



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1
2009

FACULTÉ DE PHARMACIE

**Intérêt pharmaceutique du genre
Taxus et des Taxanes ; culture *in vitro* et dosage**

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le jeudi 3 décembre 2009

pour obtenir :
le Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Par
Pierre VALLATA
Né le 15 décembre 1982 à Nancy (54)

Membres du jury

Président :

M. Max HENRY, Professeur

Juges :

Mme Dominique LAURAIN-MATTAR, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

M. Alain MOREAU, Pharmacien à Champigneulle (54)

M. François MORTIER, Professeur Honoraire, Faculté de Pharmacie de Nancy

N° d'identification : 3155

TITRE

Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture *in vitro* et dosage

Thèse soutenue le jeudi 3 décembre 2009
par Pierre VALLATA

RÉSUMÉ

Le genre *Taxus* se compose d'arbres ou d'arbustes à feuillage persistant très présents dans nos régions. Selon les classifications phylogénétiques récentes le genre *Taxus* appartient à l'ordre des *Pinales* ; Les *Taxus* sont donc des conifères. Le genre *Taxus*, qui s'étend dans le monde entier, est principalement présent dans l'hémisphère Nord. Les arbres ou arbustes du genre *Taxus* sont extrêmement toxiques et peuvent, en cas d'ingestion d'une partie de la plante, entraîner la mort. En effet toutes les parties de la plante à l'exception de l'arille (le faux fruit) contiennent des substances appelées taxines responsables de la toxicité.

Cependant, le genre *Taxus* est à l'origine de la découverte de deux molécules anticancéreuses formant la classe pharmaceutique des taxanes : le paclitaxel et le docetaxel. C'est en 1971 que Monroe E. Wall et Mansukh C. Wani publient la structure du paclitaxel. Depuis, l'intérêt porté au genre *Taxus* n'a pas cessé d'augmenter jusqu'à la mise au point du Taxol® (paclitaxel) et du Taxotère® (docetaxel). Le mécanisme d'action des taxanes est nouveau : ils sont des stabilisateurs du fuseau mitotique.

Le paclitaxel est une molécule complexe dont l'approvisionnement reposait lors du développement du Taxol® en son extraction à partir de *Taxus brevifolia*. Cependant le faible rendement du procédé ainsi que son impact écologique poussent le monde scientifique à découvrir d'autres voies d'approvisionnement. En 1994 la synthèse chimique totale du paclitaxel est découverte. Cependant cette synthèse est non viable au niveau industriel du fait de ses coûts écologique et financier. Aujourd'hui les voies d'obtention du paclitaxel sont l'hémisynthèse à partir de la 10-deacetylbaccatine III et la culture cellulaire.

Dans cette thèse il est décrit une étude sur la micropopagation de *Taxus x media* var. *Hicksii* qui est une espèce à forte teneur en paclitaxel. La culture *in vitro* a été réalisée sur un milieu de culture gélosé durant plusieurs mois avec des repiquages successifs. Parallèlement, on réalise l'étude de l'impact des hormones de croissances sur la culture *in vitro* de *Taxus baccata*.

L'extraction et le dosage du paclitaxel et de la 10-deacetylbaccatine III sont réalisés à partir de feuilles, d'écorces et de tiges de *Taxus baccata*. L'extraction comprend une étape d'extraction liquide/solide, une étape de purification par précipitation et une extraction liquide/liquide. Les extraits sont analysés par CLHP associée à une détection UV.

MOTS CLÉS

Paclitaxel ; taxanes ; culture *in vitro* ; phytochimie ; *Taxus*

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|----------------------|---------------------------------------|---|
| Professeur Max Henry | Laboratoire de Botanique et Mycologie | Expérimentale <input type="checkbox"/> |
| | | Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | Thème <input type="checkbox"/> |

Thèmes 1 - Sciences fondamentales 2 - Hygiène/Environnement
3 - Médicament 4 - Alimentation - Nutrition
5 - Biologie 6 - Pratique professionnelle

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1

Demande d'imprimatur

Date de soutenance : Jeudi 3 décembre 2009

**Diplôme d'état de Docteur en
Pharmacie**

présenté par **Pierre VALLATA**

Sujet :

Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des
Taxanes ; culture *in vitro* et dosage.

Jury :

Président :

M. Max HENRY, Professeur

Juges :

Mme Dominique LAURAIN-MATTAR,
Professeur

M. Alain MOREAU, Pharmacien

M. François MORTIER, Professeur
Honoraire

Vu,

Nancy, le **5/11/2009**

Le Président du Jury,



M. Max HENRY,
Professeur

Le Directeur de Thèse,



M. Max HENRY,
Professeur

Vu et approuvé,

Nancy, le **6 novembre 2009**

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

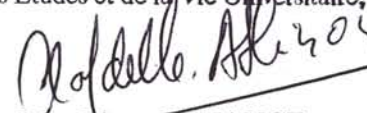

Chantal FINANCE


Vu,

Nancy, le **13.11.2009**

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,


Jean-Benoît FINANCE
C. CARDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : **3155 -**

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Mobilité ERASMUS & Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD & Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire

Claude VIGNERON

Professeurs Emérites

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

Professeurs Honoraires

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Gérald CATAU
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Marie-Catherine BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER Pharmacie clinique
Alain BAGREL Biochimie
Jean-Claude BLOCK Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER Microbiologie environnementale
Max HENRY Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER Biochimie
Pierre LEROY Chimie physique générale
Philippe MAINCENT Pharmacie galénique
Alain MARSURA Chimie thérapeutique
Patrick MENU Physiologie
Jean-Louis MERLIN Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS Chimie thérapeutique

Bertrand RIHN Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON Economie de la santé, Législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Monique ALBERT Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS Parasitologie
Mariette BEAUD Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT Communication et Santé
Isabelle BERTRAND Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN Chimie thérapeutique
François BONNEAUX Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER Chimie Physique
Cédric BOURA Physiologie
Jean-Claude CHEVIN Chimie générale et minérale
Igor CLAROT Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB Parasitologie, Mycologie
Joël COULON Biochimie
Sébastien DADE Bio-informatique
Dominique DECOLIN Chimie analytique
Béatrice DEMORE Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY Chimie thérapeutique
François DUPUIS Pharmacologie
Raphaël DUVAL Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE Hématologie
Adel FAIZ Biophysique-acoustique
Luc FERRARI Toxicologie
Stéphane GIBAUD Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT Chimie organique
Frédéric JORAND Santé et Environnement
Olivier JOUBERT Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT Informatique, Biostatistiques
Faten MEHRI-SOUSSI Hématologie biologique
Christophe MERLIN Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU Pharmacognosie
Maxime MOURER Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS Informatique
Christine PERDICAKIS Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO Pharmacologie
Virginie PICHON Biophysique
Anne SAPIN Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY Santé publique

Gabriel TROCKLE Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Anne MAHEUT-BOSSER Sémiologie

PROFESSEUR AGRÉGÉ

Christophe COCHAUD Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS Bactériologie

Bibliothèque Universitaire Santé-Lionnois (Pharmacie-Odontologie)

Anne-Pascale PARRET Directeur

« LA FACULTÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IM-
PROBATION AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES, CES OPINIONS
DOIVENT ÊTRE CONSIDÉRÉES COMME PROPRES À LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Remerciements

J'adresse mes remerciements sincères aux Professeurs Max HENRY et Dominique LAURAIN-MATTAR pour leur disponibilité au cours de ma thèse mais également lors d'un stage de 3 mois en 2007 au Laboratoire de Botanique et Mycologie dont les travaux sont repris dans cette thèse.

