol à une concentration approximative de 20 mg /ml, filtrés (filtre de 0.45µm) puis injectés manuellement.

La purification des composés a été effectuée à l'aide d'un système de CLHP analytique. L'instrument de Perkin Elmer modèle 250 était muni d'un système de pompes binaires. L'appareil était relié à un détecteur UV à photodiode modèle 235 de Perkin Elmer, à une imprimante de même modèle ainsi qu'à un ordinateur NEC APC IV permettant l'analyse des données. La séparation a été effectuée à l'aide de deux colonnes à phase inversée ODS-2, partisil-10 de Whatman. Les deux colonnes étaient reliées en série (4.6 X 500 mm). L'injection des échantillons était effectuée manuellement et le débit de la phase mobile a été réglé à 1.0 ml/min. Les conditions de séparation étaient les mêmes que celles de la méthode préparative, à l'exception du gradient qui était de 50 minutes. Les échantillons ont été solubilisés dans du méthanol et une quantité maximale de 1 mg était injectée à la fois.

1.6 Lyophilisation

Après la purification des composés, l'acétonitrile a été évaporé. Les composés ont ensuite été refroidis dans de la glace sèche (avec quelques traces d'acétone) puis ils ont été placés à la lyophilisation (lyophilisateur de Virtis equipment modèle 10MR-ST) toute une nuit afin d'éliminer l'eau.

1.7 Caractérisation

Les composés purifiés ont, par la suite, été envoyés à l'Université McGill afin de procéder à des tests de RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) et de MS (Spectrométrie de Masse) pour la caractérisation de leur structure. Ces tests ont été effectués par les Dr. Françoise Sauriol et Orval Mamer . L'interprétation respective des analyses a été effectuée par les chimistes du groupe aidés du Dr. Zamir, Dr. Sauriol et Dr. Mamer.

2. TECHNIQUE DE "KINETIC PULSE LABELLING"

Deux méthodes ont été utilisées pour l'application de cette technique. La première méthode consistait à ajouter le précurseur radioactif à un mélange d'aiguilles broyées et de solution nutritive alors que la seconde méthode, le précurseur radioactif a été ajouté à un homogénat préparé à partir des aiguilles de la plante. Ces méthodes ont été choisies en se référant à des travaux précédents (81), effectués par un membre du laboratoire. Ces travaux consistaient à comparer l'incorporation des précurseurs dans le taxol à partir de trois méthodes soient 1), 2) les deux méthodes choisies pour l'application de la technique de KPL et 3) une méthode selon laquelle de petites branches étaient trempées dans une solution nutritive contenant les précurseurs. L'incorporation des précurseurs lors de l'utilisation des techniques 1 et 2 s'est avérée supérieure à celle utilisant la méthode 3. La méthode utilisant les petites branches aurait pu présenter certains avantages étant donné le fait que les tissus de la plante ne sont pas endommagés. Cependant cette méthode requiert une très grande quantité de précurseurs radioactifs et, de plus, elle engendre un très faible rendement d'incorporation dans le taxol.

2.1 Technique de "KPL" utilisant une préparation d'aiguilles broyées.

2.1.1 Plantes utilisées

Les plantes de Taxus canadensis utilisées dans cette expérience provenaient d'une forêt située dans la localité de St-Jean (sud de Montréal). Ces plantes ont été récoltées à la fin du mois de mai 1993. Après leur récolte, les plantes ont été placées dans une chambre froide (en l'absence de lumière) dont la

température était d'environ 4°C. Les plantes ont été placées dans des contenants remplis de terre humide jusqu'à leur utilisation. Ces conditions permettaient de garder les plantes fraîches.

Dans cette expérience, seules les nouvelles pousses ont été utilisées. Ces nouvelles pousses se distinguent très bien par leur couleur verte tendre. Elles sont situées à l'extrémité de chaque branche et on les retrouve seulement au printemps.

2.1.2 Préparation des échantillons

Des aiguilles de plantes fraîches ont été broyées (broyeur de marque Sunbeam, modèle Osterizer 10) afin d'obtenir une quantité totale de 60 grammes de tissus. Les aiguilles broyées, après avoir été bien mélangées, ont été distribuées dans 60 flacons de verre de 20 ml, soit 1 gramme par flacon. L'expérience nécessitait la préparation de 60 flacons soient; 20 échantillons, 20 duplicatas et 20 contrôles. Les contrôles ne contenaient aucune radioactivité. Ils étaient utilisés dans le but de vérifier la contamination et de permettre une comparaison avec les chromatogrammes des échantillons radioactifs.

Dans chaque flacon, cinq millilitres de solution nutritive de Hoagland (93) ont été ajoutés.

2.1.2.1 Préparation de la solution d'Hoagland

La solution d'Hoagland est un mélange d'une solution de macronutriments et d'une solution de micronutriments.

A) Préparation de la solution de macronutriments

Les éléments ci-dessous sont solubilisés dans un litre d'eau déionisée;

	g/l
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.94
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.52
KNO ₃	0.66
NH ₄ H ₂ PO ₃	0.12
EDTA	0.0336
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0278

B) Préparation de la solution de micronutriments

Les éléments ci-dessous sont solubilisés dans un litre d'eau déionisée;

	g/l
H ₃ BO ₃	28
MnSO ₄ .H ₂ O	34
CuSO ₄ .H ₂ O	1.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.2
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ .H ₂ O	1.0
H ₂ SO ₄	5.0 ml

Après la préparation de ces deux solutions, 0.1ml de solution de micronutriments (B) est ajoutée à un litre de (A). Le PH de ce mélange a été ensuite ajustée à 6.7 à l'aide de solutions 0.1 N de HCl et de NaOH(Fisher Scientific).

En se référant aux travaux précédents sur la biosynthèse du taxol (82), 40mM de dithiothréitol (DTT) ont été ajoutés aux 60 flacons. Lors des travaux de Strobel (82), l'incorporation des précurseurs dans le taxol n'était possible que lorsqu'il y avait présence d'un agent réducteur, comme le dithiothréitol, dans le milieu. Un molaire (1M) de DTT équivaut à 154.2 g., donc 20 mg de dithiothreitol ont été dissouts dans 5 ml d'eau déionisée et 75 μ l de cette solution a été ajouté aux mélanges de tissus.

En dernier lieu, le précurseur radioactif a été ajouté aux échantillons excluant les contrôles. Le précurseur (New England Nuclear) était constitué d'acétate marqué au tritium (C^3H_3COONa) dilué dans une solution d'éthanol et datait du 13 mai 1983. A cette date, la radioactivité de la solution était de 90.0 mCi/ mmol (25 mCi dans 2.5 ml d'EtOH). La radioactivité ajoutée dans chaque flacon a été de 0.2mCi.

2.1.2.2 Calcul de la radioactivité à ajouter dans les échantillons

Au moment de l'expérience (07/06/93), l'isotope datait de plus de 10 ans. La demi-vie du tritium étant de 12.3 ans, c'est-à-dire qu'à cette date la radioactivité de l'isotope équivalait à 50 pourcent de sa valeur initiale. Il était donc nécessaire de calculer la quantité de solution radioactive requise à cette

cette date pour obtenir la valeur de radioactivité désirée. Pour trouver cette valeur, nous avons tout d'abord effectué un calcul théorique pour ensuite le vérifier pratiquement. Nous avons procédé comme suit:

Calcul théorique

Une bouteille contient 25 mCi d'isotopes pour 2.5 ml d'EtOH. Pour l'expérience nous voulions ajouter 0.2 mCi par échantillon donc d'après le calcul suivant:

$$\frac{0.2 \text{ mCi} \times 2.5 \text{ ml}}{25 \text{ mCi}} = 0.02 \text{ ml de solution radioactive}$$

On peut exprimer la radioactivité en dpm (désintégrations par minute) Pour convertir la valeur de 0.2 mCi en dpm il suffit d'effectuer la règle de trois suivante:

$$\begin{array}{l} 1 \mu\text{Ci} \quad \text{-----} \rightarrow 2.22 \times 10^6 \text{ dpm} \\ 200 \mu\text{Ci} \quad \text{-----} \rightarrow \quad x \text{ dpm} \quad \quad \text{où } x = 4.44 \times 10^8 \text{ dpm} \end{array}$$

En se référant à des tableaux fournis avec le manuel d'instructions du compteur à scintillation (appareil mesurant la radioactivité) ou encore à l'aide de la formule ci-dessous, on peut trouver le facteur de correction de la radioactivité (C).

$$C = \frac{100}{\text{Antilog } 0.3010 \quad (A/B)}$$

(A) = nombres d'années de l'isotope

(A) = 10.25 années

(B) = Demi-vie de l'isotope

(B) = 12.3 années

(C) = facteur de correction de la radioactivité

(C) = 55.1% ou 0.561

En multipliant le facteur de correction à la radioactivité on a obtenu:

$$0.2 \text{ mCi} \times 0.561 = 0.112 \text{ mCi}$$

Ce qui voulait dire qu'à cette date 0.02 ml équivalait à 0.112 mCi. Pour trouver la quantité d'EtOH correspondant à 0.2 mCi, il suffisait d'effectuer la règle de trois suivante:

$$\frac{0.2 \text{ mCi} \times 0.02 \text{ ml}}{0.112 \text{ mCi}} = 0.0357 \text{ ml ou } \underline{36 \mu\text{l}}$$

Vérification des calculs théoriques

Pour confirmer ces calculs, cinq microlitres d'isotope ont été dilués dans 3000 μl de MeOH. Ensuite, cinq microlitres de cette dilution ont été mesurés au compteur à scintillation (description de l'appareil à la section 2.1.7). La valeur obtenue a été de 44742.9 cpm (comptes par minute) ou, après conversion (ref. à la section 2.1.7.2) de 86008 dpm (désintégrations par minute). La quantité de

radioactivité contenue dans cinq microlitres de solution d'isotope a été calculé ainsi:

$$\frac{86008 \text{ dpm} \times 3000 \mu\text{l (volume de la dilution)}}{5 \mu\text{l (échantillon mesuré)}} = 51604800 \text{ dpm}$$

D'après les calculs théoriques, 36 μl contenaient 0.2 mCi de radioactivité. Voyons maintenant ce que donne les résultats pratiques:

$$\frac{51604800 \text{ dpm} \times 36 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l (quantité d'isotope prélevée)}} = 3.72 \times 10^8 \text{ dpm}$$

Cette valeur se compare assez bien à la valeur théorique de 4.44×10^8 dpm. Donc, 36 μl ont été ajoutés à tous les échantillons (sauf les contrôles) cependant, lors du calcul du pourcentage d'incorporation il est important de tenir compte de la valeur mesurée (3.72×10^8) et non de la valeur théorique (4.44×10^8).

Après l'ajout de tous ces éléments, les flacons ont été recouverts d'un capuchon et placés dans un agitateur à environnement contrôlé de marque New Brunswick Scientific couplé à un bain réfrigérant de même marque modèle RF-10. L'agitation a été réglée à 220 rpm et la température à 27°C. D'après les travaux de Strobel (82) sur la biosynthèse du taxol, cette température était la température optimale pour l'incorporation des précurseurs dans le taxol.

2.1.3 L'échantillonnage

Les échantillons ont été incubés ainsi selon le temps de contact désiré entre le précurseur radioactif et les produits de la plante. Lors de cette expérience, les trois premiers échantillons ont été retirés de l'agitateur après cinq jours d'incubation (un échantillon, un duplicata et un contrôle). Par la suite, à tous les jours, trois échantillons ont été retirés de l'agitateur jusqu'au jour 23 ainsi qu'une dernière série d'échantillons au jour 28. Les échantillons ont ensuite été placés dans un congélateur à une température de -80°C , jusqu'à ce qu'on procède aux prochaines étapes.

2.1.4 Extraction des taxanes

L'étape suivante consistait à éliminer l'eau contenue dans les échantillons. Cette eau provenait des aiguilles et en majeure partie, de la solution d'Hoagland. Pour ce faire, les échantillons congelés ont été placés toute une nuit à la lyophilisation (lyophilisateur de Virtis Research Equipment, modèle 10 MR-ST).

Pour chaque échantillon, les taxanes ont été extraits des plantes asséchées à l'aide d'un mélange de 20 ml de méthanol et de dichlorométhane (1:1). Les aiguilles ont été transférées dans un erlenmeyer de 50 ml et le mélange de solvants a été ajouté aux aiguilles. L'erlenmeyer a ensuite été placé à l'agitation (200 rpm) à la température de la pièce. Après 24 heures, le solvant a été filtré (filtre Whatman no.1) et 20 ml de nouveau solvant ont été rajoutés aux aiguilles. L'erlenmeyer a été placé pour un autre 24 heures à l'agitation. Le

solvant de la seconde extraction a été également filtré afin d'éviter la présence d'aiguilles dans l'extrait. Le solvant des deux extractions a été récupéré dans un ballon de 100 ml se fixant à un évaporateur de marque Buchi, modèle RE121, muni d'un bain modèle 461. L'évaporation a été effectuée sous vide. L'extrait obtenu contenait les taxanes et autres produits de la plante (lipides) ainsi que les sels de la solution d'Hoagland.

2.1.5 Élimination des sels

Avant de procéder à l'analyse des échantillons par chromatographie liquide à haute pression (CLHP), les sels de l'extrait ont dû tout d'abord être éliminés. Pour ce faire, l'extrait a été solubilisé dans 50 ml de CH_2Cl_2 et transféré dans une petite ampoule à décanter. À cela ont été ajoutés 25 ml d'eau déionisée et puis le tout bien mélangé. Après la séparation des deux phases, la fraction aqueuse (fraction inférieure) a été retirée. Les étapes à partir de l'ajout de l'eau déionisée ont été répétées à trois autres reprises. Les taxanes sont très peu solubles dans l'eau et très solubles dans le dichlorométhane, donc les taxanes restent dans la phase organique. Les sels et autres produits non désirables sont solubilisés dans la fraction aqueuse et sont ainsi éliminés.

La fraction organique a été transvidée dans un ballon à évaporation et évaporée sous vide. Selon les échantillons, le poids de l'extrait variait entre 15 et 20 mg.

NOTE

Une attention spéciale à la radioactivité a dû être portée tout au long des étapes précédentes. Il était important de ne pas contaminer les échantillons avec de la radioactivité provenant d'autres échantillons. Donc, la vaisselle utilisée devait être lavée de toute radioactivité avant d'être utilisée pour d'autres échantillons. Il en était de même pour tout le matériel utilisé.

Le savon de décontamination utilisé était du DEKASOL TM (ICN Biochemicals). Le matériel contaminé non réutilisable (pipettes pasteur, embouts de plastique, gants...) ainsi que le solvant radioactif ont été jetés dans des contenants respectifs de récupération.

2.1.6 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

L'extrait final de chaque échantillon a été solubilisé dans 1.5 ml de méthanol et 50 µl de cette solution ont été injectés sur CLHP analytique. L'analyse des échantillons a été effectuée selon les mêmes conditions décrites à la section 1.5. Le chromatogramme présentant la séparation des composés de l'extrait était visualisé sur l'écran de l'ordinateur et permettait ainsi la collecte des pics du chromatogramme. Seuls les pics ayant des temps de rétention correspondant aux temps de rétention des taxanes étaient collectés. Les pics étaient récupérés dans des flacons de plastique de 20 ml pour compteur à scintillation.

2.1.7 Mesure de la radioactivité

La radioactivité contenue dans les flacons a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation de Tracor Analytic, modèle Delta 300. Avant de mesurer la radioactivité, quatre millilitres de liquide à scintillation (Ultima Gold XR de Packard Instruments B.V.) ont été ajoutés à chaque flacon contenant les pics

collectés. Par la suite, les flacons devaient être très bien mélangés afin que l'échantillon soit bien solubilisé dans le liquide à scintillation. Avant de procéder à la lecture de la radioactivité, les flacons étaient laissés au repos jusqu'à ce que le mélange présente un aspect clair car après l'agitation, la solution devenait blanchâtre et pouvait fausser la lecture.

La mesure a été effectuée à la température de la pièce. Le temps de comptage a été ajusté à 10 minutes ou jusqu'à l'obtention de 40 000 comptes (précision statistique de 1%). Après la lecture de chaque échantillon, l'enregistreur inscrivait les données suivantes:

- le numéro de l'échantillon
- le temps de comptage
- les comptes par minutes (cpm) dans le canal du tritium (^3H)

Cette valeur représente la mesure de la radioactivité en cpm contenue dans notre échantillon.

- les comptes par minutes (cpm) dans le canal du ^{14}C :

Non- applicable dans notre cas.