Tous mes remerciements à Alain MOREAU et François MORTIER qui me font le plaisir d'être membres du jury.

À mon grand-père, André.

À Mélina.

Et enfin à mes parents sans qui je ne serais pas ici.

Puisse cette thèse vous plaire.



Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 7 |
| I Revue générale de la littérature sur le sujet traité | 8 |
| 1 Le genre <i>Taxus</i> | 9 |
| 1.1 Classification | 9 |
| 1.1.1 Classification classique | 9 |
| 1.1.2 Classification phylogénétique | 9 |
| 1.2 Description botanique | 12 |
| 1.2.1 Description botanique d'après G. Bonnier [14] | 12 |
| 1.2.2 Description botanique d'après la <i>Flora Europaea</i> [38] | 15 |
| 1.2.3 Description botanique du genre <i>Taxus</i> , Edward A. Cope, <i>The Botanical Review</i> [24] | 15 |
| 1.2.4 Description botanique de <i>Taxus baccata</i> : vulgarisation | 20 |
| 1.2.5 Fleurs | 20 |
| 1.2.6 Fruits | 21 |
| 1.3 Toxicité de l'if | 24 |
| 1.3.1 Taxines [76, 8] | 25 |
| 1.3.2 Pharmacologie | 27 |
| 1.3.3 Symptômes, diagnostic et traitement | 29 |
| 2 Intérêt pharmaceutique du genre <i>Taxus</i> | 30 |
| 2.1 Stratégie de recherche et développement d'un médicament | 30 |
| 2.1.1 Phase initiale de recherche | 30 |
| 2.1.2 Première phase du développement : la formulation | 31 |
| 2.1.3 Les études cliniques | 31 |
| 2.2 Découverte et développement du Paclitaxel | 32 |
| 2.2.1 Première découverte et étude du Taxol | 32 |
| 2.2.2 Développement et mise sur la marché du Taxol | 33 |
| 2.3 Structure des taxanes : paclitaxel et docétaxel | 34 |
| 2.4 Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel | 34 |
| 2.4.1 Extraction du paclitaxel à partir de <i>Taxus brevifolia</i> | 34 |
| 2.4.2 La voie de l'hémisynthèse | 37 |
| 2.4.3 La synthèse totale | 41 |
| 2.4.4 Les biotechnologies | 41 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5 | Pharmacocinétique et métabolisme | 43 |
| 2.6 | Mécanisme d'action pharmacologique | 43 |
| 2.6.1 | Le cycle cellulaire [3] | 43 |
| 2.6.2 | La mitose | 46 |
| 2.6.3 | Les microtubules | 48 |
| 2.6.4 | Mécanisme d'action pharmacologique des taxanes | 51 |
| 2.7 | Relation structure-activité du paclitaxel | 53 |
| II | Partie expérimentale | 55 |
| 3 | Culture <i>in vitro</i> de <i>Taxus baccata</i> et <i>Taxus x media</i> var. <i>Hicksii</i> | 56 |
| 3.1 | Introduction | 56 |
| 3.2 | Matériels et méthodes | 56 |
| 3.2.1 | Matériel végétal | 56 |
| 3.2.2 | Milieu de culture | 58 |
| 3.2.3 | Culture <i>in vitro</i> de <i>T. baccata</i> | 61 |
| 3.2.4 | Culture <i>in vitro</i> de <i>T. x media</i> var. <i>Hicksii</i> | 61 |
| 3.3 | Résultats et discussions | 63 |
| 3.3.1 | Culture <i>in vitro</i> de <i>T. baccata</i> | 63 |
| 3.3.2 | Culture <i>in vitro</i> de <i>T. x media</i> var. <i>Hicksii</i> | 63 |
| 4 | Dosage des Taxanes | 74 |
| 4.1 | Introduction | 74 |
| 4.2 | Matériels et méthodes | 74 |
| 4.2.1 | Extraction des taxanes à partir des tissus végétaux (écorces, aiguilles et tiges) | 74 |
| 4.2.2 | Analyse des extraits par CLHP | 76 |
| 4.3 | Résultats et discussions | 76 |
| | Conclusion | 83 |
| | Bibliographie | 84 |
| | Annexes | 89 |
| A | Monroe E. Wall (1916-2002) | 89 |
| B | Mansukh C. Wani | 91 |
| C | Rédiger un document sous L^AT_EX | 93 |
| C.1 | L ^A T _E X c'est quoi ? | 93 |
| C.2 | L ^A T _E X est ce que c'est simple ? | 94 |
| C.3 | Où trouver L ^A T _E X, comment l'installer et comment débiter ? | 94 |

| | |
|---|------------|
| C.4 Les solutions que j'ai utilisés | 94 |
| Glossaire | 95 |
| Index | 104 |

Table des figures

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | <i>Taxus baccata</i> [14] | 14 |
| 1.2 | If situé au parc de la Pépinière à Nancy(54) | 21 |
| 1.3 | <i>Taxus baccata</i> [69] | 22 |
| 1.4 | Fleurs mâles de l'if commun | 23 |
| 1.5 | L'arille de <i>T. baccata</i> | 23 |
| 1.6 | L'if commun, une plante vénéneuse [16] | 25 |
| 1.7 | Structure des taxines A [76] | 26 |
| 1.8 | Structure des taxines B [76] | 27 |
| 2.1 | Structure du paclitaxel | 36 |
| 2.2 | Structure du docétaxel | 37 |
| 2.3 | 10-déacétylbaccatine III | 38 |
| 2.4 | Hémisynthèse du paclitaxel [11] | 39 |
| 2.5 | Lexique des réactifs et groupements chimiques utilisés pour les hémisynthèses du paclitaxel et du docétaxel | 40 |
| 2.6 | Hémisynthèse du docétaxel [11] | 42 |
| 2.7 | Métabolisme du paclitaxel [11] | 44 |
| 2.8 | Métabolisme du docétaxel [11] | 45 |
| 2.9 | Les quatres phases successives d'un cycle cellulaire standard d'une cellule eucaryote [3] | 47 |
| 2.10 | Cellule à l'interphase [3] | 48 |
| 2.11 | Prophase, prométaphase et métaphase [3] | 49 |
| 2.12 | Anaphase, télophase et cytotdiérèse [3] | 50 |
| 2.13 | Stucture de la tubuline et des microtubules | 52 |
| 2.14 | Relations structure-activité du paclitaxel | 54 |
| 3.1 | Plantule de <i>Taxus x media</i> var. <i>Hicksii</i> sur socle de cal | 57 |
| 3.2 | Mode opératoire de la préparation du milieu WPM | 61 |
| 3.3 | Effets classiques de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse <i>in vitro</i> des végétaux [79] | 62 |
| 3.4 | Procédures de stérilisation à l'hypochlorite de sodium et au peroxyde d'hydrogène | 66 |
| 3.5 | Schéma des repiquages de <i>T. x media</i> var. <i>Hicksii</i> | 67 |
| 3.6 | Séparation de la plantule de <i>T. x media</i> var. <i>Hicksii</i> et de son socle de cal | 68 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.7 | Nombre de plants de <i>T. baccata</i> non contaminés en culture <i>in vitro</i> en fonction du temps | 69 |
| 3.8 | Comparaison des effets de la stérilisation par NaClO et H ₂ O ₂ sur le végétal | 69 |
| 3.9 | Effets de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse <i>in vitro</i> de <i>T. baccata</i> | 70 |
| 3.10 | Évolution de la croissance de <i>T. baccata</i> en fonction de l'ajout de différentes hormones de croissance au milieu WPM 1/2 | 71 |
| 3.11 | Radicelle de <i>T. x media</i> var. <i>Hicksii</i> | 72 |
| 3.12 | Brunissement de <i>T. x media</i> var. <i>Hicksii</i> | 73 |
| 4.1 | Broyage des parties de plantes | 75 |
| 4.2 | Échantillon étalon paclitaxel | 78 |
| 4.3 | Échantillon étalon de 10-déacétylbaccatine III | 79 |
| 4.4 | Échantillon d'aiguilles | 80 |
| 4.5 | Échantillon de tiges | 81 |
| 4.6 | Échantillon d'écorces | 82 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Classification classique du genre <i>Taxus</i> (ITIS) | 10 |
| 1.2 | Classification phylogénétique du genre <i>Taxus</i> (NCBI) | 10 |
| 1.3 | Classification phylogénétique du genre <i>Taxus</i> [19, 60] | 11 |
| 1.4 | Les espèces du genre <i>Taxus</i> [39, 24, 49] | 11 |
| 1.5 | Propriétés physiques et chimiques des taxines [76] | 28 |
| 1.6 | Dose mortelle d'aiguilles d'if chez l'être humain de 80 kg [74] | 29 |
| 2.1 | Chronologie de la découverte et du développement du Taxol (par M. Wall) [39] 1/2 | 35 |
| 2.2 | Chronologie de la découverte et du développement du Taxol (par M. Wall) [39] 2/2 | 36 |
| 2.3 | Caractéristiques du paclitaxel et du docétaxel | 36 |
| 3.1 | Composition du Woody Plant Medium (=milieu WPM) | 59 |
| 3.2 | Préparation des solutions | 60 |
| 3.3 | Composition des erlenmeyers 1 et 2 pour la préparation d'un litre de milieu WPM 1/2 | 60 |
| 3.4 | Suivi des cultures <i>in vitro</i> de <i>T. baccata</i> | 64 |
| 4.1 | Teneur de <i>T. baccata</i> en paclitaxel et en 10-déacétylbaccatine III (en % massique du poids sec) | 77 |

Introduction

L’if est un arbre ou un arbuste extrêmement présent dans nos régions. Nombreux sont ceux qui savent l’identifier et très nombreux sont ceux qui, sans le savoir, le connaissent visuellement pour l’avoir croisé si souvent dans les parcs et jardins.

Et pourtant, l’if reste, en lui même, très méconnu. Comme chacun le sait l’if est extrêmement toxique mais que savez vous précisément de cette toxicité ? Savez vous qu’il fait partie du genre *Taxus* dont les caractéristiques botaniques le place comme un genre à part ? Savez vous qu’il est à l’origine du développement de deux médicaments anticancéreux efficaces : le Taxol® et le Taxotère® ? Et que savez vous précisément de ces deux spécialités pharmaceutiques ? Comment ont-elles été découvertes, par qui et en quelle année ? Quels en sont leurs principes actifs et quel est leur mécanisme d’action ?

Tous ces points sont abordés dans une première partie qui rassemble les informations bibliographiques disponibles sur le genre *Taxus* et son intérêt pharmaceutique. La seconde partie est consacrée à la description de travaux expérimentaux portant sur la culture *in vitro* du genre *Taxus* ainsi qu’à l’extraction et au dosage des taxanes à partir de parties de plantes de *Taxus baccata*. Ces travaux ont été réalisés d’avril à juin 2007 dans le Laboratoire de Botanique et Mycologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy sous la direction du Professeur Max HENRY. Les parties et chapitres ont été pensés de façon à pouvoir être lus indépendamment les uns des autres.

Cette thèse n’a pas pour but de présenter un inventaire de connaissance mais rassemble toutes les informations jugées nécessaires à la compréhension des points abordés. Ainsi le paragraphe décrivant le mécanisme d’action pharmacologique des taxanes est précédé de quelques notions de biologie cellulaire. Le lecteur trouvera notamment un *index* ainsi qu’un *glossaire* afin que la navigation dans ce document soit aisée. Les termes dont la définition est présente dans le glossaire apparaissent en général clairement en *emphase* (c’est à dire en italique).

J’ai choisi de rédiger cette thèse à l’aide du programme libre et gratuit qu’est L^AT_EX. Des renseignements concernant ce programme efficace et peu répandu sont disponibles dans l’annexe C. Toutes les photographies ont été réalisées par l’auteur.

Toutes remarques peuvent être envoyées à pierre.vallata@gmail.com.

Première partie

Revue générale de la littérature
sur le sujet traité

Chapitre 1

Le genre *Taxus*

1.1 Classification

Le genre *Taxus* appartient à la famille des Taxacées qui constitue un petit groupe des gymnospermes. En effet les Taxacées regroupent moins de 2% des espèces des gymnospermes. La classification du genre *Taxus* et de la famille des Taxacées a largement évolué au cours du temps et connaît encore aujourd’hui des variations. En effet, selon l’interprétation de la classification, la famille des Taxacées comporte 7 à 30 espèces réparties dans 3 à 6 genres. Il existe deux types de classification :

- La classification classique basée sur les caractères morphologiques du végétal.
- La classification phylogénétique basée sur l’examen de marqueurs génétiques du végétal afin de recréer une phylogénie.

La classification classique a évolué au cours du temps et est aujourd’hui stable. La classification phylogénétique, quant à elle, continue d’évoluer avec les études réalisées sur le sujet.

1.1.1 Classification classique

Dans la classification classique les ifs qui sont des gymnospermes ne sont pas considérés comme des conifères car ils ne sont pas résineux et leurs fruits ne sont pas des cônes. En effet la famille des Taxacées est placée dans l’ordre des *Taxales* et non dans l’ordre des *Pinales*. L’ordre des *Taxales* ne compte que la famille des *Taxaceae*. Le tableau 1.1 présente la classification du genre *Taxus* d’après *the Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*. Nous pouvons noter dans ce tableau la présence de 4 genres en plus du genre *Taxus* dans la famille des Taxacées : les genres *Amentotaxus*, *Austrotaxus*, *Pseudotaxus* et *Torreya*. La description de ces genres n’est pas abordée dans cette thèse

1.1.2 Classification phylogénétique

Des analyses ADN ont montré que les ifs sont *monophylétiques* des autres familles de l’ordre des *Pinales* [19, 60]. De plus, les résultats de ces analyses sont renforcés par des études de micromorphologie [6]. C’est pourquoi la famille des Taxacées est incluse

Règne *Plantae*
 Sous-règne *Tracheophyta*
 Division *Pinophyta*
 Classe *Pinopsida*
 Ordre *Taxales*
 Famille *Taxaceae*
 Genre *Amentotaxus*
 Genre *Austrotaxus*
 Genre *Pseudotaxus*
 Genre *Taxus*
 Genre *Torreya*

TABLE 1.1 – Classification classique du genre *Taxus* (ITIS)

Règne *Plantae*
 Sous-règne *Tracheophyta*
 Division *Pinophyta*
 Classe *Pinopsida*
 Ordre *Pinales*
 Famille *Taxaceae*
 Genre *Amentotaxus*
 Genre *Austrotaxus*
 Genre *Pseudotaxus*
 Genre *Taxus*
 Genre *Torreya*

TABLE 1.2 – Classification phylogénétique du genre *Taxus* (NCBI)

avec tous les autres coniphères dans l'ordre des *Pinales* alors qu'elle était auparavant placée dans le groupe distinct des *Taxales*.