- le rapport de la radioactivité entre les deux canaux (SCR: sample channels ratio): Cette valeur est utilisée lors de la mesure de la radioactivité en présence de deux isotopes (^3H et ^{14}C) dans l'échantillon: non-applicable à nos expériences
- le ratio du standard externe (ESR: external standard ratio):

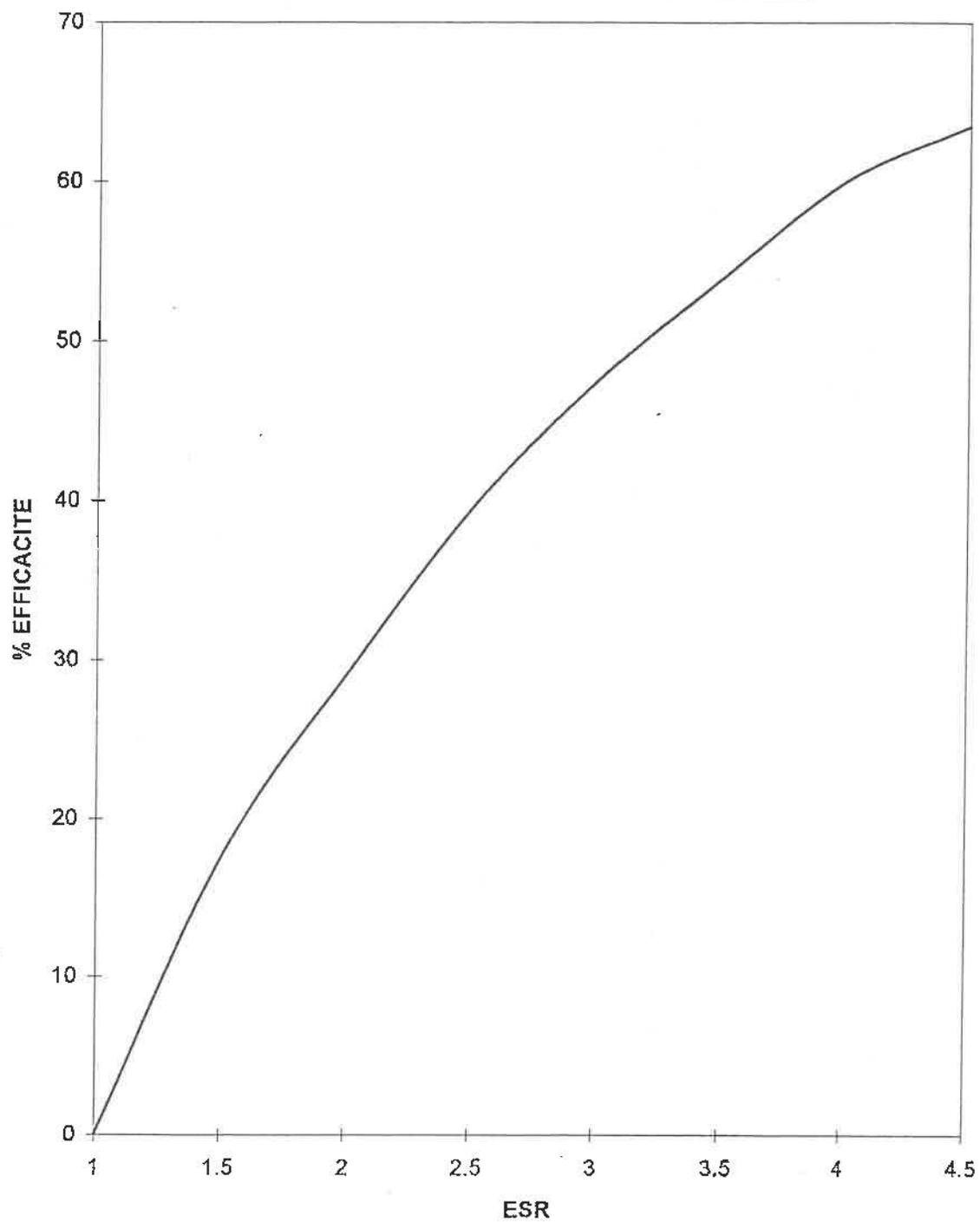
Le standard externe est une source de Barium-133 de 9 μCi . Pour obtenir la valeur de ESR, l'appareil effectue deux lectures. Le premier comptage calcule l'activité totale contenue dans l'échantillon et dans le standard externe. Le deuxième comptage mesure l'activité du standard externe seulement. La valeur de ESR représente la valeur nette du compte de Ba-133. Cette valeur varie légèrement d'un échantillon à l'autre, selon le "quench" de l'échantillon, c'est-à-dire selon l'efficacité de la lecture de l'échantillon. Cette valeur de ESR est utilisée pour la conversion des données de l'appareil (cpm) en dpm (désintégrations par minute).

La valeur en cpm doit par la suite être convertie en dpm (désintégrations par minute). Ceci a été fait à l'aide d'une courbe de conversion qui tient compte de l'efficacité de la lecture de l'appareil. La couleur de l'échantillon à mesurer et le solvant dans lequel est dissous l'échantillon peuvent diminuer l'efficacité de la lecture de l'appareil ("quench") et ainsi donner un compte inférieur à la radioactivité présente dans l'échantillon. C'est pour cette raison qu'il est important de convertir les valeurs avant d'analyser les résultats.

2.1.7.1 Courbe standard de conversion des cpm en dpm pour le tritium (^3H)

Cette courbe (fig.16) met en corrélation le pourcentage d'efficacité de lecture (en ordonné) et la valeur du ratio du standard externe (en abscisse).

Cette courbe a été construite à l'aide de standards fournis avec le compteur à scintillation. Tous les standards contenaient la même radioactivité

FIGURE 16: COURBE STANDARD DU TRITIUM

cependant un agent (solvant) changeant l'efficacité de la lecture a été ajouté en concentration différente aux standards. La radioactivité (tritium) contenue dans chaque standard était de 0.046 μCi et les standards dataient de 14.6 ans. La valeur corrigée de radioactivité contenue dans les standards a été calculée comme décrit à section 2.1.2.2. La valeur obtenue était de 44804 dpm.

Le pourcentage d'efficacité de lecture dans chaque standard a été calculé ainsi:

$$\% \text{ d'efficacité} = \frac{\text{valeur en cpm}}{\text{valeur corrigée en dpm}} \times 100$$

La valeur en cpm représente la valeur mesurée par l'appareil, alors que la valeur corrigée en dpm représente la radioactivité contenue dans les standards (44804 dpm).

Lors de la mesure de la radioactivité des standards, l'appareil nous donnait également la valeur de ESR. La courbe standard a donc été construite en placant les point suivants sur le graphique:

# standards	% d'efficacité (ordonnée)	ESR (abscisse)
1	62.0	4.277
2	56.1	3.619

# standards	% d'efficacité (ordonnée)	ESR (abscisse)
3	48.7	3.107
4	40.5	2.587
5	30.5	2.085
6	11.6	1.252

2.1.7.2 Conversion des cpm en dpm

Lors de la mesure de la radioactivité des échantillons, l'appareil donnait pour chaque échantillon, une valeur de ESR. Cette valeur nous permettait d'extrapoler le pourcentage d'efficacité de lecture à l'aide de la courbe de conversion. La valeur extrapolée nous permettait, par la suite, de convertir les cpm en dpm.

Les cpm ne représentent qu'un certain pourcentage de la valeur de la radioactivité contenue dans l'échantillon, alors que les dpm représentent la "vraie" valeur de radioactivité:

x dpm -----> 100 % de la radioactivité dans l'échantillon

x cpm -----> % d'efficacité de lecture de la radioactivité dans
l'échantillon

Donc pour convertir les cpm en dpm, il suffit d'effectuer cette règle de trois:

$$\text{dpm} = \frac{\text{valeur en cpm}}{\% \text{ d'eff. de lecture}}$$

2.2 Technique de "KPL" utilisant un homogénat

Cette méthode consistait à ajouter les précurseurs radioactifs à un homogénat préparé à partir des aiguilles de Taxus canadensis.

2.2.2 Plantes utilisées

Les plantes de Taxus canadensis utilisées pour cette expérience provenaient du même endroit (St-Jean) que celles utilisées lors de l'expérience précédente. Les plantes ont été récoltées à la fin du mois de novembre 1993. Elles ont, par la suite, été placées dans une chambre froide (4°C) en l'absence de lumière. Elles ont été gardées sous ces conditions jusqu'à leur utilisation. Pour cette expérience, la seule partie de la plante utilisée était les aiguilles (la plante ne présentait pas de nouvelles pousses étant donné la saison de récolte).

2.2.2 Préparation de l'homogénat (94)

Les aiguilles de Taxus canadensis ont tout d'abord été rincées avec de l'eau déionisée (2X) afin d'enlever le maximum de terre et de saletés possibles. La quantité d'aiguilles préparées est en fonction de la quantité d'homogénat désiré (1ml d'homogénat nécessite environ 1 gramme d'aiguilles).

Les aiguilles rincées ont par la suite été broyées dans une solution tampon de borate phosphate où différents éléments étaient ajoutés afin d'assurer une bonne activité enzymatique dans l'homogénat.

Pour la préparation de l'homogénat, les étapes suivantes ont été effectuées dans une chambre froide (4°C). Les aiguilles ont été broyées (broyeur Sunbeam, modèle Osterizer 10) dans la solution tampon (100 ml de solution pour 50 g de plantes) quelques secondes (30 sec.) à basse vitesse puis quelques secondes à haute vitesse. La préparation a ensuite été filtrée à travers quatre couches d'étamine (cheese-cloth). Le filtrat a été centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse de Sovall Instruments, modèle RC5C munie d'un rotor SS-34. Les conditions de centrifugation étaient de 10 000 rpm, 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu correspond à l'homogénat. Le volume d'homogénat désiré pour l'expérience a été transvidé dans un erlenmeyer de 50 ml.

Préparation de la solution tampon de borate phosphate

La solution tampon est un mélange de deux solutions soient:

- A) Une solution de phosphate de potassium (KH_2PO_4) de 0.1M (1.3609 g dilués dans 100 ml d'eau déionisée).
- B) Une solution de borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) de 0.05M (1.90685 g. dilués dans 100 ml d'eau déionisée).

La solution tampon de borate phosphate contient 53.6 ml de solution A et 46.4 ml de solution B. Le PH de la solution de borate phosphate est par la suite ajusté à 7.5 à l'aide de ces deux solutions. Les éléments suivants sont ajoutés à la solution tampon: 5mM d'acide ascorbique (0.08806g) , 2mM de DTT

(0.03084g) , 3mM d'EDTA (0.10086g) , 0.2M de saccharose (6.846g) et du PVP (1 g).

2.2.3 Ajout du précurseur radioactif à l'homogénat

Le précurseur radioactif a été ajouté aussitôt à la préparation de l'homogénat terminée. Le précurseur était de l'acétate marqué au tritium (C^3H_3COONa) et la radioactivité ajoutée à l'erlenmeyer était de 0.12 mCi par ml d'homogénat. Les spécifications de l'acétate ainsi que le calcul du volume de précurseurs à ajouter (valeur corrigée de la radioactivité) sont décrits à la section 2.1.7. L'erlenmeyer a ensuite été agité (200 rpm et 25°C) dans un agitateur à environnement contrôlé (New Brunswick Scientific) muni dans bain réfrigérant (RF-10).

note

Les échantillons contrôles ont été prélevés avant l'ajout de l'isotope (temps 0) ou bien ils ont été prélevés à partir d'un homogénat placé à l'agitation (mêmes conditions) mais où aucun précurseur n'avait été ajouté.

2.2.4 L'échantillonnage

L'homogénat a été incubé dans l'agitateur selon le temps de contact désiré entre le précurseur et les produits de la plante. À des temps choisis, 1 ml d'échantillon a été prélevé de l'homogénat à l'aide d'une pipette. Dans la première expérience avec l'homogénat, les temps d'échantillonnage étaient de: 1 heure, 5 heures, 1 jour jusqu'à 14 jours. Lors de la deuxième expérience, les temps d'échantillonnage étaient de: 30 minutes, 1 heure, 3 heures, 5 heures,

7 heures et 24 heures. À chaque temps, les échantillons étaient prélevés en duplicatas.

2.2.5 Extraction des taxanes

Les taxanes contenus dans les échantillons de 1 ml d'homogénat, ont été extraits à l'aide de 100 ml de dichlorométhane. Pour ce faire, l'échantillon a été mélangé à 25 ml de dichlorométhane dans une ampoule à décanter. Après la séparation des deux phases, le dichlorométhane a été récupéré (fraction inférieure) et évaporé. À la phase aqueuse (homogénat) de l'ampoule à décanter, du dichlorométhane (25 ml) a été rajouté et les étapes précédentes ont été répétées. Ceci a ensuite été effectué à deux autres reprises.

Après l'évaporation de la fraction organique, l'extrait obtenu (1.5 à 3.0 mg selon les échantillons) a été solubilisé dans 250 µl d'acétone et 50 µl de cette solution a été injecté en CLHP analytique.

2.2.6 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) analytique

L'analyse des échantillons par CLHP analytique a été effectuée selon les conditions décrites à la section 2.1.6.

2.2.7 Mesure de la radioactivité

La radioactivité contenue dans les pics collectés à partir du chromatogramme du CLHP analytique, a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. La description de cet appareil ainsi que la description de l'expérimental sont décrites à la section 2.1.7.

3. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON PRÉLEVÉ AU TEMPS 5 HEURES

Pour vérifier si la radioactivité contenue dans le pic au temps de rétention du taxol (33.03 min.) de l'échantillon duplicata prélevé au temps 5 heures provenait bien du taxol, nous avons procédé à ces deux analyses;

3.1 Injection de l'échantillon 2 (l'extrait 5H duplicata) avec des standards

Une solution standard a été préparée en solubilisant dans du méthanol (500 μ l) quelques cristaux de taxol¹, cephalomanine², 10-deacetyltaxol¹ et 10-deacetylbaaccatin III¹. L'échantillon 5HD (1.13 mg) a été solubilisé dans 200 μ l de méthanol. Un mélange de 100 μ l de ces deux solutions (50 μ l de solution standard et 50 μ l de solution contenant l'échantillon 5HD) a été injecté en CLHP analytique. Le gradient pour cette première injection était de 50 minutes. Les temps de rétention de ces standards étaient de 19.30 min (10-deacetylbaaccatin III), 29.65 min (10-deacetyltaxol), 32.70 min (cephalomanine) et 33.60 (taxol). Ces pics ont été collectés et la radioactivité a été mesurée au compteur à scintillation.

Une deuxième injection a été effectuée mais cette fois en travaillant avec un gradient de 140 minutes. En augmentant le gradient, on obtient une meilleure séparation des pics. La solution injectée était un mélange de 100 μ l d'échantillon et de 25 μ l de solution standard. Les temps de rétention pour ce gradient étaient de 26.30 min (10-deacétylbaaccatin III), 55.38 min (10-deacétyltaxol), 61.87 min (cephalomanine) et de 64.12 min (taxol).

1. Ces composés ont été obtenus par les méthodes de purification décrites à la section 1
2. Ce taxane nous a été fourni par Madame Nancita Lomex et Dr Kathleen Groover de l'Institut National de Cancer, Maryland, E-U

Les pics du chromatogramme ont été collectés et la radioactivité a été mesurée au compteur à scintillation.

3.2 Injection de l'échantillon 1 (5H) acétylé avec des standards acétylés.

L'échantillon radioactif ainsi que les standards (10-deacetylbaccatin III, 10-deacetyltaxol, cephalomanine, taxol) ont tout d'abord été acétylés.

3.2.1 Réactivité du taxol et des taxanes à l'acétylation

Selon la littérature (95), le OH en position 2' du taxol est acétylé de façon préférentielle. Dans un deuxième temps, une acétylation additionnelle a lieu à la position 7 de la molécule. Quant au OH présent à la position 1, il n'est jamais acétylé car la forme de la molécule rend ce site inaccessible aux réactifs. Donc de cette réaction résulte du taxol monacétylé (2') et du taxol diacétylé (2' et 7). Cephalomanine et 10-deacetyltaxol réagiront de la même façon que le taxol. Pour ce qui est de 10-deacetylbaccatin III, l'ordre de réactivité des positions dans lequel l'acétylation a lieu est 7>10>13 (96).

3.2.2 Acétylation des standards

Les standards ont été acétylés séparément. Une quantité de 0.5 mg de chaque composé standard a été pesée puis placée dans une petite fiole. À cela, 45 μ l d'anhydride acétique à 99% (Aldrich Chemical) et 30 μ l de pyridine (Fisher

Scientific) asséchée (15 octobre 1993) ont été ajoutés. Les fioles ont ensuite été scellées à l'aide d'un parafilm et placées quelques secondes au vortex. Les quatre fioles ont été laissées à la température de la pièce pour toute une nuit. Le lendemain, l'excès (pyridine et produits de la réaction) a été évaporé sous l'azote.

3.2.3. Acétylation de l'échantillon 1 (5H)

Tout l'échantillon 5H (1.34 mg) a été acétylé. Un volume de 180 μ l d'anhydride acétique et un autre de 120 μ l de pyridine ont été ajoutés à cet extrait¹. Les étapes suivantes de l'acétylation étaient les mêmes que précédemment.

3.2.4 Injection en chromatographie liquide à haute performance

Les standards acétylés ont été solubilisés dans de l'acétone (400 μ l) et injecté en CLHP analytique (gradient de 50 min.) afin de connaître leurs nouveaux temps de rétention.

L'échantillon 5H acétylé (300 μ l d'acétone) a été injecté (gradient de 50 min.) et les pics du chromatogramme ont été collectés, dont notamment ceux correspondant au temps de rétention du taxol acétylé. La radioactivité a ensuite été mesurée au compteur à scintillation.

1. Nous avons ajouté le réactif en grande quantité car nous devons tenir compte du fait que cet extrait contenait plusieurs produits autres que les taxanes pouvant être également acétylés.

Une dernière injection contenant un mélange de l'échantillon (50 μ l) et des standards (4 x 5 μ l) a été effectuée. Les pics du chromatogramme ont été collectés et la radioactivité a été mesurée au compteur à scintillation.

RÉSULTATS

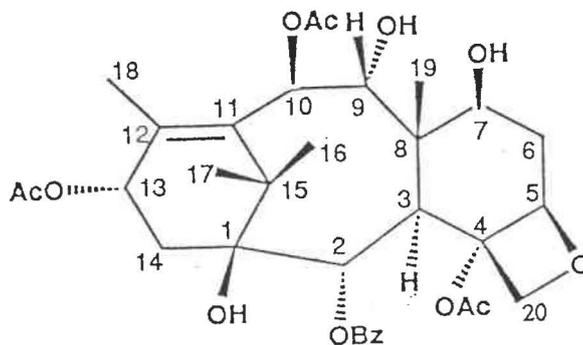
1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DE TAXANES

La première partie de mes travaux de recherche consistait à isoler des taxanes contenus dans les aiguilles de Taxus canadensis. Antérieurement aux travaux du groupe de L. Zamir (97), le taxol, la cephalomannine et le 10-deacetylbaccatin III, étaient les seuls taxanes ayant été isolés à partir de cet espèce d'if (4).

Lors de ces travaux (97), j'ai participé à l'isolement et/ou à la purification de trois de ces composés:

1.1 7,9 DEACETYLBACCATIN VI

FIGURE 17: STRUCTURE CHIMIQUE DU COMPOSÉ 7,9-DEACETYLBACCATIN VI

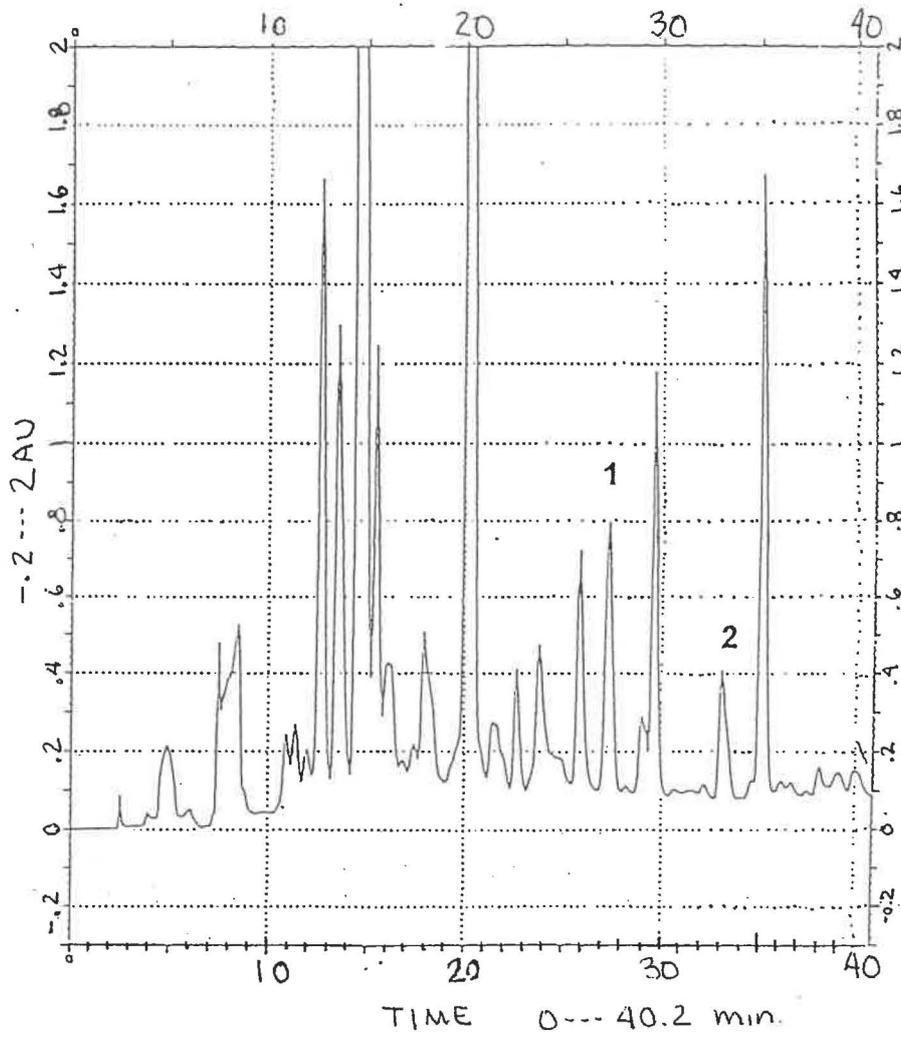


Ce taxane a été isolé pour la première fois dans notre laboratoire par le Dr. Nedeá. J'ai participé à la purification de ce composé pour des fins de travaux sur la synthèse organique. Ces travaux étaient effectués par un autre membre du laboratoire.

Ce taxane a été isolé à l'aide de la méthode 1, c'est-à-dire à l'aide de la méthode utilisant l'extracteur à soxhlet (section 1.2, Matériels et méthodes). Lors de la séparation par chromatographie sur colonne, ce composé était retrouvé dans la fraction 4, c'est-à-dire lorsque le solvant d'élution était constitué de 60% d'hexane et 40% d'acétone. Le temps de rétention de ce taxane sur CLHP semi-préparatif est de 29.4 minutes alors que sur CLHP analytique, le temps de rétention est de 27.7 minutes. La structure de la molécule fut élucidée par RMN et MS. Au moment de la publication de notre article, ce taxane n'avait jamais été rapporté dans d'autres espèces d'ifs. Il fut ultérieurement isolé dans Taxus canadensis par un autre groupe chercheurs de la compagnie Abbott (98).

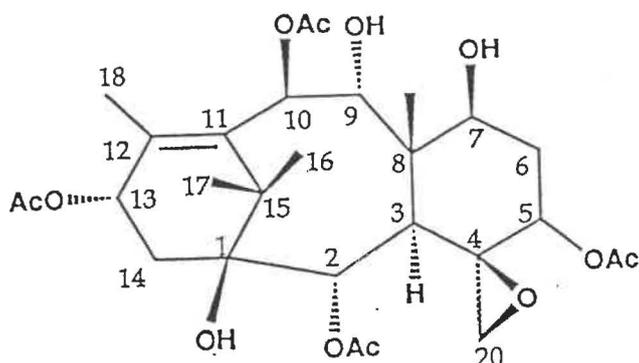
Ce taxane est très intéressant car il est le taxane majoritaire de Taxus canadensis (0.014%) sa quantité est de 3 à 5 fois supérieure à celle du taxol (figure 18). Cette quantité varie selon l'endroit et la saison de récolte des plantes. Ce composé possède un squelette identique à celui du taxol à l'exception du groupement retrouvé en C-9. A cette position, le taxol possède une cétone ce qui confère à la molécule très peu de solubilité dans l'eau. Cette cétone ne peut cependant être réduite chimiquement à cause des effets stériques des autres groupements du taxol. Il est donc très intéressant de retrouver "naturellement" un composé similaire au taxol mais possédant un groupement aldéhyde en C-9.

FIGURE 18: CHROMATOGRAMME DE L'EXTRAIT DE TAXUS CANADENSIS PAR CLHP
ANALYTIQUE (1. 7,9-DEACETYLBACCATIN VI: T.R. 27.7 MIN., 2. TAXOL: T.R.
33.1 MIN.)



1.2 1 β -hydroxy 7,9-deacetylbaaccatin I

FIGURE19: STRUCTURE CHIMIQUE DU COMPOSÉ 1 β -HYDROXY 7,9-DEACETYLBACCATIN I



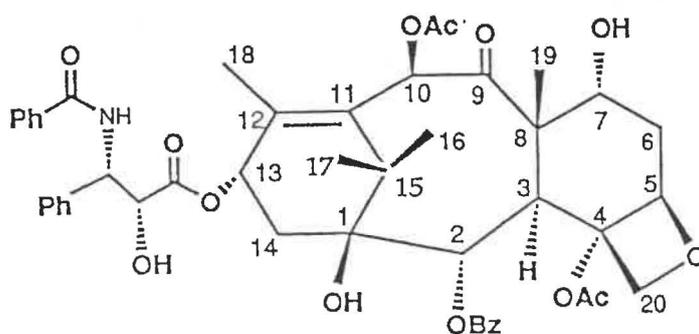
Ce taxane a également été extrait des aiguilles à l'aide de la méthode 1. Ce composé a été obtenu à partir de la fraction 3, c'est-à-dire lorsque le gradient d'élution était de 65:35 (hexane:acétone). Les conditions de séparation par CLHP analytique décrites précédemment n'ont pas été suffisantes pour purifier ce composé. Un autre composé, que l'on croit être un stéréoisomère de ce taxane, a été retrouvé dans le même pic. Ces deux composés avaient un temps de rétention de 22.5 minutes sur un CLHP semi-préparatif et de 21.05 minutes en CLHP analytique. Pour purifier ces deux composés, nous avons travaillé à l'aide d'un gradient de 70 minutes en CLHP analytique. Selon ces conditions, le temps de rétention de ce nouveau taxane était de 25.5 minutes. Le rendement obtenu était inférieur à celui du taxol, soit de 0.003% comparativement à 0.006%.

Ce composé était un nouveau taxane. Sa structure n'a toutefois pas été complètement élucidée. La stéréochimie du groupement acétyl en position 5 du squelette demeure incertaine. Ce taxane a, par la suite, été isolé à partir de

l'écorce de *Taxus chinensis* (99), ces auteurs n'ont toutefois pas prouvé rigoureusement la stéréochimie de la molécule.

1.3 7-Epitaxol

FIGURE 20: STRUCTURE CHIMIQUE DU COMPOSÉ 7-EPITAXOL



Ce composé a été extrait selon la deuxième méthode d'extraction. Il avait déjà été isolé deux ans auparavant par le Dr. Nedeá, cependant à ce moment-là, sa structure n'avait pas été élucidée. Le Dr. Zhou a également isolé ce taxane, mais à l'aide d'une autre méthode d'extraction.

Lors de la séparation sur colonne, ce composé était retrouvé dans les fractions 29 à 35, soit lors de l'élution du mélange de solvants constitué de 65:35 (hexane:acétone). L'extrait de ces fractions pesait 0.401 g. La quantité totale de produit purifié était de 1.63 mg.

Le temps de rétention en CLHP semi-préparatif était de 50.0 minutes alors qu'en CLHP analytique le temps de rétention était de 36.05 minutes. Pour purifier

le composé, nous avons travaillé en CLHP analytique à l'aide d'un gradient de 100 minutes. Les autres conditions de séparation étaient les mêmes que celles décrites précédemment. Le temps de rétention de 7-epitaxol selon ces conditions, était de 57.03 minutes.

Ce taxane était pour la première fois isolé à partir de Taxus canadensis (97), cependant il avait déjà été retrouvé dans d'autres espèces d'ifs. Sa structure est identique à celle du taxol, la seule différence se situe au niveau de la stéréochimie du OH situé à la position 7 du squelette. Ce taxane est plutôt minoritaire dans Taxus canadensis, son poids représente 0.001% du poids sec de la plante, comparativement au taxol qui a un rendement de 0.01%.

2. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA BIOSYNTHÈSE DU TAXOL

2.1 Technique de "KPL" utilisant des plantes broyées

La première étape de ces travaux consistait à développer une méthode pour l'application de la technique de "Kinetic Pulse Labelling". Le but de notre première expérience était donc de vérifier si la technique utilisant les plantes broyées permettait bien l'incorporation de notre précurseur (l'acétate marqué au tritium) dans les produits de la plante. Lors de cette expérience, nous avons également vérifié si l'ajout de DTT au mélange de plantes augmentait l'incorporation comme l'a constaté Strobel lors de ses travaux de biosynthèse avec l'écorce de Taxus brevifolia (82). Étant donné que cette expérience n'était qu'une expérience préliminaire, nous n'avons pas travaillé avec des duplicatas. Trois échantillons ont été préparés comme nous l'avons décrit à la section 2.1 du chapitre Matériels et méthodes, cependant un échantillon ne contenait pas de DTT alors que dans les deux autres échantillons, des concentrations de 20 et 40 mM ont été ajoutées. Les échantillons ont été placés à l'incubation pour une période de 6 jours. Par la suite, la radioactivité contenue dans le pic du taxol (t.r. 33.06 min.) et dans le pic du composé 7,9 deacetylbaccatin VI (t.r. 27.37 min) a été mesurée. Ce dernier composé est le taxane majoritaire de Taxus canadensis. Le tableau suivant montre les résultats de cette expérience.

TABLEAU 13: Radioactivité mesurée dans les trois échantillons

COMPOSÉS	DTT AJOUTÉ		
	-----	20 mM	40 mM
Taxol	17350 ¹	29900	60250
7,9deacetylbaaccatin VI	14100	14450	29250

1. Mesure de la radioactivité en dpm dans l'extrait total:

$$\frac{\text{Dpm du pic X} \times \text{volume total de l'extrait}}{\text{volume injecté}}$$

Les résultats de ce tableau démontre qu'il y a eu incorporation du précurseur dans les produits de la plante. Cette incorporation est possible dans le taxol même en l'absence de DTT (17350 dpm), par contre celle-ci est augmentée lorsqu'une concentration de DTT est ajoutée (29900 dpm et 60250 dpm).

Étant donné ces résultats , nous avons procédé à une seconde expérience utilisant des plantes broyées, où une concentration de 40 mM de DTT a été ajoutée à chaque échantillon (voir section 2.1 du chapitre Matériel et méthodes). Le but de cette expérience était de suivre dans le temps la radioactivité du taxol, afin de voir à quel moment ce produit était formé. La radioactivité des autres taxanes était également suivie. Les graphiques suivants (fig.21.22) présentent la radioactivité mesurée dans les pics du taxol et de 7.9 deacetylbaaccatin VI, et ce, pour chaque échantillon.

FIGURE 21: RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE PIC DU TAXOL (AIGUILLES BROYÉES)

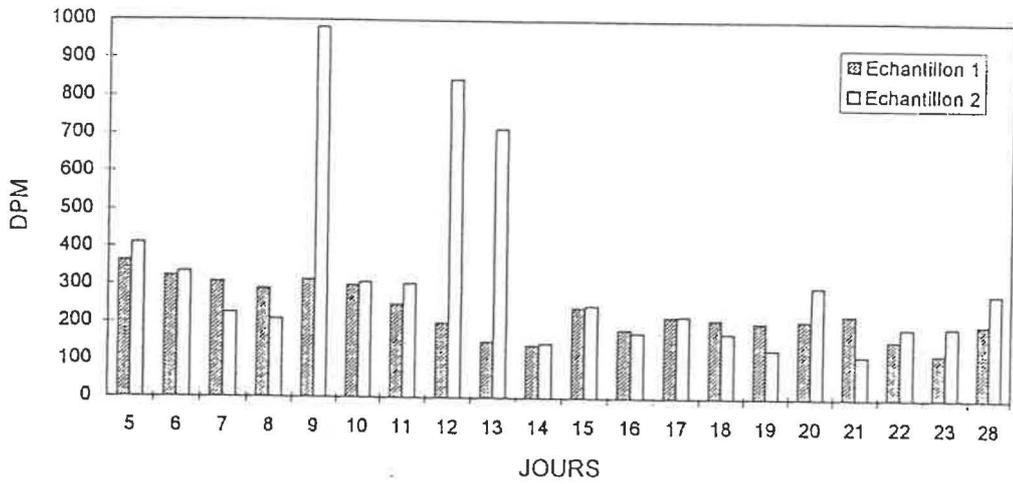
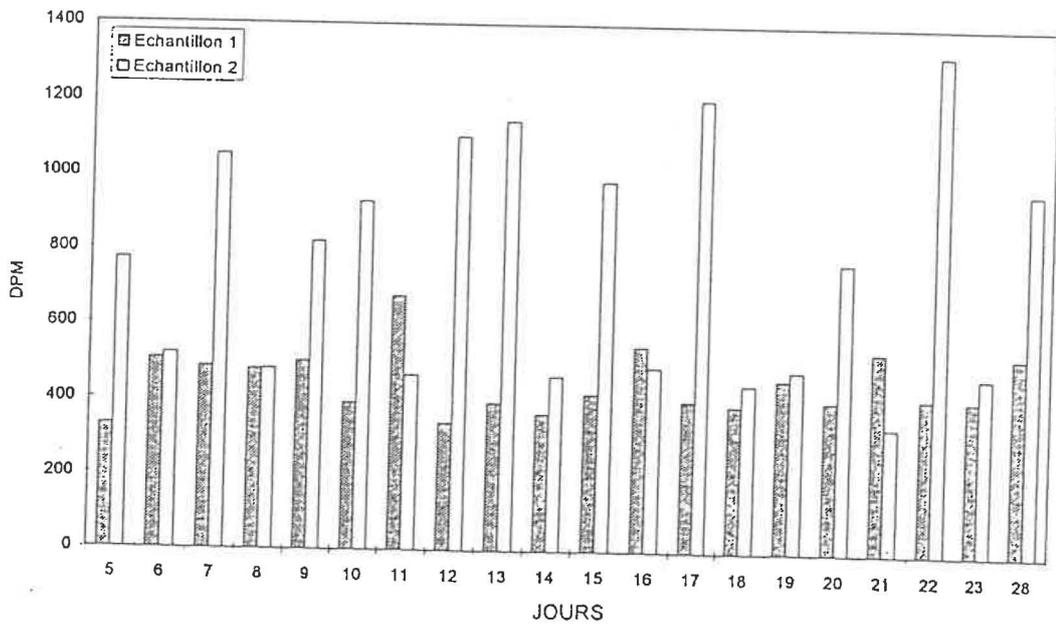


FIGURE 22: RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE PIC DE 7, 9-DEACETYLBACCATIN VI (AIGUILLES BROYÉES)



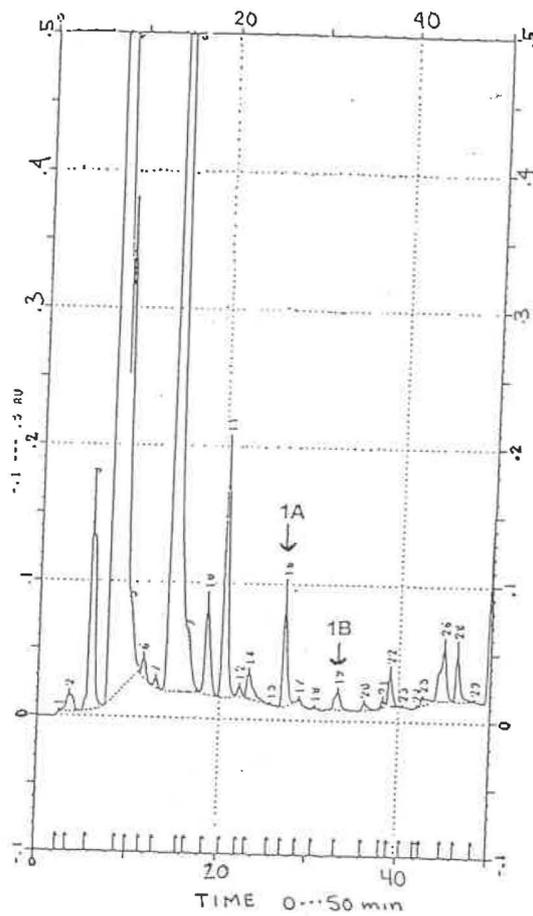
En comparant les résultats des échantillons et leurs duplicatas, on constate que cette méthode ne donne pas des résultats reproductibles. De plus, la radioactivité du taxol semble plutôt stable. Nous avons donc décidé d'avoir recours à une autre méthode pour l'étude de la biosynthèse du taxol, soit une méthode utilisant un homogénat préparé à partir des aiguilles de Taxus canadensis.