Des analyses ADN ont montré que les genres *Torreya* et *Amentotaxus* sont plus proches du genre *Cephalotaxus* que du genre *Taxus*. Ainsi, *Torreya* et *Amentotaxus* qui étaient auparavant inclus dans la famille *Taxaceae*, ont été replacés dans la famille *Cephalotaxaceae*. Cependant, certains assimilent le genre *Cephalotaxus* au genre *Taxus* [60], créant ainsi une famille *Taxaceae* plus large qui compte 30 espèces réparties dans 6 genres.

La classification du genre *Taxus* issue de ces études est présentée dans le tableau 1.3. La liste des espèces du genre *Taxus* est présentée dans le tableau 1.4.

Pour illustrer l'exemple des variations parmi les classifications de référence, le tableau 1.2 présente la classification phylogénétique issue du *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

Règne *Plantae*
 Sous-règne *Tracheophyta*
 Division *Pinophyta*
 Classe *Pinopsida*
 Ordre *Pinales*
 Famille *Taxaceae*
 Genre *Taxus*
 Genre *Pseudotaxus*
 Genre *Austrotaxus*
 Famille *Cephalotaxaceae*
 Genre *Cephalotaxus*
 Genre *Amentotaxus*
 Genre *Torreya*

TABLE 1.3 – Classification phylogénétique du genre *Taxus*[19, 60]

| Nom latin | Non vernaculaire |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| <i>T. baccata</i> L. | If d'Europe, if commun |
| <i>T. wallichiana</i> Zucc. | If de l'Himalaya, if du Tibet |
| <i>T. celebica</i> Li. | If des Célèbes |
| <i>T. chinensis</i> Li. | If de Chine |
| <i>T. sumatrana</i> Li. | If de Sumatra |
| <i>T. yunnanensis</i> Cheng | If de Yunnan |
| <i>T. cuspidata</i> Sieb et Zucc. | If du Japon |
| <i>T. brevifolia</i> Nutt. | If du Pacifique, if de l'Ouest |
| <i>T. globosa</i> Schldl. | If du Mexique |
| <i>T. floridana</i> Nutt. | If de Floride |
| <i>T. canadensis</i> Marsh. | If du Canada |
| <i>T. x hunnewelliana</i> Rehder | If d'Hunnewell |
| <i>T. x media</i> Rehder | If hybride, if Anglo-Japonais |

TABLE 1.4 – Les espèces du genre *Taxus* [39, 24, 49]

1.2 Description botanique

Trois descriptions botaniques de référence du genre *Taxus* sont présentées ainsi qu'une description de vulgarisation de *Taxus baccata*. Les trois descriptions de référence du genre *Taxus* sont issues de :

- La Grande Flore de Gaston Bonnier [14].
- La Flora Europaea [38].
- *The Botanical Review* [24].

1.2.1 Description botanique d'après G. Bonnier [14]

Famille 142 : *Taxineae*. Taxinées

[Synonyme : *Taxaceae*. Taxacées]

(du genre type : *Taxus*)

Les plantes de cette famille ont des fleurs de deux sortes, *sans calice, ni corolle, portées par des pieds différents*, rarement par le même pied. Les inflorescences staminées se composent de *plus ou moins nombreuses étamines attachées sur un axe* et sont nues ou entourées à la base par des écailles imbriquées. Les fleurs pistillées, munies ou dépourvues autour d'elles d'écailles imbriquées, sont constituées *par une petite coupe membraneuse, portant un seul ovule nu, droit et dressé*. La graine *non-aillée* contient une plantule droite à plusieurs cotylédons au milieu d'une matière de réserve, l'*endosperme* et se trouve entourée d'une *enveloppe à la fin charnue et simulant une baie*, qui provient du développement de la coupe membraneuse. Ce sont des arbres ou des arbustes de port très différent, à feuilles le plus souvent persistantes, de formes variables.

On a décrit environ 20 espèces de cette famille qui croissent dans les deux hémisphères, principalement dans les régions tempérées.

Genre 887 : ***Taxus***. **If** (du nom grec de la plante Ταξος (*taxos*)). - Dans ce genre, les inflorescences staminées sont globuleuses, entourées dans le bas *par de petites écailles imbriquées* et constituées *par 4 à 12 étamines polygonales, aplaties au sommet* et présentant chacune *5 à 8 sacs polliniques disposés en cercle*. Les fleurs pistillées, qui se composent d'un ovule porté par une petite coupe et *entouré de petites écailles imbriquées*, ont *l'apparence de petits bourgeons*. La graine, *à paroi dure*, est ovoïde et contenue *dans la coupe* qui l'entoure d'abord dans la partie inférieure, puis s'accroît jusqu'à être *plus longue qu'elle tout en devenant charnue*. Ce sont des arbres à ramification irrégulière, à feuilles persistantes, étroites-allongées et rapprochées en apparence *sur 2 rangs*.

On a décrit 8 espèces de ce genre qui croissent dans les régions tempérées de l'ancien et du Nouveau Continents.

3.268. *Taxus baccata* L. If à baies (pl. 699 : 3.268 (voir figure 1.1), rameau à fleurs staminées ; 3.268 bis (voir figure 1.1), rameau portant de jeunes fruits ; 3.268 ter, (voir figure 1.1) rameau avec fruit mûr).- C'est un arbuste ou un arbre qui croît dans les bois des montagnes, mais que l'on rencontre souvent planté ailleurs. Il ne

dépasse pas 12 à 15 mètres de hauteur et atteint 3 à 4 mètres de circonférence, très rarement davantage. Les fleurs, les staminées *jaunâtres*, les pistillées *verdâtres*, se montrent en avril et en mai. Les feuilles munies d'un *très court* pétiole, *assez rapprochées et en apparence disposées sur 2 rangs*, sont d'un *vert très sombre en dessus*, d'un *vert clair* sur la face inférieure, plates ou un peu enroulées en dessous par les bords, longues de 2 à 3 cm sur 2 à 3 mm de largeur, *brusquement atténuées et aigues au sommet*. Les inflorescences, qui ont l'*aspect de petits bourgeons*, se trouvent à l'aisselle des feuilles des rameaux de l'année précédente et ordinairement sur des pieds différents, parfois sur le même pied. La graine en formation est *entourée à la base*, plus ou moins longuement suivant l'état de son développement, *par une petite coupe membraneuse qui s'allonge et s'épaissit* ; et à la maturité la graine *ovoïde et dure* se trouve *au fond de cette coupe devenue charnue et d'un rouge vif*, simulant un fruit. C'est un arbuste ou un arbre rameux dès la base, à tige droite, à branches longues et étalées, à rameaux minces et pendants. L'écorce d'un gris brun rougeâtre se détache par plaques. L'if a une croissance très lente, mais sa longévité est considérable et l'on cite des exemplaires qui auraient plus de 2000 ans. Lorsque l'arbre a été abattu, la souche donne naissance à des rejets. (On a observé des anomalies de cette espèce : racines ou tiges fasciées, c'est-à-dire soudées en long ; feuilles fasciées ; fruits plus ou moins soudés).

NOMS VULGAIRES. - En français : *If*, *If-d'Europe*, *Ifreteau*. En anglais : *Yew*, *Yew-tree*, *William-Tell's-tree*, *Ground-Hemlock*. En allemand : *Eibe*, *Eibenbaum*, *Taxus*, *Taxbaum*, *Todesbaum*. En flamand : *Ijpenboom*, *Spaansch-Hout*, *Taxboom*, *Taxus*, *Doods-boom*, *Venijnboom*. En italien : *Tasso*, *Libo*, *Albero-della-morte*.