2.2 Technique de "KPL" utilisant un homogénat

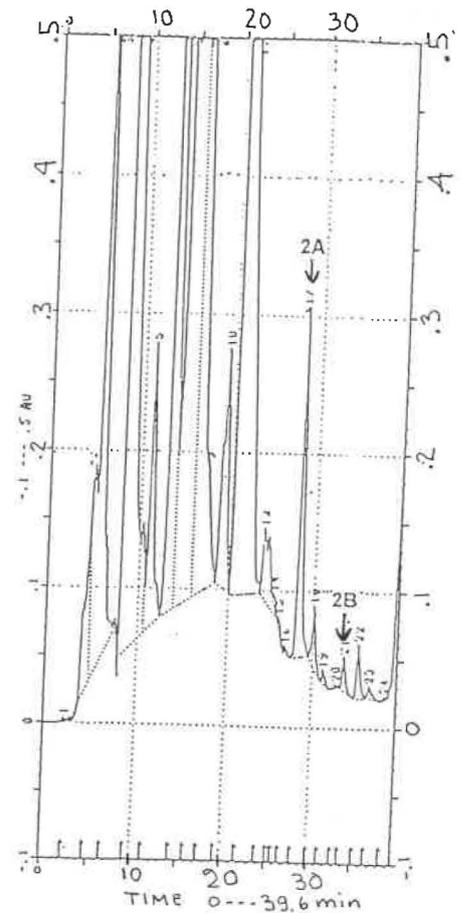
Pour appliquer la technique de "KPL" sur l'homogénat, il était important de vérifier tout d'abord si la formation des taxanes pouvait avoir lieu dans cet homogénat. Nous avons donc préparé un homogénat où aucune radioactivité n'a été ajoutée. Deux échantillons ont été prélevés, soit un premier au temps 0 ainsi qu'un second après 14 jours d'incubation. Il est important de noter que les extraits des deux échantillons ont été solubilisés dans la même quantité de solvant et que le même volume a été injecté en CLHP analytique. On peut comparer les chromatogrammes de ces deux échantillons à la figure 23.

Le chromatogramme de l'échantillon prélevé après 14 jours est beaucoup plus complexe que celui de l'échantillon au temps 0. Des produits se sont visiblement formés dans l'homogénat, dont possiblement des taxanes. Le pic 1 augmente considérablement dans le deuxième échantillon. Ce pic possède le même temps de rétention et le même spectre U.V. que le composé 7,9 deacetylbaccatin VI. Le pic au temps de rétention du taxol (pic 2) a également augmenté. La biosynthèse du taxol peut donc être étudiée à l'aide de cette méthode.

FIGURE 23: COMPARAISON ENTRE LES EXTRAITS D'HOMOGENAT PRÉLEVÉS AU TEMPS 0 ET APRÈS 14 JOURS (1. 7,9-DEACETYLBACCATIN VI: A) T.R. 27.30 min. B) T.R. 27.93 min., 2. TAXOL: A) T.R. 33.35 min. B) T.R. 33.63 min.



TEMPS 0



APRÈS 14 JOURS

Un "KPL" a donc été appliqué à l'aide de la méthode de l'homogénéat (voir section 2.2 du chapitre Matériels et méthodes). Les figures 24 et 25 présentent les résultats de cette expérience, soit la radioactivité contenue dans les pics du taxol et de 7,9 deacetylbaccatin VI pour chaque échantillon.

FIGURE 24: RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE PIC DU TAXOL (HOMOGÉNAT)

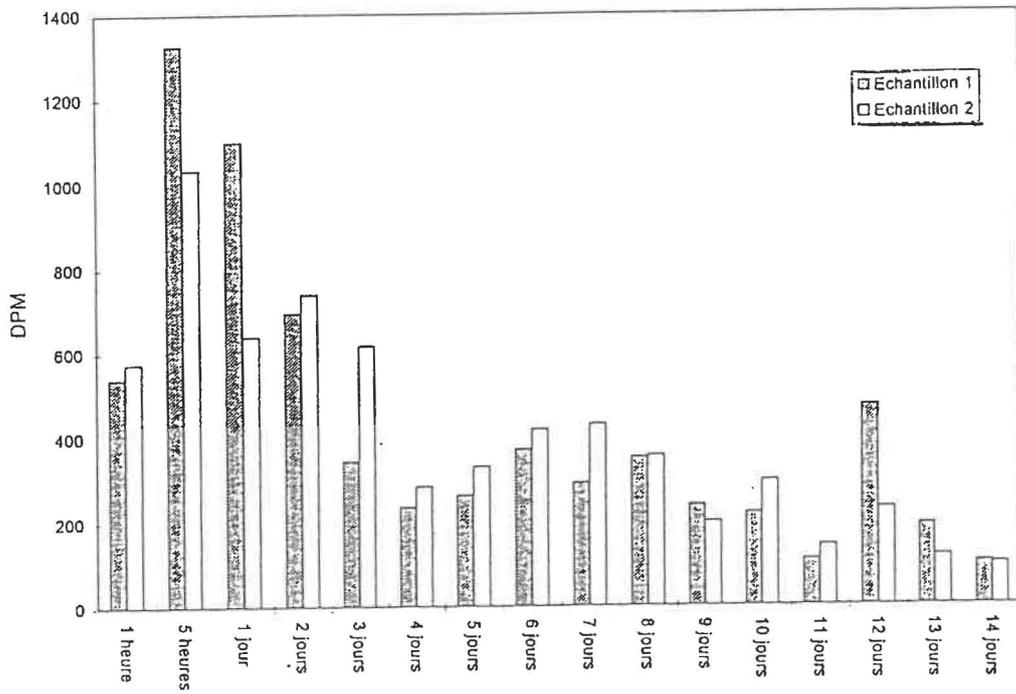
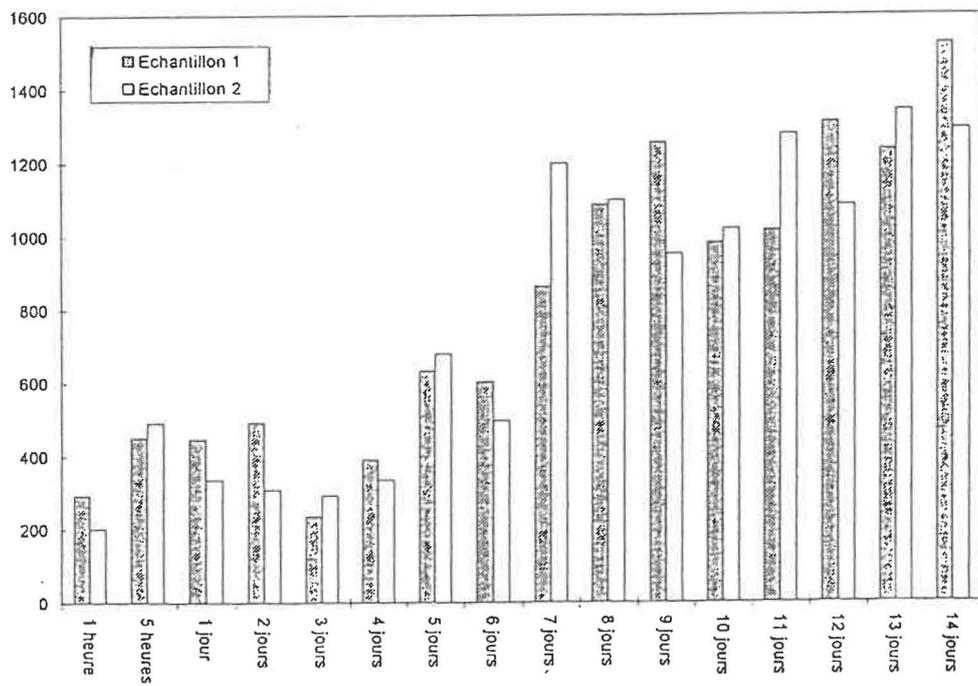


FIGURE 25: RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE PIC DE 7,9-DEACETYLBACCATIN VI (HOMOGÉNAT)



Ce que l'on constate tout d'abord, est que les valeurs des échantillons et des duplicatas sont beaucoup plus reproductibles que dans le cas de l'expérience utilisant les aiguilles broyées. De plus, d'après la figure 24 on constate une nette augmentation de la radioactivité au temps 5 heures. Cette radioactivité diminue graduellement pour ensuite, se stabiliser.

Nous avons effectué une seconde expérience, mais cette fois-ci les échantillons étaient tous prélevés à l'intérieur d'une période de 24 heures. Le but de cette expérience était de confirmer les résultats précédents. Les pics qui contenaient une radioactivité non-négligeable étaient les pics au temps de rétention du taxol (33.20 min), céphalomannine (32.16 min) et 10-deacétyltaxol¹(29.01 min). Par exemple, pour l'échantillon prélevé au temps 5 heures, les valeurs de radioactivité des pics (valeur pour le volume injecté seulement) étaient de 475,5 cpm pour le pic au temps de rétention taxol, de 248.4 cpm pour céphalomannine et de 245 cpm pour 10-deacetyltaxol. Tous les autres pics collectés dans la région des taxanes avaient une valeur inférieure à 87.5 cpm. Le composé 10-deacetylbaccatin III a un temps de rétention se situant autour de 19.2 min. La radioactivité de ce composé était très difficile à suivre étant donné que cette région est complexe et que beaucoup de produits qui ne sont pas des taxanes s'y retrouvent. Les pics 2 et 3 avaient respectivement des valeurs de radioactivité de temps 141 et 152 cpm, cependant ces deux pics sont des mélanges de plusieurs composés, donc on ne peut rien conclure de cette radioactivité. Les graphiques suivants (fig.26,27,28) présentent les valeurs de radioactivité pour les trois produits mentionnés ci-haut.

1. Ce composé possède la même structure que le taxol, la seule différence se situe au niveau de la position 10 du squelette: le groupement OAc retrouvé sur le taxol est remplacé par un groupement OH.

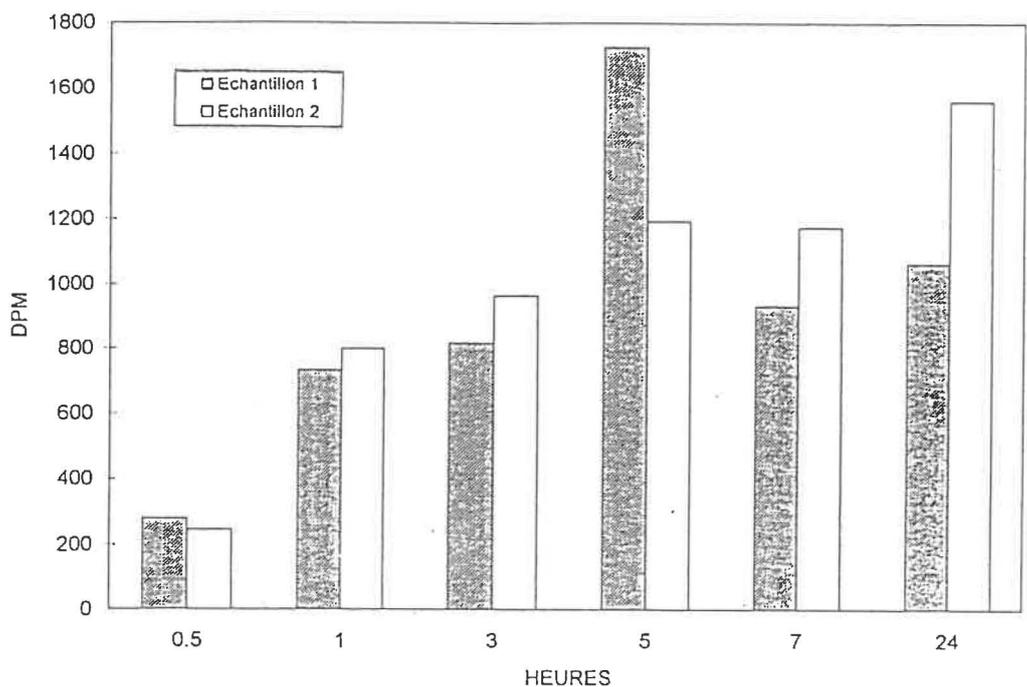
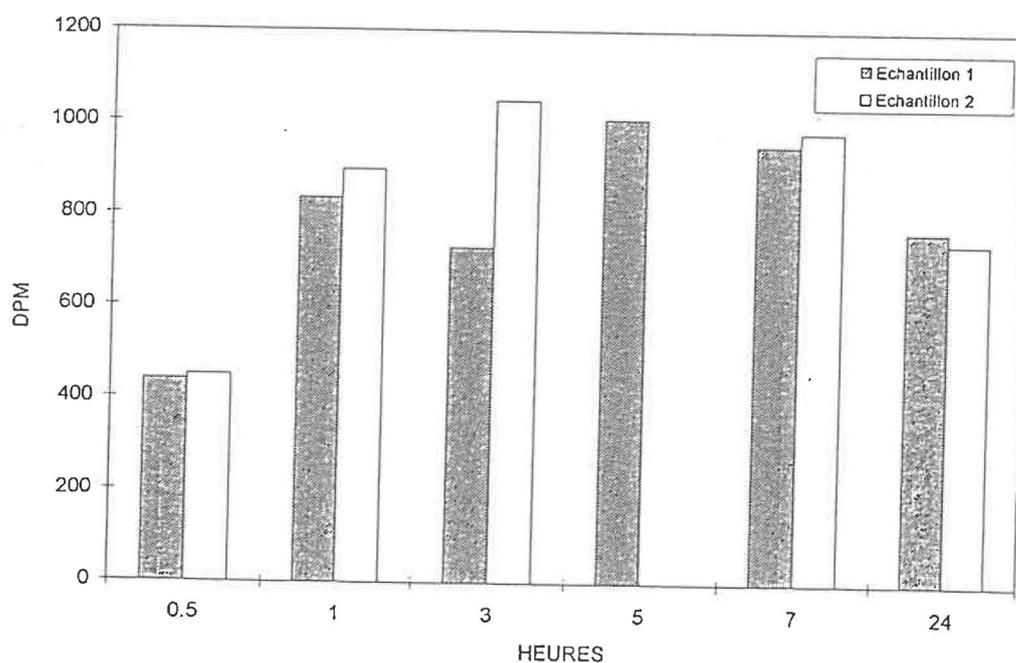
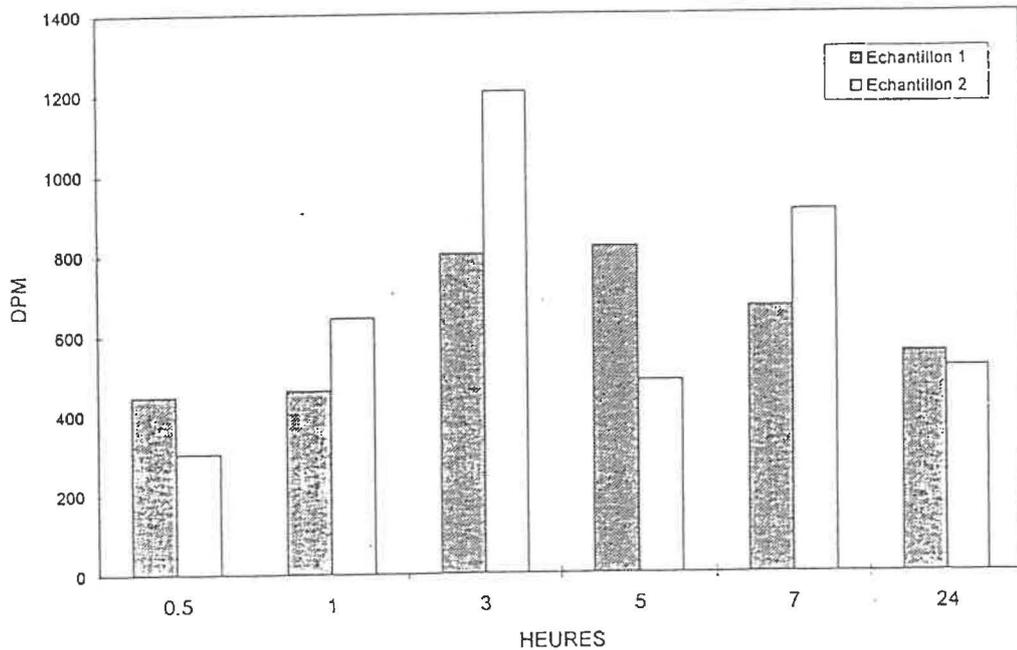
FIGURE 26 : RADIOACTIVITE CONTENUE DANS LE PIC DU TAXOL (HOMOGENAT 2)**FIGURE 27: RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE PIC DE 10-DEACETYLTAXOL (HOMOGENAT 2)**

FIGURE 28: RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE PIC DE CEPHALOMANNINE (HOMOGENAT 2)



Les résultats présentés sur le graphique du taxol (fig.26) confirment bien les résultats de l'expérience précédente. Les valeurs de radioactivité sont sensiblement les mêmes et de plus, on note une augmentation de la radioactivité après 5 heures d'incubation. La radioactivité contenue dans les pics aux temps de rétention de céphalomannine et de 10-deacetyltaxol semble également atteindre un maximum de radioactivité au cours des premières heures d'incubation.

2.3 Pourcentage d'incorporation dans le pic du taxol

Le pourcentage d'incorporation de l'acétate dans le taxol a été calculé selon la formule suivante:

$$\frac{\text{radioactivité du pic (dpm) dans l'extrait total}}{\text{radioactivité (dpm) initiale ajoutée aux plantes}} \times 100$$

1. Pour le calcul du pourcentage d'incorporation selon la méthode utilisant l'homogénat, on doit calculer la radioactivité initiale contenue dans 1 ml d'homogénat.

Le pourcentage d'incorporation a été calculé à l'aide de la valeur maximale de radioactivité contenue dans le pic du taxol. L'expérience effectuée avec les plantes broyées donnait une incorporation de 0.0079 %, alors que de l'expérience utilisant l'homogénat en résultait une incorporation de 0.0023%. Il est important de souligner que la première expérience a été effectuée avec les nouvelles pousses de plantes récoltées au printemps, alors que l'homogénat a été préparé à partir de plantes récoltées au mois de novembre.

2.4 Étude de la biosynthèse du taxol en utilisant la phénylalanine comme précurseur

Comme mentionné à la section 4.2 de la revue bibliographique, la chaîne latérale portant l'acide de Winterstein retrouvé notamment sur taxol, est formée *in vivo* à partir de la phénylalanine. Nous avons effectué un "KPL" avec ce précurseur, afin de pouvoir suivre plus spécifiquement la formation du taxol dans l'homogénat. Cependant nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés. La radioactivité n'était pas retrouvée seulement dans les pics des taxanes possédant

une chaîne latérale de Winterstein. Elle était retrouvée dans tous les pics du chromatogramme. Le pourcentage d'incorporation de la phénylalanine dans le pic du taxol était toutefois nettement supérieure à celui de l'acétate, soit de 0.052%.

3. ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS AU TEMPS 5 HEURES

Pour effectuer les expériences suivantes, nous avons utilisé les échantillons prélevés au temps 5 heures (échantillon et le duplicata), du premier homogénat. Rappelons tout d'abord que lors de cette expérience avec l'homogénat nous avons constaté que ces échantillons contenaient la valeur maximale de radioactivité dans le pic au temps de rétention du taxol. Nous avons donc procédé à une analyse plus approfondie de ces échantillons afin de voir si la radioactivité contenue dans ces pics provenait bien du taxol et non d'une simple impureté du pic.

3.1 Injection de l'échantillon 2 (5HD) avec des standards

Les figures 29 a, b et, c présentent les chromatogrammes de a) l'échantillon 5H duplicata, b) l'échantillon 5HD injecté avec les standards et c) l'échantillon 5HD injecté avec les standards mais où le gradient était de 140 minutes.

La solution standard contenait quatre composés; le taxol, 10-deacetyltaxol, cephalomannine et 10-deacetylbaaccatin III. Nous étions seulement intéressés à la radioactivité contenue dans le taxol, cependant céphalomannine est un composé qui a un temps de rétention très près du taxol, donc nous voulions nous assurer de bien distinguer ces deux pics. Nous voulions également suivre la radioactivité de 10-deacetyltaxol, car lorsque ce produit est acétylé, il en résulte des produits d'acétylation identiques à ceux du taxol. L'ajout de 10-deacetylbaaccatin III était seulement à titre d'information.

FIGURE 29A: CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON 2 PRÉLEVÉ AU TEMPS 5 HEURES ET ANALYSÉ À UN GRADIENT DE 50 MINUTES (1. 7,9-DEACETYLBACCATIN VI: T.R.27.43 min., 2. TAXOL : T.R. 33.28 min.)

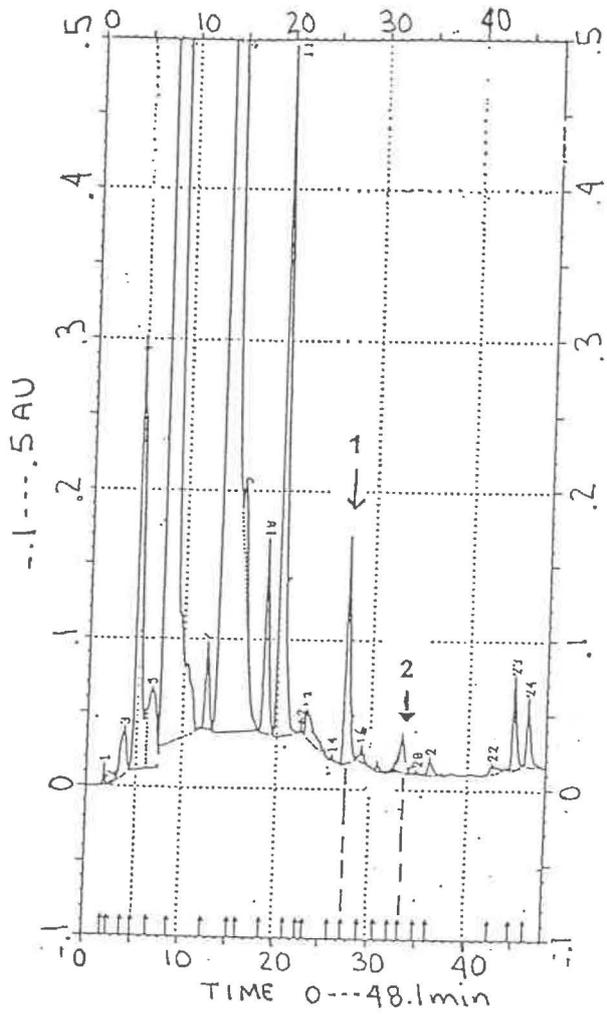


FIGURE 29B: CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON 2 PRÉLEVÉ AU TEMPS 5 HEURES, INJECTÉ AVEC STANDARDS ET ANALYSÉ À UN GRADIENT DE 50 MINUTES (1. 7,9-DEACETYLBACCATIN VI: T.R.27.90 min., 2. 10-DEACETYLTAXOL: T.R. 29.65 min., 3. CEPHALOMANNINE: T.R. 32.70 min., 4. TAXOL: 33.60 min.)

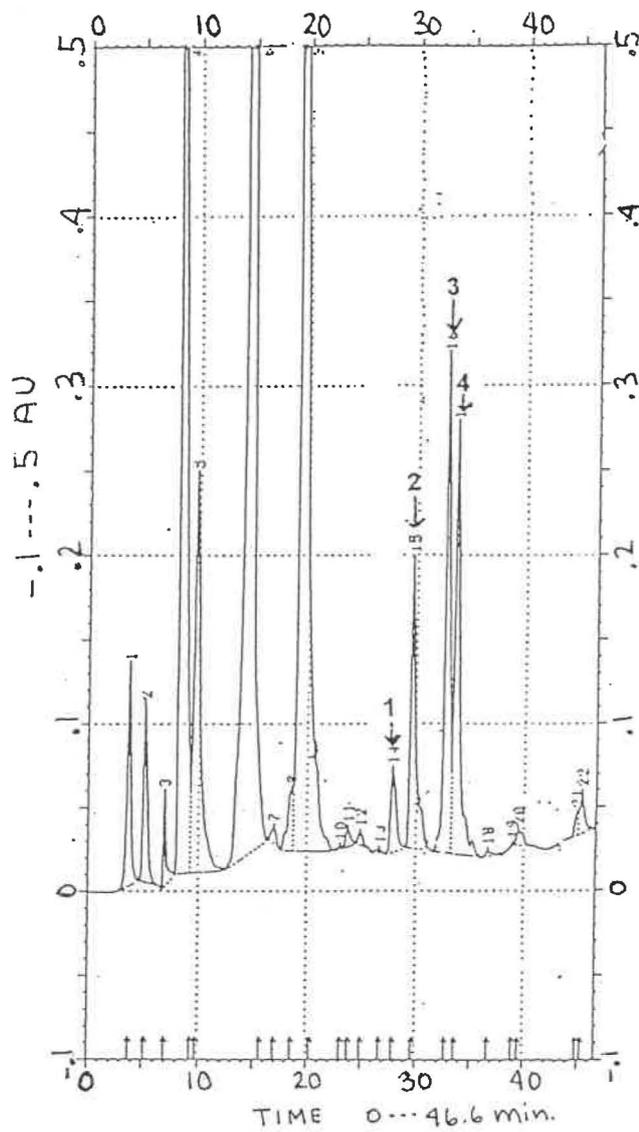
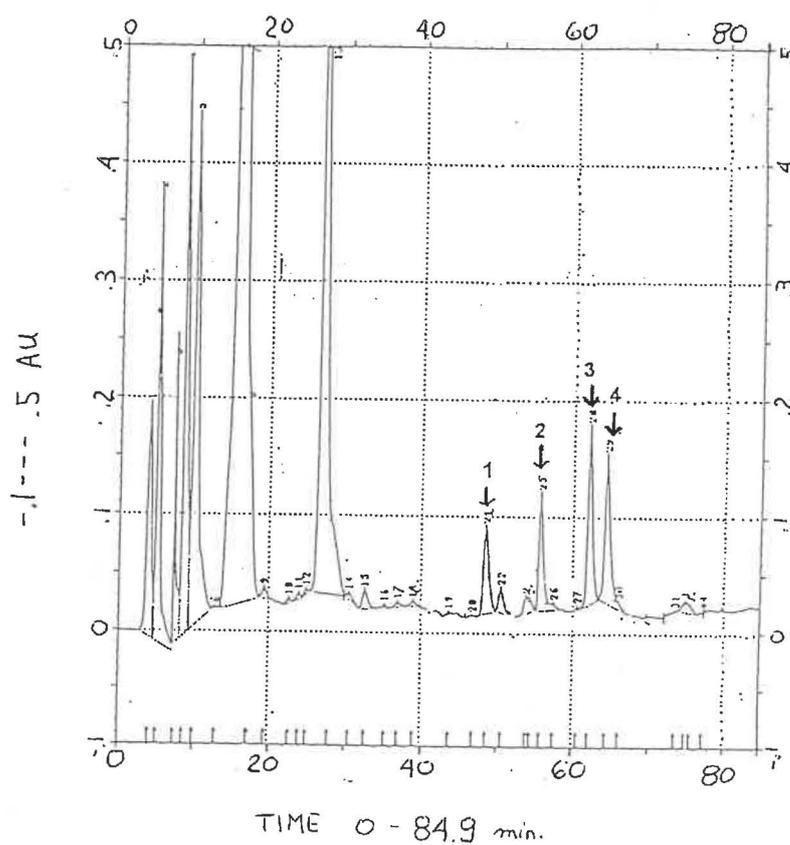


FIGURE 29C: CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON 2 PRÉLEVÉ AU TEMPS 5 HEURES, INJECTÉ AVEC STANDARDS ET ANALYSÉ À UN GRADIENT DE 140 MINUTES (1. 7,9-DEACETYLBACCATIN VI: T.R. 48.50 min., 2. 10-DEACETYLTAXOL: T.R. 53.80 min., 3. CEPHALOMANNINE: T.R. 62.14 min., 4. TAXOL: T.R. 64.44 min.)



Lors de l'injection de l'échantillon 5HD, la radioactivité contenue dans le pic du taxol étaient de 254.3 cpm. Tous les autres pics mesurés, sauf celui au temps de rétention de 10-deacetyltaxol (126.5 cpm), avaient une radioactivité inférieure à 100 cpm. En injectant cet échantillon avec la solution de standards, le pic du taxol demeure le plus radioactif. Le compte était de 112.5 cpm, alors que tous les autres pics collectés avaient des valeurs inférieures à 58 cpm. Le pic de 10-deacetyltaxol avait également une valeur supérieure aux autres pics, soit de 96.5 cpm..

Lors de l'injection effectuée à un gradient de 140 minutes, la radioactivité contenue dans le pic du taxol était de 160.5 cpm¹. La radioactivité contenue dans le pic de 10-deacetyltaxol n'était pas supérieure à celle des autres pics, soit de 63.7 cpm. La radioactivité initiale semble avoir été répartie dans les deux petits pics précédents le pic de 10-deacetyltaxol, ceux-ci avaient respectivement des valeurs de 99.5 et 71.3 cpm. Donc, la radioactivité initiale ne provenait pas uniquement de ce taxane mais bien d'impuretés contenues dans le pic. Tous les autres pics mesurés avaient des valeurs inférieures à 70 cpm.

D'après ces résultats, la radioactivité contenue dans le pic du taxol semble bien provenir du taxol. Pour confirmer ces résultats, nous avons procédé à l'acétylation de l'échantillon 5H, afin de voir si les produits acétylés contenaient toujours la radioactivité.

1. Le volume de l'échantillon injecté (75 μ l) était supérieur au volume injecté lors du gradient de 50 minutes (50 μ l). Le volume de la solution de standards était, par contre, plus petit, soit de 25 μ l comparativement à 50 μ l.

3.2 Injection de l'échantillon 1 (5H) acétylé

Les chromatogrammes suivants représentent les standards acétylés. Les standards utilisés sont les mêmes que ceux utilisés dans l'expérience précédente, à l'exception de 10-deacetylbaccatin III. L'acétylation du taxol et de 10-deacetyltaxol donne des produits d'acétylation identiques (fig.30), soient un produit monoacétylé à 39.08 minutes et un produit diacétylé à 41.52 minutes. Lors de l'acétylation de cephalomannine, un seul produit a été obtenu soit à 41.35 minutes (fig. 31).

Les chromatogrammes des figures 32 représentent a) l'échantillon 5H avant acétylation, b) l'échantillon 5H acétylé et c) l'échantillon 5H acétylé injecté avec les standards acétylés. Toutes les valeurs de radioactivité ont été mesurées à partir des pics collectés lors de l'injection de l'échantillon avec les standards. Le chromatogramme de l'échantillon acétylé sans standards a été utilisé à des fins de comparaison.

Avant l'acétylation, le pic au temps de rétention du taxol avait une radioactivité de 334.7 cpm. Ce que l'on constate sur le chromatogramme de l'échantillon acétylé est qu'un produit majoritaire de l'extrait, se retrouve exactement au même temps de rétention que le taxol non-acétylé (33.27 minutes). La radioactivité contenue dans ce pic est de 113 cpm. Il est important de noter également, que lors de l'injection de l'échantillon non-acétylé tous les pics ayant des temps de rétention supérieurs à celui du taxol avaient une valeur de radioactivité négligeable. Après l'acétylation, la région comprise entre 36 et 42 minutes contient beaucoup plus de radioactivité. Le pic du taxol diacétylé (41.68 minutes) contient entre autres, 215.5 cpm de radioactivité. La radioactivité

contenue dans le pic qui semble être le pic du taxol monoacétylé était de 99.1 cpm.