USAGE ET PROPRIÉTÉS. - Souvent planté comme arbre ornemental ; on lui donne par la taille, qu'il supporte très bien, une infinité de formes. - Le bois a l'aubier blanc, le coeur d'un rouge marron veiné de brun ; très compact et susceptible d'un beau poli, il est utilisé par les ébénistes, les sculpteurs, les tourneurs, etc. Coloré en noir il imite l'ébène. - Les jeunes rameaux, les feuilles et les graines renferment un *taxoïde*, la *taxine*, occasionnant la mort des animaux qui les broutent. - *Vénéneux*.

DISTRIBUTION. - Préfère les terrains calcaires ; s'élève jusqu'à 1800 mètres d'altitude dans les Alpes et les Pyrénées. - *France* : très rare dans les Vosges, çà et là dans le Jura et les Alpes ; Monts de la Sainte-Baume et Montagnes des Aurèles dans le département du Var ; assez rare ou rare dans les Cévennes et les Corbières ; çà et là dans les Pyrénées. - *Suisse* : çà et là, surtout dans les Alpes et le Jura. - *Belgique* : Hainaut et environs de Huy.

Europe : toute l'Europe. - *Hors d'Europe* : Nord, Centre et Ouest de l'Asie ; Nord de l'Afrique.

AFFINITÉ DES TAXINÉES AVEC LES AUTRES FAMILLES. - Les Taxinées, parfois classées avec les Abiétinées et les Cupressinées dans le groupe des Conifères, bien que leur fruit soit très différent, ont avec ces familles, de même qu'avec celle des Gnétacées, des affinités certaines. Les raisons de ce rapprochement ont déjà été exposées.

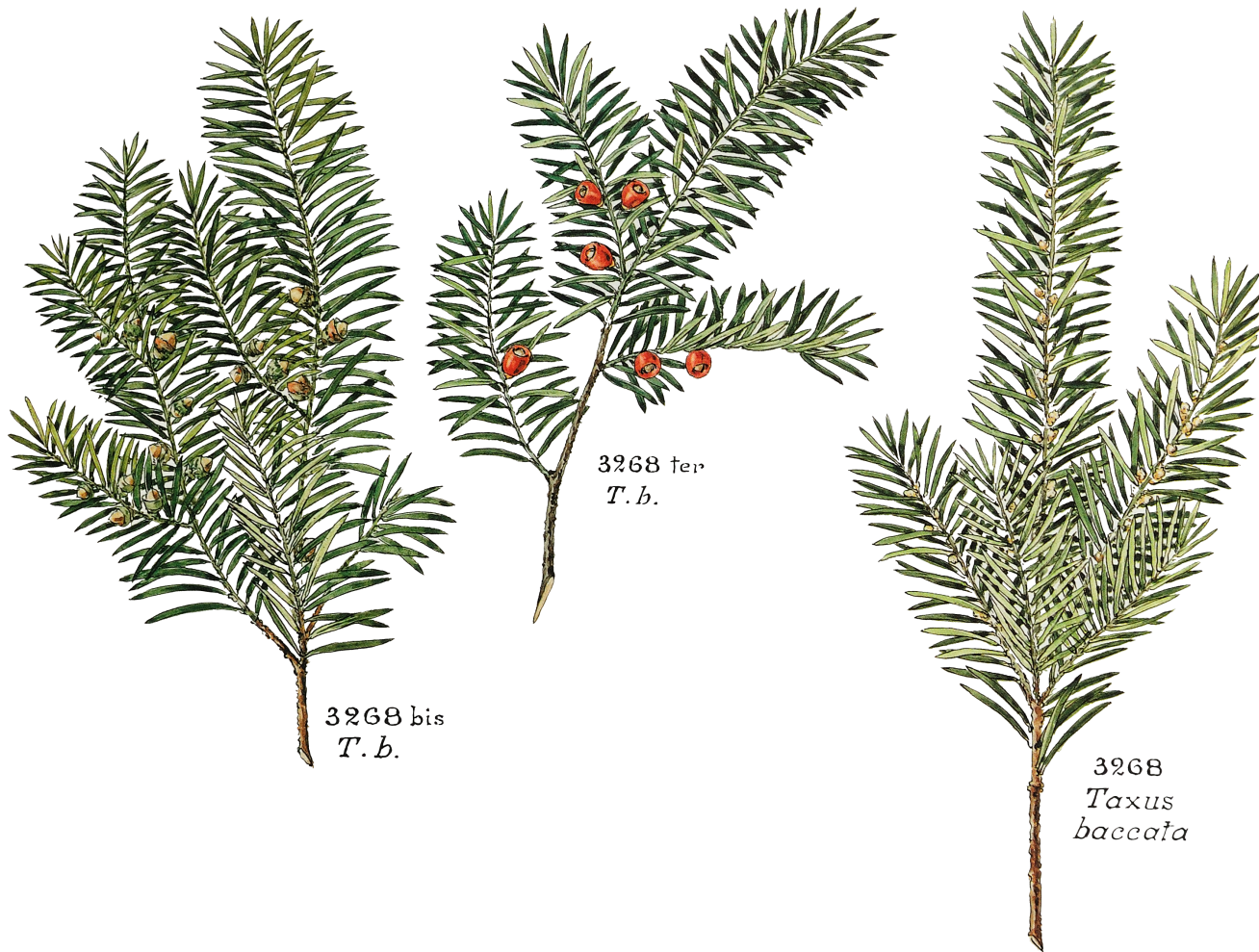


FIGURE 1.1 – *Taxus baccata*[14]

1.2.2 Description botanique d'après la *Flora Europaea* [38]***Taxales*****29. *Taxaceae***

EDIT. D. M. MOORE

Habituellement dioïque, arbre ou arbuste persistant aux feuilles linéaires, aplaties et disposées en spirale ; non résineux. Fleurs mâles axillaires, solitaires ou en petits groupes. Fleurs femelles axillaires, solitaires ou à deux, avec une ou plusieurs écailles stériles ; écaille ovulifère terminale, portant un ovule dressé et solitaire. Graines partiellement ou totalement entourées par un arille.

1. *Taxus* L.

J. DO AMARAL FRANCO

Tiges alternées non régulières. Fleurs mâles solitaires ou en petits groupes, chacune constituée par 6-14 anthères avec 4-8 sacs polliniques. Les fleurs femelles consistent en plusieurs écailles imbriquées, celle qui est la plus au dessus est fertile. Les graines sont ovoïdes, partiellement recouvertes d'un arille charnu, habituellement écarlate, qui mûrit la première année.

1. *T. baccata* L., *Sp. Pl.* 1040 (1753). Arbuste ou arbre jusqu'à 20 mètres de haut, avec un port large et pyramidal. Feuilles de 10-30mm, les marges sont recourbées, foncées, vert brillant sur le dessus, avec 2 bandes stomatales vert clair en dessous. Graines 6-7 mm. $2n=24$. *Europe, excepté l'Est et l'extrême nord, allant au nord jusqu'à la latitude de 63° Nord en Norvège et à l'Est de l'Estonie et en Crimée ; seulement dans les montagnes dans la région Méditerranéenne.*

Cultivé depuis des siècles ; les nombreux cultivars diffèrent en habitat, en caractères au niveau de la feuille et en couleur d'arille. Une clé de détermination ainsi qu'une description de ces cultivars sont données dans le *Manual of Cultivated Conifers* par G. Krüssman [49].