FIGURE 30: ACÉTYLATION DU TAXOL ET DE 10-DEACÉTYLTAXOL

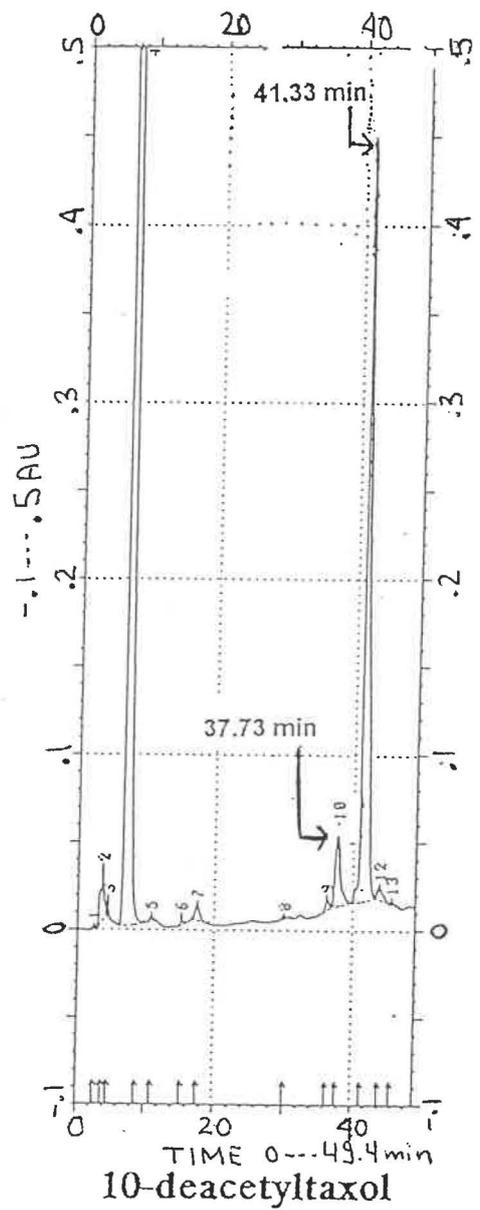
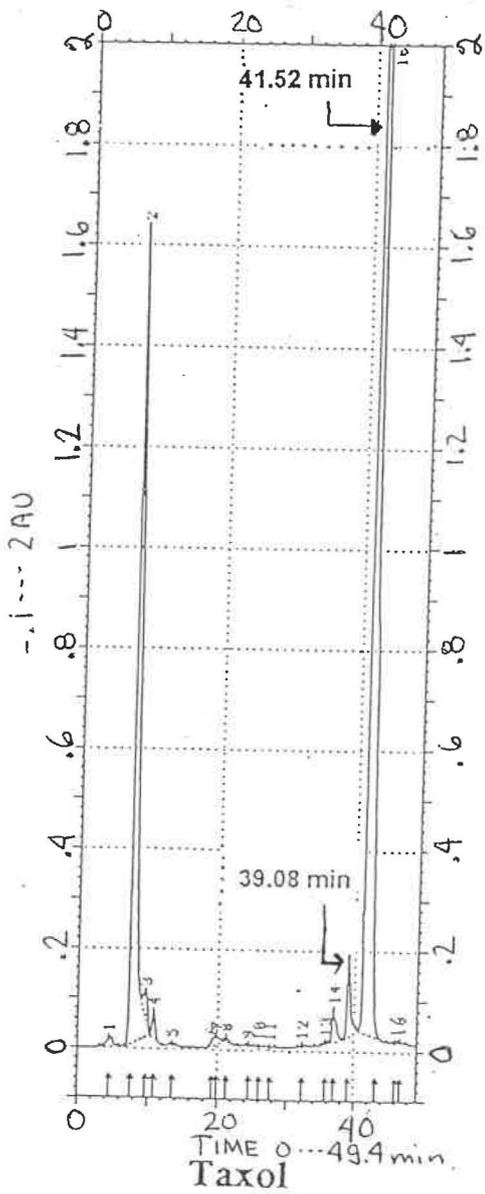


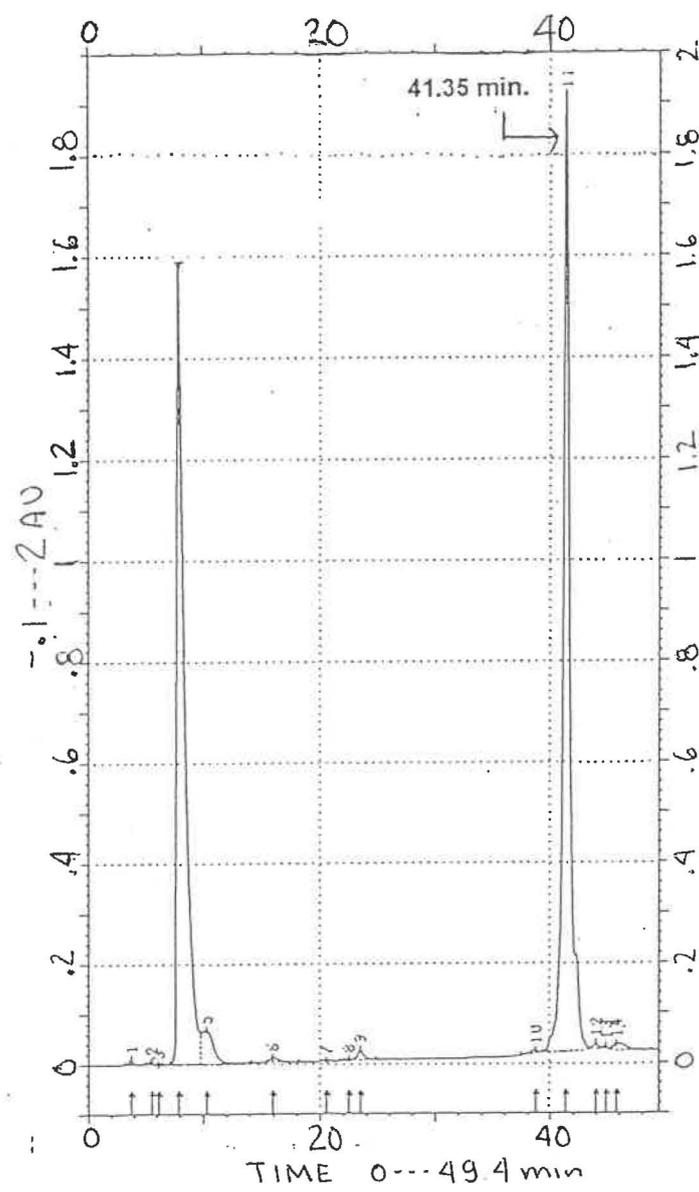
FIGURE 31: ACÉTYLATION DE CEPHALOMANNINE

FIGURE 32A CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON 1 PRÉLEVÉ AU TEMPS 5
HEURES (1. 7,9-DEACETYLBACCATIN VI: T.R. 26.61 min., 2. TAXOL: T.R.
 32.72 min.)

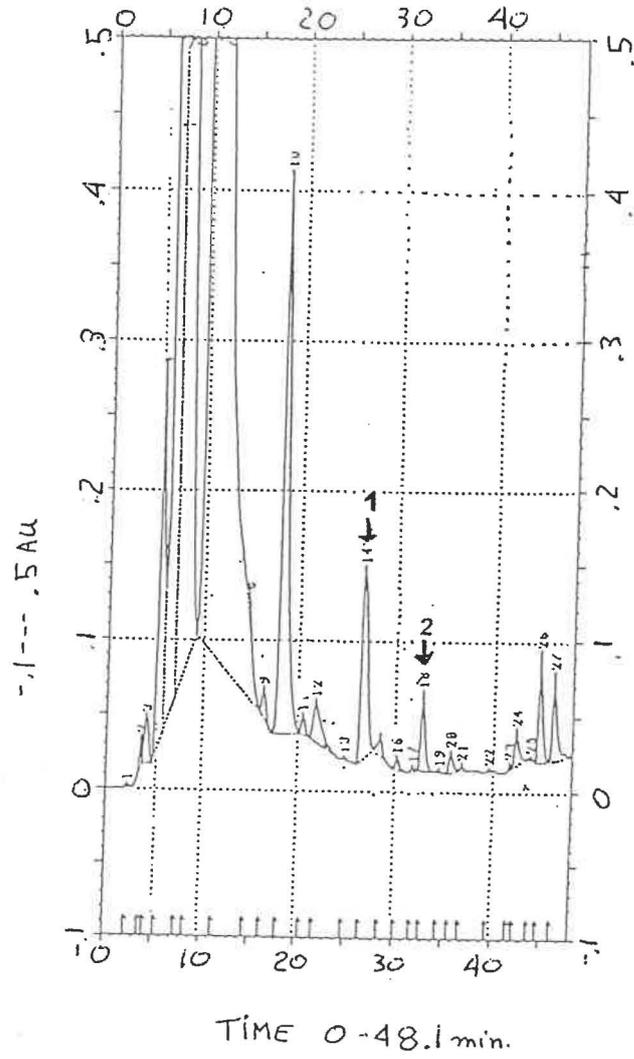


FIGURE 32B: CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON 1 PRÉLEVÉ AU TEMPS 5
HEURES, APRÈS ACÉTYLATION

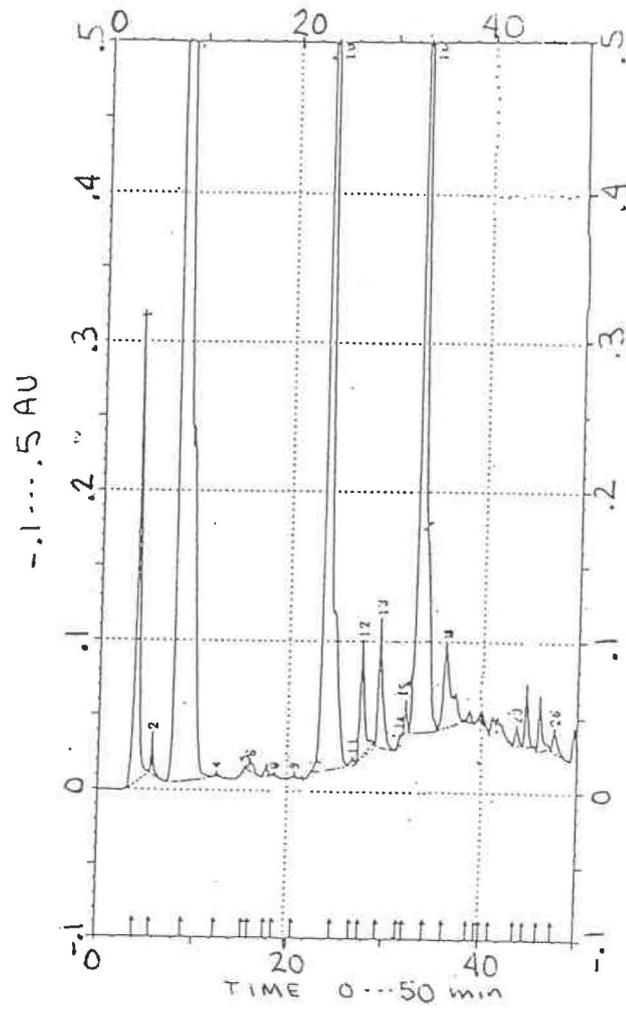
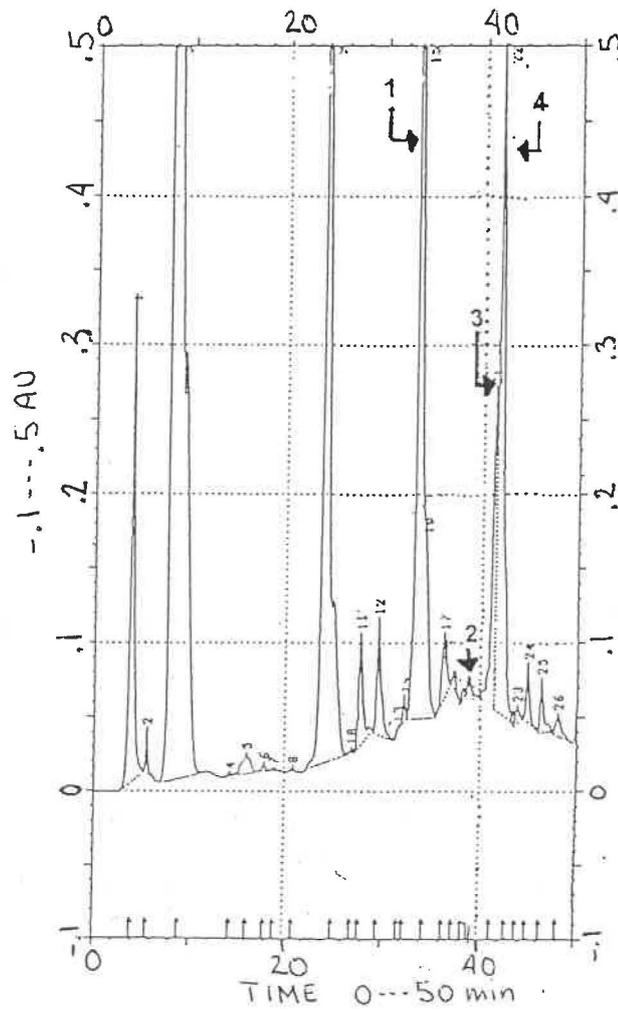


FIGURE 32C: CHROMATOGRAMME DE L'ECHANTILLON 1 PRÉLEVÉ AU TEMPS 5 HEURES, ACÉTYLÉ ET INJECTÉ AVEC LES STANDARDS ACÉTYLÉS (1. T.R. DU TAXOL NON-ACÉTYLÉ: 33.27 min., 2. T.R. DU TAXOL MONOACÉTYLÉ: 38.88 min, 3. CEPHALOMANNINE ACÉTYLÉ: T.R. 41.8 min., 4. TAXOL DIACÉTYLÉ: T.R. 41.68.)

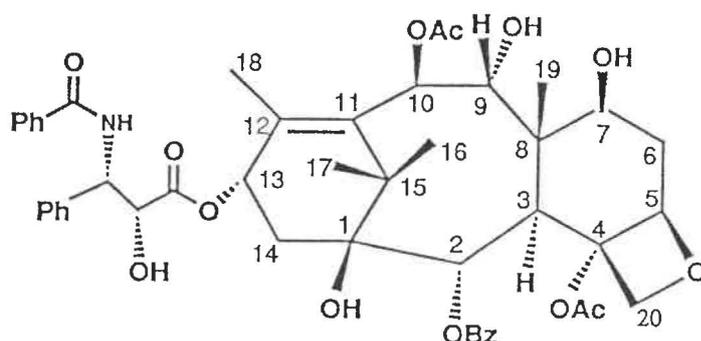


DISCUSSION

1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DE NOUVEAUX TAXANES

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le taxol est retrouvé dans toutes les espèces d'ifs, cependant, le contenu en taxanes varie d'une espèce à l'autre. L'isolement de taxanes permet d'une part, de caractériser chaque espèce d'ifs. Du point de vue médicinal, l'isolement de nouveaux taxanes peut mener à la découverte de composés plus actifs que le taxol ou bien, à la découverte de composés pouvant être utilisés pour la semi-synthèse du taxol ou la semi-synthèse de produits analogues au taxol. Le composé 7,9-deacetylbaccatin VI (fig.17) a d'ailleurs été utilisé pour la semi-synthèse d'un produit analogue au taxol, le 9-dihydrotaxol (100). Rappelons que 7,9 deacetylbaccatin VI est le taxane majoritaire de Taxus canadensis. Jusqu'à présent, il a été isolé seulement dans les aiguilles cette espèce d'if. Ce composé est fort intéressant car sa structure est très similaire au squelette du taxol. La seule différence se situe à la position C-9; le groupement oxyde (=O) du taxol est remplacé par un groupement hydroxyl (OH). Le composé 7,9-deacetylbaccatin VI a donc été utilisé pour la semi-synthèse du composé 9-dihydrotaxol (fig.33). Une chaîne latérale identique au taxol a été estérifiée à la position C-13 de 7,9 deacetylbaccatin VI.

FIGURE 33: STRUCTURE CHIMIQUE DU COMPOSÉ 9-DIHYDROTAXOL



Il en résulte donc, un composé identique au taxol, à l'exception du groupement de la position C-9. Ce nouveau groupement confère à la molécule, une meilleure solubilité dans l'eau. L'activité biologique de 9-dihydrotaxol sur les microtubules s'est avérée supérieure à celle du taxol. La valeur de ED₅₀ pour le 9-dihydrotaxol était de 0.85 mM, comparativement à celle du taxol qui était de 1.14 mM (100). Ces résultats sont forts prometteurs, par contre, d'autres analyses (culture cellulaire, études cliniques) doivent être faites avant de pouvoir réellement affirmer que ce produit possède une meilleure activité biologique que le taxol.

Le taxane 1 β -hydroxy 7,9 deacetylbaccatin I (fig.19) a été très difficile à purifier car il était combiné à un autre produit, que l'on croit être un stéréoisomère. Sa structure n'a pu être complètement élucidée, la stéréochimie du groupement OAc en position C-5 reste à déterminer. Le stéréoisomère n'était pas toujours présent mais comme mentionné en littérature, la production des taxanes peut être affectée par différents facteurs comme par exemples; l'âge et le sexe des plantes, la saison et le lieu de récolte des plantes ainsi que les conditions environnementales dans lesquelles les plantes ont été soumises ... (101). Avant la publication de cette nouvelle structure (97), plusieurs taxanes très similaires avaient déjà été isolés (tableau 7, Revue bibliographique). Un groupe de chercheurs travaillant sur Taxus chinensis ont également isolé 1 β -hydroxy 7,9 deacetyl**baccatin I**, mais à partir de l'écorce de l'arbre (99).

Le composé 7-epitaxol a été isolé pour la première fois à partir de l'écorce de Taxus brevifolia (65). Dans cette espèce d'if, ce taxane est également minoritaire (11.05 mg de produits obtenus à partir de 8061 lb d'écorce). L'activité biologique de ce taxane a été testée sur des cultures de cellules KB. Elle s'est

avérée légèrement inférieure à celle du taxol, sa valeur de ED₅₀ était de 3×10^{-5} µg/ml tandis que celle du taxol était de 1×10^{-5} µg/ml. Huang et ses collaborateurs(65) ont démontré que le taxol, lorsque soumis à une haute température (toluène, 80°C) et en présence d'isobutyronitrile, se transformait en 7-epitaxol. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que le 7-epitaxol pourrait être formé par isomérisation du taxol lors du processus d'extraction des taxanes (65).

2. ÉTUDE DE BIOSYNTHÈSE

Spécialement chez les plantes, la biosynthèse des produits naturels est très difficile à étudier. L'inconvénient majeur est que dans la plante, le taux d'incorporation est très faible et ce d'autant plus, lorsque les produits à étudier sont minoritaires. Il est donc important de bien choisir la méthode de travail afin de maximiser cette incorporation. Cependant, d'autres facteurs doivent être également considérés.

2.1 Choix de la méthode pour l'étude de la biosynthèse

Pour l'étude de la biosynthèse des taxanes, la meilleure méthode s'est avérée être la méthode utilisant l'homogénat. Les résultats de cette méthode étaient beaucoup plus reproductibles que ceux obtenus par la méthode utilisant les plantes broyées. La reproductibilité est un facteur essentiel à la validité des résultats. De plus, les manipulations après le prélèvement des échantillons étaient plus simples à réaliser. Ce dernier aspect était non-négligeable étant donné que nous devions travailler avec de la radioactivité et que de nombreux échantillons devaient être analysés.

2.2 Pourcentages d'incorporation

Le pourcentage d'incorporation de l'acétate dans le taxol à l'aide de la méthode utilisant les plantes broyées était supérieur à celui de l'homogénat. Comme mentionné précédemment, ces calculs ont été effectués à l'aide de la valeur optimale pour chacune des expériences. Si on se réfère au diagramme de

la figure 21, on constate que la valeur optimale (jour 9) n'est pas reproductible et semble être plutôt aléatoire. Il est important de rappeler également que l'expérience avec l'homogénat a été effectuée avec des plantes récoltées au mois de décembre, alors que la méthode de l'homogénat a été effectuée à l'aide de plantes récoltées au printemps. Or, nous savons que les plantes récoltées au printemps donne une meilleure incorporation (81). L'augmentation de l'incorporation dans les plantes printanières peut être due au fait que les nouvelles pousses possèdent une plus grande activité biosynthétique et que l'incorporation du précurseur est ainsi favorisée. Donc, les pourcentages d'incorporation de ces deux méthodes ne peuvent être comparés.

Le pourcentage d'incorporation de la phénylalanine à l'aide de l'homogénat présente un rendement beaucoup plus acceptable, soit un rendement de 10 fois supérieur à celui de l'acétate. Ce résultat n'est par contre pas étonnant étant donné que la phénylalanine est un précurseur plus "tardif" et plus spécifique que l'acétate. Une moins grande variété de produits de la plante utilise ce précurseur dans leur synthèse, donc, une plus grande quantité de précurseurs est disponible pour la biosynthèse du taxol.

2.3 "Kinetic pulse labelling"

Le suivi de de la radioactivité contenue dans le pic au temps de rétention du taxol, présente une nette augmentation au temps 5 heures et ce, pour les deux expériences effectuées avec l'homogénat (fig.24, 26). Ces valeurs optimales sont

d'ailleurs très comparables en terme de cpm. Ces résultats semblent indiquer que le taxol se forme au cours des premiers cinq heures d'incubation.

Lors de cette expérience, nous avons également suivi la radioactivité contenue dans le pic au temps de rétention de 7,9 deacetylbaccatin VI. Comme on le constate à la figure 25, la radioactivité dans ce pic augmente beaucoup plus tard. Lors de la deuxième expérience effectuée avec l'homogénat, la radioactivité contenue dans ce pic au cours des premiers 24 heures s'est avérée négligeable. La radioactivité de 10-deacetylbaccatin III, n'a pu être suivie étant donné que le temps de rétention de ce taxane (19,2 min.) se trouve dans une région très complexe où de nombreux produits n'étant pas des taxanes sont présents. Nous étions intéressés par la radioactivité de ces deux derniers taxanes car d'après leur structure, ces composés pourraient plausiblement être des intermédiaires à la formation du taxol. Cependant, si le taxol se forme bien dans les premiers cinq heures d'incubation, le composé 7,9 deacetylbaccatin VI n'est assurément pas un intermédiaire.

La deuxième expérience a été effectuée dans un laps de temps très court, donc peu de produits avait incorporé le précurseur. Dans la région du chromatogramme contenant la majorité des taxanes, seulement trois pics contenaient une radioactivité non-négligeable, soit le pic du taxol, le pic de 10-deacetyltaxol et le pic au temps de rétention de cephalomannine. Fait intéressant, ces trois composés possèdent une chaîne latérale de Winterstein. Suite à cette expérience, nous avons effectué un autre "KPL", mais cette fois-ci en utilisant un précurseur de la chaîne latérale, soit la phénylalanine. Cependant, contrairement à ce que nous avons prédit, la phénylalanine a été incorporée dans pratiquement

tous les produits de l'extrait et non seulement dans les produits possédant dans leur chaîne latérale, un acide de Winterstein. Nous croyons que la phénylalanine a été dégradée dans l'homogénat et que ce sont ces produits de dégradation qui ont été incorporés dans les divers produits de l'extrait. La formation du taxol ne peut donc être suivie à l'aide de ce précurseur.

La technique de "KPL" est pratiquement la seule technique nous permettant de suivre *in vivo*, la formation d'un produit. Cette technique est toutefois assez fastidieuse à réaliser et demeure qualitative. Des études plus approfondies doivent être faites suite aux résultats d'un "KPL". L'inconvénient majeur de notre méthode de travail est que les taxanes dans nos échantillons sont présents en trop faible quantité pour être par la suite purifiés et analysés.

2.4 Analyse des échantillons prélevés au temps 5 heures

Pour vérifier si l'augmentation de la radioactivité dans le pic au temps de rétention du taxol provenait bien du taxol, nous devons travailler avec l'extrait complet. De plus, nous devons utiliser l'extrait de deux échantillons (5H et 5HD) plutôt qu'un seul, afin d'avoir assez de produits pour effectuer toutes nos analyses.

Lors de l'injection de l'échantillon 5HD à un gradient de 140 minutes, on constate que le pic du taxol contient toujours la radioactivité et que celle-ci demeure supérieure à celle contenue dans les autres pics. La valeur en cpm est inférieure à la valeur initiale, cependant ceci s'applique pour tous les autres pics du chromatogramme. Cette diminution de radioactivité peut être due au fait que

les injections avec standards (gradient de 50 et de 140 minutes) ont été effectuées à quelques semaines d'intervalle de la première injection de l'échantillon.

D'après les résultats de l'acétylation de l'échantillon 5H, la radioactivité semble bien provenir du taxol. La radioactivité contenue initialement dans le pic du taxol (334.7 cpm) semble avoir migré dans les pics au temps de rétention du taxol monoacétylé (99.1 cpm) et diacétylé (215.5 cpm). La radioactivité de ces deux pics devrait contenir une valeur négligeable de radioactivité provenant de 10-deacetyltaxol car lors de l'injection à un gradient de 140 minutes, la radioactivité initiale dans le pic de 10-deacetyltaxol n'a pas été conservée. Cette radioactivité initiale provenait donc de d'autres composés et non de 10-deacetyltaxol.

Les conditions de travail n'étaient pas idéales étant donné que nous devons travailler avec l'extrait total. Le chromatogramme de l'extrait est fort complexe et de plus le taxol est un produit très minoritaire dans cet extrait. Après l'acétylation, un ou plusieurs produits se trouvaient au même temps de rétention que le taxol non-acétylé et formaient un pic majoritaire (pic 1 de la figure 31B). Ceci amène deux inconvénients majeurs 1) nous ne pouvons confirmer si tout le taxol a été acétylé et 2) si toute la radioactivité initiale a migré. En effet, nous ne pouvons savoir si la radioactivité contenue dans le pic 1 provient du/des nouveaux produits ou bien de produits n'ayant pas réagi à l'acétylation (taxol ou impuretés).

Ces résultats préliminaires sont encourageants, toutefois pour vraiment prouver que le taxol est formé au temps 5 heures, il faudrait préparer un homogénat à très grande échelle. Les échantillons prélevés devraient contenir

assez de taxol pour être en mesure de le purifier et par la suite d'acétyler ce taxol pur. L'homogénat devrait, cependant, être préparé à partir de plantes récoltées au printemps afin de maximiser l'incorporation du précurseur.

Il est important de connaître la période pendant laquelle le taxol se forme, afin de pouvoir suivre les intermédiaires de cette formation. Ces intermédiaires peuvent être suivis par l'incorporation de précurseurs préliminaires radioactifs (exemple: acétate, mévalonate). Une autre méthode pour connaître si un composé est un intermédiaire, est de produire ce composé par synthèse organique (ex: 10-deacetylbaocatin III) de façon à ce que ce produit soit radioactif et puis, de le fournir à l'homogénat. Si le produit dont on étudie la biosynthèse devient radioactif, cela veut donc dire que le produit synthétisé est un intermédiaire. Donc, comme je l'ai mentionné il est nécessaire de connaître le temps selon lequel le taxol se forme, lorsque ce temps sera connu un "grand pas" aura été fait dans les études de biosynthèse du taxol.

Le taxol semble être formé dans les premières heures d'incubation donc, cela ne cause pas de problèmes au niveau de l'homogénat. Cependant si le taxol s'avérait être formé après plusieurs jours d'incubation, il faudrait à ce moment, se questionner afin de savoir à quel moment le contenu biologique (enzymatique) de l'homogénat se détériore.

3. VOIES D'AVENIR

Récemment, il a été découvert qu'un champignon parasite de l'if, produit du taxol mais en très faible quantité, soit des nanogrammes par litre de culture (102). Ce champignon est appelé Taxomyces andreanae. En améliorant les techniques de culture ainsi qu'en ayant recours au génie génétique, il est fort probable que les auteurs parviennent à augmenter la production de taxol par ce champignon.

Une technique fort intéressante est la technique de culture cellulaire de Taxus sp. Les conditions de culture ont été assez bien améliorées aux cours des dernières années, pour permettre l'isolement de nouveaux taxanes et ce, en quantité fort respectable (103). Il est à noter par contre, que les taxanes isolés en culture cellulaire sont généralement différents des taxanes isolés de la "souche mère" et de plus, la concentration en taxol demeure minime.

Ces deux voies sont d'après moi, les voies d'avenir. Les cultures mycéliales et les cultures cellulaires offrent tout deux l'avantage d'être des sources renouvelables et donc, d'épargner l'environnement. Ces deux techniques doivent cependant être améliorées afin de maximiser la production en taxol. Si ces objectifs sont atteints, la production en taxol à large échelle sera possible et peut être que ces techniques permettront une meilleure incorporation de précurseurs ce qui faciliterait grandement les études sur la biosynthèse du taxol.

CONCLUSION

Le taxol, isolé pour la première fois de Taxus brevifolia, est certes, un composé très intéressant tant au point de vue de sa structure chimique que de son activité biologique. Tel que présenté dans la revue bibliographique, l'identification des taxanes contenus dans les différentes espèces d'ifs a été largement étudiée. Ces études ont mené entre autres à la découverte de taxanes fort intéressants tels que 10-deacetylbaccatin III (Taxus baccata) et de 7,9-deacetylbaccatin VI (Taxus canadensis). L'intérêt suscité par ces deux taxanes provient du fait qu'après modifications chimiques (ajout d'une chaîne latérale), il en résulte deux produits ayant une meilleure activité biologique *in vitro* que le taxol (taxotère et 9-dihydrotaxol). Autre fait intéressant, est que ces composés sont les taxanes majoritaires dans l'if où ils furent isolés pour la première fois.

L'isolement de différents types de taxanes a également permis d'émettre certaines hypothèses quant à l'origine des taxanes ainsi que sur leur formation dans la plante. Selon Potier (12), les taxanes proviendraient de la cyclisation du geranyl-geraniol-pyrophosphate. Cette cyclisation pourrait s'effectuer de deux façons et ainsi donner lieu à la formation de différents groupes de taxanes. Les taxanes possédant un époxyde seraient les intermédiaires des taxanes possédant un cycle oxétane (taxol). La découverte récente de taxanes appelés pré-oxétanes vient appuyer cette hypothèse de Potier (12).

Ces hypothèses quoique généralement acceptées, devront toutefois être confirmées par biosynthèse. Jusqu'à présent les travaux de biosynthèse ont confirmé que le squelette du taxol est formé à partir de l'acétate et du mévalonate, tandis que la chaîne latérale est formée à partir de la phénylalanine. Les travaux présentés dans les sections précédentes visaient entre autres, le développement

d'une méthode permettant l'étude des intermédiaires à la formation du taxol dans le temps (Kinetic Pulse Labelling). La méthode de choix s'est avérée celle utilisant un homogénat d'aiguilles. Après 5 heures d'incubation le pourcentage d'incorporation du précurseur dans le taxol était à son niveau maximal, ce qui laisse supposer que la formation du taxol a lieu au cours de cet intervalle de temps.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'homogénat mais cette fois-ci à grande échelle, afin d'obtenir une quantité suffisante en taxol pour permettre sa purification et ainsi démontrer clairement le temps où a lieu la formation du taxol. Par la suite, des précurseurs plus "tardifs" pourraient être introduits à l'homogénat. Ceci pourrait nous permettre de connaître les mécanismes naturels impliqués dans la synthèse du taxol.

Au cours des dernières années, les études reliées à l'aspect clinique du taxol ont évolué très rapidement, cependant du point de vue fondamental, beaucoup d'avenues restent encore à être explorées.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Lolita O. Zamir pour m'avoir si bien guidé tout au long de mes travaux ainsi que pour m'avoir fait connaître et aimer la recherche. Je remercie tout spécialement le Dr. Marie E. Nedeia pour ses judicieux conseils et son dévouement ainsi qu'Anastasia pour sa précieuse aide. Je tiens également à souligner le support financier du FCAR, de l'Institut Armand-Frappier et du Dr. Lolita O. Zamir qui, grâce aux bourses qu'ils m'ont octroyées, ont permis la réalisation de ce travail. Puis finalement, j'aimerais remercier mon mari Steven pour ses encouragements et son support.

BIBLIOGRAPHIE

1. M.C.WANI, H.L.TAYLOR, M.E.WALL, P.COOGON et A.T.McPHAIL. 1971. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. J.Am.Chem.Soc. 93: 2325-2326
2. P.B.SCHIFF, J.FANT et S.B.HORTWITZ. 1979. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature 277: 665-667.
3. B.STU. 1994. Total synthesis of anticancer agent taxol achieved by two different routes. Chemical and Engineering News Feb. 21: 32-36.
4. K.M.WITHERUP, S.A.LOOK, M.W.STASKO, T.J.GHIORZI et G.MUSHIK. 1990. Taxus spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of Taxus brevifolia: analysis and isolation. J.Nat.Prod. 53: 1249-1255.
5. G.CHAUVIÈRE, D.GUÉNARD, C.PASCARD, F.PICOT, P.POTIER et T.PRANGE. 1982. New derivatives from Taxus baccata L. (Taxaceae). J.Chem.Soc.Chem.Comm.: 495-496.
6. J.N.DENIS, A.E.GREENE, A.A.SERRA et G.LUCHE. 1986. An efficient, enantioselective synthesis of the side chain. J.Org.Chem. 51: 46-50.
7. J.N.DENIS, A.E.GREENE, D.GUÉNARD, F.GUÉRITTE-VOEGELEIN, L.MANGATAL et P.POTIER. 1988. A highly efficient, practical approach to natural taxol. J.Am.Soc. 110: 5917-5918.
8. I.RINGEL, S.B.HORTWITZ. 1994. Studies with RP56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. J.Nat.Canc.Inst. 83: 288-291.
9. R.A.HOLTON, C. SOMOZA, H-B. KIM, F.LIANG, R.J.BIEDIGER. 1994. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. J.Am.Chem.Soc. 116: 1597-1598.
10. K.C.NICOLAOU, Z.YANG, J.J.LIU, H.VENO, P.G.NANTERMET, R.K.GUY, C.F.CLAIRBONE, J.RENAUD, E.A.COULADOUROS, K.PAULVANNAN et E.J.SORENSEN. 1994. Total synthesis of taxol. Nature 367: 630-634.

11. D.G.I.KINGSTON, A.A.MOLINERO, J.M.RIMOLDI. 1993. Progress in the chemistry of organic natural products 61: 1-188.
12. F.GUERITTE-VOEGELEIN, D.GUENARD et P.POTIER. 1987. Taxol and derivatives: A biogenic hypothesis. J. Nat. Prod. 50: 9-17.
13. D.P.DELLA CASA DE MARCANO et T.G.HALSALL. 1969. The isolation of seven new taxanes derivatives from the heartwood of yew (Taxus baccata L.). Chem.Comm. 1282-1283.
14. H.ERDTMAN et K.TSUNO. 1969. Taxus hearthwood constituents. Phytochem. 8: 931-932.
15. T-I.HO, G.H.LEE, S.M.PENG, M.K.YEN, F.C.CHEN et W.L.YANG. 1987. Structure of Taxusin. Acta Cryst. C43: 1378-1380.
16. C.L.LIU, Y.C.LIN, Y.M.LIN et F.C.CHEN. 1984. Constituents of the heartwood of Taiwan yew. Tai'wan Ko'hsueh 38: 119.
17. M.MIYAZAKI, K.SHIMIZU, H.MISHINMA et M.KURABAYASHI. 1968. The constituent of the heartwood of the Taxus cuspidata (Sieb. et zucc.). Chem.Pharm.Bull. 16: 546-548.
18. W.R.CHAN, T.G.HALSALL, G.M.HORNBY, A.W.OXFORD, W.SABEL, K.BJAME, G.FERGUSON et J.M.ROBERTSON. 1966. Taxa-4(16),11-diene-5 α ,9 α ,10 β ,13 α -tetraol, anew derivative from the heartwood of yew (T. baccata L.). Chem.Comm. 923-925.
19. M.K.YEH, J.S.WANG, L.P.LIU et F.C.CHEN. 1988. Some taxane derivatives from the heartwood of Taxus mairei. J.Chin.Chem.Soc. 35: 309.
20. L.ETTOUATI, A.AHOND, O.CONVERT, C.POUPAT et P.POTIER. 1989. Plantes de Nouvelle-Colédonie. Taxanes isolés des écorces de tronc d'Austrotaxus spicata compton (taxacées). Bull.Chim.France: 687-694.
21. L.ETTOUATI, A.AHOND, O.CONVERT, D.LAURENT, C.POUPAT, et P.POTIER. 1988.Plantes de Nouvelle-Colédonie. Taxanes isolés des feuilles d'Austrotaxus spicata compton (taxacées). Bull.Chim.France: 749-755.