1.2.3 Description botanique du genre *Taxus*, Edward A. Cope, *The Botanical Review* [24]***Taxus* L., *Sp. Pl.* 1040. 1753.**

Arbre ou arbuste dioïque (excepté pour *T. canadensis* Marsh.) de 3 à 9 mètres de haut mais pouvant atteindre 25 mètres ; écorce squameuse de couleur brun-rouge, violet-brun, marron-brun ; branches disposées de façon irrégulière, dressées ou étendues sur les côtés ; rameaux minces jaune-vert ou vert olive à rouge-orange ou orange brun, les pousses de la deuxième année restent souvent vertes, du moins en partie ; les bourgeons hivernaux sont ovoïdes, coniques ou obovoïdes, 1.5-3 mm de long, l'apex est aigü ou obtus, les écailles sont imbriquées, habituellement persistantes (caduques la plupart du temps chez *T. chinensis* (Pilg.) Rehder), épaissies et légèrement à fortement carénées surtout vers l'apex.

Les feuilles sont persistantes (3-)4 ans, habituellement pectinées, coriaces, linéaires se rétrécissant brusquement au pétiole, 2-4.5 cm x 1-3 mm, acuminées à cuspidées ou presque mucronées-apiculées, vert foncé à jaune-vert sur la surface supérieure, pétiole distinct, 1-2 mm de long, s'élargissant en une large base décurren- te ; nervure médiane souvent marquée sur la surface supérieure mais parfois également sur la surface inférieure, avec ou sans papilles cuticulaires, les bandes stomatiques font chacune le double de la largeur des bords de la feuille, 0.2-1 mm de large, vert pâle ou jaune-vert, il n'y a pas de canaux sécréteurs de résine.

Les strobiles mâles sont simples, solitaires, subsessiles, le pédoncule peut faire 1 mm de long, axillaires sur les rameaux de la première année, globuleux avant leur expansion puis oblong-cylindrique, 2.5 mm de diamètre lorsqu'ils sont fermés, 4 x 2 mm lors de la libération du pollen, vert, jaune-vert ou jaune ; écailles basales stériles ; 6-14 microsporophylles, périsperange, symétrie radiale, peltés, chacun portant 4-9 microsporanges.

Les ovules sont solitaires ou parfois jumelés. Elles sont situées à l'aisselle des bractées sur des rameaux courts ou des tiges qui sont eux même axillaires sur les rameaux de première, deuxième et parfois troisième année. Les ovules sont sessiles, elles ont 12-20 écailles qui s'entrecroisent. Elles sont ovales à obovales, concaves, membraneuses, souvent rugueuses et quasiment enfermées par l'arille à maturité. Les arilles sont ouverts à l'apex, 5-10 x 5-7 mm, verts lorsqu'ils sont jeunes (ils peuvent rester de cette couleur) et devenant orange ou généralement rouge écarlate à maturité. Les graines sont dures, ovoïdes, 5-7 x 4-5 mm, le hile est légèrement déprimé, ovale, triangulaire ou carré. Nombre de chromosome, $n=12$.

Le genre *Taxus* est un genre de 12 espèces (incluant 2 espèces hybrides artificielles) réparties principalement dans l'hémisphère Nord. C'est un genre difficile à classer du fait de la variabilité et des ressemblances du nombre limité des caractères morphologiques qui sont utilisés pour distinguer les espèces.

Les différentes espèces du genre *Taxus* occupent des régions géographiques différentes du monde : quatre espèces en Amérique du Nord, une en Europe, et les autres dans le Sud-Ouest de l'Asie où, selon les interprétations taxonomiques, il y a au moins 4 espèces. La plus répandue des espèces asiatiques, *T. chinensis* (Pilg.) Rehder, est endémique de la Chine et se trouve principalement dans les provinces du centre et du sud de la Chine. En 1978, Cheng et ses collaborateurs ont accepté deux variétés, *T. chinensis* var. *chinensis*, qui a des papilles sur la nervure médiane de la surface *abaxiale* des feuilles, et *T. chinensis* var. *mairei* (Lemee & H. Lev.) W. C. Cheng & L. K. Fu, qui n'a pas de papilles.

Taxus wallichiana Zucc., principalement de l'Est de l'Himalaya et du Sud du Tibet s'étend à l'Ouest de la Chine (province de Yunnan), aux Philippines et aux Célèbes . Cheng et Fu [20] ont décrit *T. yunnanensis* de la province de Yunnan, et Li (1963, 1965) proposa *T. celebica* des Célèbes. Cependant Laubenfelds (1978) assimile *T. celebica* à *T. sumatrana* (Miq.) Laubenf., qu'il décrit comme appartenant aux lieux élevés des Philippines, des Célèbes et de Sumatra. Cette complexité de l'Asie du Sud-Est nécessite de nouvelles récoltes ainsi que des études complémentaires.

Les écailles des bourgeons ainsi que le sommet des feuilles sont les éléments utilisés pour séparer les taxons. En effets ils sont variables mais leurs différences

sont légères. La présence de papilles sur la surface inférieure des feuilles ainsi que la persistance des écailles des bourgeons sont deux autres éléments qui ont été utilisés avec un succès limité dans l'analyse des taxons de l'Asie du Sud Est [21, 44]. Des différences portant sur la largeur des bandes stomatales ainsi que sur la densité des stomates ont été remarquées parmi différentes espèces [57]. La morphologie des grains de pollen ainsi que la chimie des feuilles n'ont pas fourni de caractères de reconnaissance fiable [10, 47, 57, 77].

Le genre *Taxus* diffère du genre *Torreya* par ses feuilles alternées et son arille rouge ouvert ; il diffère du genre *Pseudotaxus* par son arille rouge, son absence d'écaille stérile parmi les microsporophylles, et son nombre plus faible d'écailles sous tendant l'ovule ; il diffère du genre *Austrotaxus* par son strobile de pollen simple ainsi que par ses feuilles plus petites ; et il diffère du genre *Amentotaxus* par ses feuilles alternées et simples et ses strobiles de pollen axillaires. Enfin il se distingue du genre *Cephalotaxus* par ses feuilles plus petites et alternées ainsi que par son arille rouge et ouvert.

L'identification des espèces cultivées du genre *Taxus* est presque impossible du fait de l'absence de l'information majeure qu'est le lieu natif de la plante. L'if est utilisé dans de nombreux cas mais il est particulièrement populaire pour être planté proche des constructions afin de constituer une haie. Une collection, maintenant ancienne de presque 50 ans, de différents cultivars issus de 7 espèces de *Taxus* est présente au *Secrest Arboretum* (Wooster, Ohio, Etats-Unis). Les cultivars les plus cultivés du genre *Taxus* incluent *T. baccata* « Fastigiata » et « Repandens » ; « Capitata », « Green Wave », « Nana », et « Thayerae » ; et *Taxus x media* « Brownii », « Densiformis », « Hatfieldii », « Henryi », « Hicksii », « Hill », « Nigra », « Sebian » et « Wardii » [23].