22. D.G.I.KINGSTON, D.R.HAWKINS et L.OVINGTON. 1982. New taxanes from Taxus brevifolia. J.Nat.Prod. 45: 466-470.
23. Z.H.JIA, et Z.P.ZHANG. 1991. Taxanes from Taxus chinensis. Chi.Sci.Bull. 36: 1174.
24. F.BALZA, S.TACHIBANA, H.BARRIOS et G.H.N.TOWERS. 1991. Brevifoliol, a taxane from Taxus brevifolia. Phytochem. 30: 1613-1614.
25. H.C.CHIANG, M.C.WOODS, Y.NAKADAIRA et K.NAKANISHI. 1967. The structure of four new taxanine congeners and photochemical transannular reaction. Chem. Commun.: 1201-1202.
26. H.C.CHIANG. 1975. The constituents of Taxus chinensis. Rehd.Shi Ta Hsueh Pao 20: 147.
27. L.BARBONI, P.GARIBOLDI, E.TORREGIANI et G.APPENDINO. 1993. Taxanes from the needles of Taxus wallichiana. Phytochem. 33: 145-150.
28. G.APPENDINO, S.TAGLIAPIETRA et H.C.OZEN. 1993. Taxanes from the seeds of Taxus baccata. J.Nat.Prod. 56: 514-520.
29. K.FUJI, K.TANAKA et B.LI. 1992. Taxchinin A: a diterpenoid from Taxus chinensis. Tetrahedron Letters 33: 7915-7916.
30. B.LI, K.TANAKA, K.FUJI. 1993. Three new diterpenoids from Taxus chinensis. Chem.Bull. 41: 1672-1673.
31. L.ETTOUATI, A.AHOND, C.POUPAT et P.POTIER. 1991. Revision structurale de la Taxine B, alcaloide majoritaire des feuilles de l'if d'Europe, Taxus baccata. J.Nat.Prod. 54: 1455-1458.
32. E.GRAF. 1958. Das haupta lkoloid von Taxus baccata. L.Arch.Pharm.: 443.
33. E.GRAF, S.WEINANDY, B.KOCH et E.BREITMAIER. 1986. ¹³C-NMR untersuchung von Taxin B aus Taxus baccata. L.Leibigs Ann.Chem.: 1147.
34. M.K.YEH, J.S.WANG, L.P.LIU et F.C.CHEN. 1988. A new taxane derivative from the heartwood of Taxus mairei. Phytochem. 27: 1534-1536.

35. Z.ZHANG et Z.JIA. 1991. Taxanes from Taxus chinensis. Phytochem. 30: 2345-2348.
36. J.N.BAXTER, LYTHGOE, B.SCALES, R.M.SCROWSTON et S.TRIPPETT. 1962. Taxine part 1. Isolation studies and the fonctionnal groups of o-cinnamoyltaxicin-1. J.Chem. Soc.: 2964-2965.
37. M.DUKES, D.H.EYRE, J.W.HARRISSON, R.M.SCROWSTON et B.LYTHGOE. 1967. Taxine Part V. The structure of Taxicin II. J.Chem.Soc.C.: 448-449.
38. M.KURONO, Y.NAKADAIRA, S.ONUMA, K.SASAKI et K.NAKANISHI. 1963. Taxinine. Tetrahedron Letters 30: 2153-2160.
39. M.C.WOODS, H.C.CHIANG, Y.NAKADAIRA et K.NAKANISHI. 1968. The nuclear over hauser effect, a unique method of defining the relative stereochemistry and conformation of taxane derivatives. J. Am. Chem.Soc. 90: 522-523.
40. Z.D.MIN, H.JIANG et J.Y.LIANG. 1981. Studies on the taxane diterpenes of the heartwood from Taxus mairei. Acta Phar.Sin.(Yaouxue Xuebao) 24: 673.
41. J.Y.LIANG, Z.D.MIN et M.NIWA. 1988. Studies on the diterpenes of Taxus marei II. Structure of 2-deacetoxytaxinine. J.Acta Chim. Sin.(Huaxe Xuebao) 46: 1053.
42. G.APPENDINO, P.GARIBOLDI, A.PESETTA, E.BOMBARDEKKI et B.GABETTA. 1992. Taxanes from Taxus baccata. Phytochem. 31: 4253-4257.
43. M.K.YEH, J.S.WANG, W.L.YANG, et F.C.CHEN. 1988. A new taxane derivative from the heartwood of Taxus mairei. Proc. Natl. Sci. Counc.,Rep. China, PartA: Phys.Sci.Eng. 12: 89.
44. T.I.HO, Y.C.LIN, G.H.LEE, S.M.PENG, M.K.YEH et F.C.CHEN. 1987. Structure of Taiwanxan. Acta Cryst. C43: 1380-1382.
45. F.YOSHIZAKO, M.FUKUDA, S.HISAMICHI, T.ISHIDA et Y.IN. 1988. Structure of taxane diterpenoids from the seeds of Japanese yew, Taxus cuspidata. Chem. Pharm. Bull. 36: 2098-2101.

46. Z.P.ZHANG, O.J.JIA, Z.Q.ZHU, Y.X.CUI, J.L.CHENG et Q.G.WANG. 1989. Studies on the chemical constituents of Taxus. Chi. Sci.Bull. 21: 1630.
47. Z.ZHANG, Z.JIA, Z.ZHU, Y.CUI, J.CHENG et Q.WANG. 1990. New taxanes from Taxus chinensis. Planta Med. 56: 293-294.
48. G.CHAUVIÈRE, D.GUÉNARD, C.PASCARD, F.PICOT, P.POTIER et T.PRANGE. 1982. New derivatives from Taxus baccata L. (Taxaceae). J.Chem.Soc.Chem.Comm.: 495-496.
49. G.CHAUVIÈRE, D.GUÉNARD, F.PICOT, V.SÉNILH et P.POTIER. 1981. Analyse structurale et étude biochimique de produits isolés de l'if: Taxus baccata L. (taxacées) C.R. Acad.Sc.Paris, Serie II, 293: 501-503.
50. Z.P.ZHANG et Z.J.JIA. 1990. New taxanes from Taxus chinensis. Z.Chin.Chem.Lett. 1: 91.
51. J.A.BEUTLER, G.M.CHMURNY, S.A.LOOK et K.M.WHITERUP. 1991. Taxinine M, a new tetracyclic taxane from Taxus brevifolia. J. Nat. Prod. 54: 893-897.
52. G.APPENDINO, P.LUSSO et P.GARIBOLDI. 1992. A 3,11-cyclotaxane from Taxus baccata. Phytochem. 31: 4259-4262.
53. D.P.DELLA CASA DE MARCENO et T.G.HALSALL. 1970. The structure of the diterpenoid baccatin-1, the 4 β ,20 epoxide of 2 α ,5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -hexaacetoxytaxa-4(20),11-diene. J.Chem. Soc.D (Chem. Commun.): 1381-1382.
54. R.W.MILLER, R.G.POWELL, C.R.SMITH Jr., E.ARNOLD, et J.CLARDY. 1981. Antileukemic alcoloids from Taxus wallichiana zucc. J. Org. Chem. 46, 1469-1474.
55. Z.ZHANG et Z.JIA. 1990. Taxanes from Taxus yunnanensis. Phytochem. 29: 3673-3675.
56. J.Y.LIAN, Z.D.MIN, M.MIZUNO, T.TANAKA et M.IINUMA. 1984. Two taxane diterpenes from Taxus mairei. Phytochem. 27: 3674-3676.
57. V.SENILH, S.BLECHERT, M.COLIN, D.GUÉNARD, F.PICOT, P.POTIER et P.VARENNE. 1984. Mise en évidence de nouveaux analogues du taxol extrait de Taxus baccata. J. Nat.Prod. 47: 131-136.

58. F.GUÉRITTE-VOGELEIN, D.GUÉNARD, F.LAVELL, M.T.LEGO'FF L.MANGATAL et P.POTIER. 1991. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. *J.Med.Chem.* 34: 992-998.
59. D.P.DELLA CASA DE MARCENO, T.G.HALSALL, E.CASTELLANO et O.J.R.HODDER. 1970. Crystallographic structure determination of the diterpenoid baccatin V, a naturally occurring oxetan with a taxane skeleton. *J.Chem.Soc.D (Chem. Commun.)*: 1382-1383.
60. D.P.DELLA CASA DE MARCENO et T.G.HALSALL. 1975. Structures of some taxane diterpenoids, Baccatins-III,IV,VII and 1-dehydroxybaccatin-IV possessing oxetan ring. *J.Chem. Soc.Chem. Comm.*: 365-366.
61. R.G.POWELL, R.W.MILLER et C.R.SMITH Jr. 1979. Cephalomannine: a new antitumor alkaloid from Cephalotaxus manni. *J.Chem.Soc. Chem.Comm.*: 102-103.
62. J.L.McLAUGHLIN, R.W.MILLER, R.G.POWELL et C.R.SMITH Jr. 1981. 19-hydroxybaccatin III, 10-deacetylcephalomannine and 10-deacetyltaxol: new antitumor taxanes from Taxus wallichiana. *J.Nat.Prod.* 44: 312-319.
63. K.FUJI, K.TANAKA et B.LI. 1993. Novel diterpenoids from Taxus chinensis. *J.Nat.Prod.* 56: 1520-1531.
64. M.C.WANI, H.L.TAYLOR, M.E.WALL, P.COGGON et A.T.McPHAIL. 1971. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. *J.Am.Chem.Soc.* 93: 2325-2326
65. C.H.O.HUANG, D.G.I.KINGSTON, N.F.MAGRI ET G.SAMARANAYAKE. 1986. New taxanes from Taxus brevifolia. *J.Nat.Prod.* 49: 665-669.
66. J.LIANG et D.G.I.KINGSTON. 1993. Two new taxane diterpenoids from Taxus mairei. *J.Nat.Prod.* 56: 594-599.
67. E.GRAF et H.BERTHOLDT. 1957. Das amorphe Taxin and Das kristallisierte Taxine-A. *Pharmazeutische Zentralhalle* 96: 385-395.
68. E.GRAF, A.KIRFEL, G-J.WOLFF ET E.BREITMAIER. 1982. Die aufklarung von Taxine A aus Taxus baccata. *L.Liebigs Ann.Chem.*: 376.

69. P.ROSSION. 1991. If contre cancer. *Sciences et vie* 82: 28-30.
70. D.G.I.KINGSTON, G.SAMARANAYAKE et C.A.IVEY. 1990. The chemistry of taxol. A clinical useful anticancer agent. *J.Nat.Prod.* 53: 1-12.
71. E.K.ROWINSKY, L.A.CAZENAVE et R.C.DONEHOWER. 1990. Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *J.Nat. Cancer Inst.* 82: 1247-1259.
72. E.K.ROWINSKY ET R.DONEHOWER. 1991. The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmac. Ther.* 52: 35-84.
73. F.A.HOLMES, R.S.WALTERS, R.L.THRIAULT, A.D.FORMAN, M.N.RABER A.U.BUZDAR, D.K.FRYE et G.N.HORTOBAGYI. 1991. Phase II trial of taxol an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J.Nat.Cancer Inst.* 83: 1797-1805.
74. P.COUILLARD. 1979. "Biologie cellulaire", Les éditions Études Vivantes: 99-103.
75. J.PARNESS et S.B.HORTWITZ. 1981. Taxol binds to polymerized tubuline *in vitro*. *J.Cell.Bio.* 91: 479-487.
76. E.K.ROWINSKY, R.C.DONEHOWER, R.J.JONES et R.W.TUCKER. 1988. Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res.* 48: 4093-4100.
77. C.L.MANTHEY, P-Y.PERERA, C.A.SALKOWSKI et S.N.VOGEL. 1994. Taxol provides a second signal for murine macrophage tumoricidal activity. *Journal of Immunology*: 825-831.
78. E.LEETE. 1990. Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids. *Planta Medica* 56: 339-352.
79. W.SANDERMANN, W.SCHEWEERS, K.BRUNS, H.STOCKMANN et O.BEINHOFF. 1968. Studies on the biosynthesis of terpenes in conifers with labelled precursors. *Bulletin of The National Institut of Science of India* 37, 168-174.
80. J.W.HARRISON, R.M.SCROWSTON et B.LYTHGOE. 1966. Taxine part IV. The constituents of Taxine-1. *J.Chem.Soc.C.*: 1933-1934.

81. L.O.ZAMIR, M.N.NEDEA, F.X.GARNEAU. 1992. Biosynthetic building blocks of Taxus canadensis taxanes. Tetrahedron Letters 33: 5235-5236.
82. G.A.STROBEL, A.STIERLE et F.J.G.M. VAN KUIJK. 1992. Factors influencing the in vitro production of radiolabeled taxol by Pacific yew, Taxus brevifolia. Plant Science 84: 65-74.
83. E.WINTERSTEIN et D.I.ALTRIDES. 1921. Uber das aus Taxus baccata, eibe, darstellbare alkaloid taxin. Physiol. Chem. 117: 240.
84. E.WINTERSTEIN et A.GUYER. 1923. Weifere beitrage zur kenntnis des taxins. Physiol.Chem. 128: 176.
85. E.LEETE et G.B.BODEM. 1966. The biosynthesis of 3-dimethylamino-3-phenyl-propanoic acid in yew. Tetrahedron Letters 33: 3925-3927.
86. P.E.FLEMING, U.MOCEK et H.G.FLOSS. 1993. Biosynthesis of taxoids. Mode of formation of the taxol side chain. J.Am.Chem.Soc. 115: 805-807.
87. D.V.BASSHAM, A.A. BENSON et M.CALVIN. 1953. Isotope studies in photosynthesis. J.Chem.Ed. 30: 274-283.
88. A.T.WILSON et M.CALVIN. 1955. The photosynthetic cycle. CO₂ dependent transients. J. Am. Chem. Soc. 77: 5948-5957.
89. D.V.BANTHORPE et A.WIRZ-JUSTICE. 1969. Terpenes biosynthesis. J.Chem.Soc.sect.C; Org.Chem.: 541-549.
90. A.I.SCOTT, P.B.REICHARDT, M.B.SLAYLOR et J.G.SWEENY. 1971. Mechanisms of indol alkaloid biosynthesis recognition of intermediacy and sequence by short term incubation. Bioorg.Chem. 1: 157-173.
91. P.I.FORESTER et G.M.GAUCHER. 1972. Conversion of 6-methylsalicylic acid into patulin by Penicillium urticao. Biochemistry 11: 1102-1107.
92. L.O.ZAMIR et K.A.DEVOR. 1987. Kinetic Pulse Labelling study of Fusarium culmorum. Journal of Biological Chemistry 262: 15348-15252.

93. N.SINGH et R.LUTHRA. 1987. Sucrose metabolism and essential oil accumulation during lemon grass leaf development. *Plant Science* 57: 127-133.
94. G.J.KADAKASSERIL, L.LAM et E.J. STABA. 1987. Effect of sterol inhibition on the incorporation of ¹⁴C-isopentenyl-pyrophosphate into artemisinin by a cell-free system from *Artemisa annua*. *Tissues culture and plant. Planta Medica*: 280-283.
95. W.MELLADO, N.F.MAGRI, D.G.I.KINGSTON, R.GARCIA-ARERAS, G.A.ORR et S.B.HORTWITZ. 1984. Preparation and biological activity of taxol acetates. *Biochem.Biophy.Res.Comm.* 124: 329-336.
96. F.GUERITTE-VOGELEIN, V.SENILH, B.DAVID, D.GUENARD et P.POTIER. 1986. Chemical studies of 10-deacetylbaaccatin III, hemisynthesis of taxol derivatives. *Tetrahedron* 42: 4451-4460.
97. L.O.ZAMIR, M.N.NEDEA, S.BÉLAIR, F.SAURIOL, O.MAMER, E.JACOMAIN, F.I.JEAN, F.X.GARNEAU. 1992. Taxanes isolated from *Taxus canadensis*. *Tetrahedron Letters* 33: 5173-5176.
98. G.P.GUNAWARDANA, U.PREMACHANDRAN, N.S.BURRES, D.N.WHITTERN, R.HENRY, S.SPANTON et J.B.McALPINE. 1992. Isolation of 9-dihydro-13-acetylbaaccatin III from *Taxus canadensis*. *J.Nat.Prod.* 55: 1686-1689.
99. S.ZHANG, W.M.CHEN et Y.H.CHEN. 1992. *Acta Pharmaceutica Sinica* 27: 268-272.
100. L.L.KLEIN. 1993. Synthesis of 9-dihydrotaxol: a novel bioactive taxane. *Tetrahedron Letters* 34: 2047-2050.
101. G.APPENDINO, P.GARIBOLDI, B.GABETTA, E.BOMBARDELLI. 1993. Taxoids from the needles of yew. *Fitoterapia*, LXIV, suppl.al.No1. : 37-46.
102. A.STIERLE,G.STROBEL et D.STIERLE. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260: 214-216.
103. W.MA, G.L.PARK, G.A.GOMEZ, M.H.NIEDER, T.L.ADAMS, J.S.AYNSLEY, O.P.SAHAI, R.J.SMITH, R.W.STAHLUT, P.J.HYLANDS. 1994. New bioactive taxoids from cell cultures of *Taxus baccata*. *J.Nat.Prod.* 57: 116-122.