Espèces non cultivées

T. globosa Schldl, *Linnaea* 12 : 496. 1838.

T. sumatrana (Miq) Laubenf., *Kalikasan* 7 : 117-152. 1978.

T. wallichiana Zucc., *Abh. Math-Phys. Cl. Konigle. Bayr. Akad. Wiss. Munch.* 3 : 803. 1843.

T. yunnanensis W. C. Cheng & L. K. Fu in W. C. Cheng et al., *Acta Phytotax. Sin.* 13 : 86-87. 1975.

Espèces cultivées

Clé d'identification des espèces cultivées

1. Écailles des bourgeons caduques ; arilles 4-7 mm de long ; rare en culture .. *T. chinensis*
1. Écailles des bourgeons persistantes ; arilles > 7 mm de long.
 2. Feuilles acuminées pour la plupart ; écailles des bourgeons obtus, pas nettement carrénées *T. baccata*
 2. Feuilles cuspidées ; écailles des bourgeons aigües, nettement carrénées.
 3. Plante monoïque ; arilles globuleux ou subglobuleux, 6-8 mm de diamètre *T. canadensis*
 3. Plante dioïque ; arilles ovoïdes ou elliptiques, habituellement 13 mm de diamètre.
 4. Plante endémique de la Floride, rare en culture, feuilles souvent largement espacées sur les rameaux *T. floridana*
 4. Plante native du Nord Ouest de l'Amérique du Nord ou de l'Asie ou communes en cultures ; feuilles proches les unes des autres sur les rameaux
 5. Feuilles par rang de deux, planes et formant un V avec la partie supérieure du rameau *T. brevifolia*
 5. Feuilles réparties le long des rameaux et ne formant pas de V ; natif de l'Asie et commun en culture *T. cuspidata* et ses hybrides, *T. x hunnewelliana* et *T. x media*

***Taxus baccata* L., Sp. Pl. 1040. 1753.** Grand arbre de 12-20 mètres de hauteur ou arbuste densément ramifié ; écorce écailleuse, squameuse, rouge-brun à pourpre-brun ; rameaux entièrement verts ou entièrement bruns ou mixtes ; les pousses de première année sont toujours vertes ; bourgeons ovoïdes, presque globuleux, les écailles sont persistantes, légèrement carrénées, obtues. Feuilles dirigées un peu en avant sur le rameau, 2-3 (-4.5) cm x 3 mm, face supérieure vert foncé, la face inférieure est vert-jaune ; pétiole court, jaune-vert, apex acuminé à acuminé-cuspidé, nervure médiane proéminente sur la face supérieure. Un à deux arilles sur une pousse, 1 cm x 6 mm, rouge éclatant ; graines ellipsoïdes, 6-7 x 5 mm, vert-brun à brun.

Natif de l'Europe du Nord et du Centre et de la région Méditerranéenne (Asie Mineure, Caucase, Afrique du Nord), l'if est très cultivé en Europe, Amérique du Nord voire en Asie, Afrique du Nord et Australie. L'if a une longue histoire de culture, il a été cultivé par les druides et il est presque toujours présent autour des anciens cimetières et des églises. Historiquement, le bois de l'if était utilisé pour le mobilier et les arcs. En horticulture il continue à être utilisé pour différentes raisons mais surtout pour former des haies et des plantations aux abords des constructions.

***Taxus brevifolia* Nutt., N. Amer. Sylva 3 : 86. 1849.** Arbre de 5-25 mètres de hauteur avec des branches légèrement pendantes ; écorce écailleuse, rouge-brun foncé ; rameaux de jaune-vert à marron clair ; les bourgeons sont ovoïdes, les écailles sont persistantes mais lâches, parfois jaune-brun. Les feuilles sont espacées sur la pousse, par rangée de 2, 1.2-1.8 cm x 1-2 mm ; vert clair sur les faces supérieures et inférieures, pétiole jaune-vert, parfois plus long que dans d'autres espèces, apex cuspidé, nervure médiane proéminente sur la face supérieure. Arilles ovoïdes, 1 cm x 6-7 mm, écarlates ; graines ovoïdes, 5-6 mm de long.

Natif de l'Ouest de l'Amérique du Nord, de la Colombie Britannique à la Californie et dans le Montana. L'if du Pacifique a été introduit en culture en 1854 en Grande Bretagne. Il est planté là bas ainsi qu'en Amérique du Nord principalement dans les jardins botaniques.

***Taxus canadensis* Marshall, Arbust. Amer. 151. 1785.** Arbuste monoïque ou dioïque jusqu'à 2 mètres de hauteur, avec de nombreuses branches ascendantes, les tiges principales sont souvent couchées et enracinées; écorce écailleuse, brune; rameaux rouge-brun, les pousses de première année sont vertes; bourgeons ovoïdes ou coniques, verts, petits, les écailles sont persistantes, plus importantes en nombre que chez les autres espèces, carénées, aigües ou obtues. Les feuilles sont rassemblées à plat, formant un V le long de la tige, plus courtes vers l'extrémité des rameaux, 1-2 cm x 1-2 mm, vert clair ou vert terne sur la surface supérieure, jaune-vert sur la surface inférieure, les feuilles deviennent parfois légèrement rouges ou pourpres sous le soleil d'hiver, pétiole 0.5-1 mm de long; apex plus cuspidé qu'acuminé, nervure médiane discrètement soulevée sur la face supérieure. Arilles globuleux ou subglobuleux, 6-8 x 6 mm, oranges à écarlates; graines ovoïdes, 5 x 4 mm.

Natif de l'Est des États-Unis et du Canada, du Sud de la Virginie, de l'Ouest de Manitoba et de l'Iowa, cet if est cultivé occasionnellement en Amérique du Nord. En dehors de l'Amérique du Nord on ne le trouve que dans les jardins botaniques.

***Taxus chinensis* (Pilg.) Rehder, J. Arnold Arbor. 1 : 51. 1919.** Arbre pouvant atteindre 15 mètres de hauteur, cultivé sous forme d'un large arbuste; écorce brun-rouge à rouge-orange et parfois grise; rameaux jaune-vert à brun clair, pousses de première année vertes; bourgeons plus petits que ceux de *T. baccata*, écailles pour la plupart caduques, élargies vers la base, arrondies ou légèrement carénées. Feuilles éparses sur les pousses, certaines incurvées vers l'arrière, 1.2-3 cm x 2-3 mm, surface supérieure vert foncé, la face inférieure est gris-vert à jaune-vert, pétiole court, jaune à jaune-vert, apex brusquement aigü, aigü ou acuminé, nervure médiane discrètement relevée sur la face supérieure. Arilles globuleux à subglobuleux, 4-7 mm de diamètre, rouges ou restant parfois verts; graines ovoïdes, 4-6 x 4 mm.

Espèce endémique de Chine et de Taïwan, l'if de Chine est rarement cultivé en Amérique du Nord mais il est cultivé en Europe ainsi que dans sa région native.

***Taxus cuspidata* Siebold & Zucc., F1. Japonic. Faro. Naturales 2 : 108. 1846.** Arbre pouvant atteindre 20 mètres de haut mais surtout représenté par des arbustes de culture; écorce écailleuse, de rouge-brun à brun foncé; rameaux bruns, les pousses de première année sont jaune-vert; bourgeons oblongs à ovoïdes, les écailles sont persistantes, carénées, tendant à être aigües. Feuilles arrangées verticalement le long de la pousse formant un V irrégulier; 1.5-2.5 cm x 1.5-2.5 mm, face supérieure foncée ou vert mat, la face inférieure est jaune-vert, pétiole court, apex cuspidé, nervure médiane proéminente sur la face supérieure, mince ou invisible sur la face inférieure. Arilles globuleux, 1 cm de diamètre, rouge; graines ovoïdes, 6 x 5 mm.

Natif du Japon, de Corée et du Nord-Est de la Chine, l'if du Japon est cultivé avec succès en Amérique du Nord, Europe et Asie.

***Taxus floridana* Nutt., N. Amer. Sylva 3 : 92. 1849.** Arbre pouvant atteindre 8 mètres de hauteur ou arbuste, aux branches courtes et étalées; écorce écailleuse, brun-pourpre; rameaux rouge-brun, les pousses de première année voire celles de deuxième année sont brunes; bourgeons ovoïdes, les écailles sont persistantes, arrondies ou légèrement carénées, obtues. Les feuilles forme un V avec la pousse, 1.2-2.5 cm x 2-2.5 mm, surface supérieure vert foncé, surface inférieure vert clair, pétiole vert, court, apex cuspidée, nervure médiane foncée. Arilles 1 cm x 6 mm, rouge vif; graines ovoïdes, 5-7 x 5 mm.

L'if de Floride est une espèce en danger, endémique des falaises du long de l'*Apalachicola River* à *Gadsen* et des comtés de *Liberty* dans le Nord Ouest de la Floride. Il est très rarement cultivé.

***Taxus x hunnewelliana* Rehder (*T. cuspidata* Siebold & Zucc. x *T. canadensis* Marshall), J. Arnold Arbor., 6 : 201. 1925.** Arbustes densément ramifiés, branches ascendantes et rameaux étalés ; rameaux bruns, pousses de première année vertes ; bourgeons ovoïdes, les écailles sont persistantes, moins carénées que *T. cuspidata*, aigües. Feuilles, 1-2.5 cm x 1.5-2.5 mm, leur base est plus gonflée et elles sont plus grande dans toutes les directions que celles de *T. canadensis*, la surface supérieure est vert foncé, la surface inférieure est jaune-vert, pétiole court, apex parfois moins cuspidé que *T. cuspidata*. Arilles globuleux, 8-10 mm de diamètre, rouges, à maturation plus tardive que *T. canadensis* ; graines ovoïdes, 5-6 x 4-5 mm.

***Taxus x media* Rehder (*T. baccata* L. x *T. cuspidata* Siebold & Zucc.), J. Arnold Arbor. 4 : 107. 1923.** Arbre ou arbuste, souvent densément ramifié ; écorce rouge-brun à rouge-orange ; rameaux vert olive, souvent rouge-brun sur le dessus ; les bourgeons sont ovoïdes, les écailles sont persistantes, pas autant carénées que celles de *T. cuspidata*, obtues. Les feuilles se propagent nettement en deux rangs, 1.5-3 cm x 2-3 mm, la surface supérieure est verte, la surface inférieure est jaune-vert, pétiole court, jaune à jaune-vert, apex cuspidé ou cuspidé acuminé, nervure médiane plus proéminente que chez *T. baccata*. Arilles globuleux, 1 cm de long, rouges ; graines ovoïdes, 6 x 5 mm.

Taxus x media est un hybride des deux espèces les plus cultivées, *T. baccata* et *T. cuspidata*. Cet hybride est originaire des jardins d'Hunnewell dans le Massachusetts et est aujourd'hui plus planté en Amérique du Nord que n'importe qu'elle autre espèce. Il est également cultivé en Europe.

1.2.4 Description botanique de *Taxus baccata* : vulgarisation

L'if est un conifère (en accord avec les classifications phylogénétiques récentes que nous avons vu précédemment), il est le seul conifère sans cône ni résine. Il est de croissance lente et possède un tronc bien droit, robuste et cannelé. C'est un arbre très trapu, sa ramure est étalée et dense et la ramification est relativement basse.

L'if est un arbre de petite taille qui ne dépasse pas les 20 mètres de hauteur mais qui peut être d'une très grande circonférence : l'if commun d'Estry âgé de 1600 ans atteint 12 mètres de circonférence. La figure 1.2 présente un exemplaire de *Taxus baccata* de grande taille situé au parc de la Pépinière à Nancy(54). La figure 1.3¹ présente une illustration de *T. baccata* issue de la *Flore d'Allemagne, d'Autriche et de Suisse* par Otto Wilhelm Thomé².

1.2.5 Fleurs

T. baccata est une espèce dioïque c'est à dire qu'un pied de la plante porte soit des fleurs femelles, soit des fleurs mâles mais pas les deux en même temps.

Fleurs mâles

Les fleurs mâles, jaunes et très nombreuses, sont de minuscules chatons de forme sphérique situés sur de très petites pousses à l'aisselle des aiguilles. Les fleurs mâles portent

1. figure 1.3 : la fig. A représente un rameau mâle et ses fleurs, la fig. B représente un rameau femelle à maturité avec ses arilles. Les fig. 1 & 2 représentent la fleur mâle. La fig. 3 représente la fleur femelle. Les fig. 4 à 6 représentent l'arille à différents stades de maturité. La fig. 7 représente une coupe verticale de l'arille et de la graine. Enfin la fig. 8 représente une coupe verticale de la fleur femelle.

2. Les planches de cette flore sont disponibles en intégralité sur le site internet du département biologie de l'université d'Hambourg : <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/thome/index.html>.



FIGURE 1.2 – If situé au parc de la Pépinière à Nancy(54)

un nombre relativement grand d'étamines en forme d'écu avec 6 à 8 sacs polliniques (voir figure 1.4).

Fleurs femelles

Les fleurs femelles sont vertes, peu visibles et portées par de courts rameaux axillaires. Elles sont constituées d'un ovule terminal unique, entouré de bractées écailleuses, soutenu par une ou même plusieurs formations de feuilles. Ces fleurs femelles, une fois fécondées, produisent de fausses baies rouges de la taille d'une petite olive appelées arilles qui entourent la graine.

1.2.6 Fruits

Le fruit de l'if est un arille, mais il s'agit en fait d'un faux fruit issu du développement de l'écaille ovulifère. (voir figure 1.5), il s'agit d'une masse rouge charnue facilement identifiable. Contrairement aux idées reçues l'arille n'est pas toxique. En fait il s'agit de l'unique partie non toxique de l'arbre. Attention cependant car cette non toxicité se limite rigoureusement à l'arille (c'est à dire à la pulpe rouge) : les graines, elles, sont toxiques.

La pulpe très mucilagineuse des arilles est sucrée. Elle attire de nombreux oiseaux qui en sont friands et qui avalent indifféremment arille et graine. Les oiseaux ne souffrent pas de la toxicité de la graine car elle reste intacte dans leur voies digestives. La présence des graines intactes dans les déjections aviaires permet la dissémination de l'espèce.



FIGURE 1.3 – *Taxus baccata* [69]



FIGURE 1.4 – Fleurs mâles de l'if commun



FIGURE 1.5 – L'arille de *T. baccata*

1.3 Toxicité de l'if

Toutes les espèces du genre *Taxus* sont toxiques. La toxicité de l'if est décrite dès le 2^e siècle avant JC [15]. Jules César (102-44 avant JC) a rapporté dans *De Bello Gallico* que Catuvolcus, rois des Éburons (les Belges), s'est lui même donné la mort en buvant du « jus » d'if [30, 17]. Homère [43] et Virgil [72] mentionnent la toxicité de l'if ainsi que Shakespeare [62] et plus récemment Agatha Christie [22]. Les celtes réalisaient des suicides rituels en buvant de l'extrait des feuillages d'if et ils utilisaient la sève pour fabriquer des flèches empoisonnées durant les campagnes de Jules César en Gaule [29]. Certaines civilisations primitives utilisaient même l'extrait d'if comme poison pour la chasse [74]. Durant le 18^e et le 19^e siècle on utilisait en Europe et en Inde des *décoctions* d'aiguilles d'if comme *emménagogue* et comme abortif [15, 36].

Les ifs qui étaient largement répandus dans les cimetières ont entraîné la mort de nombreux chevaux d'attelage de corbillard. L'if d'Estry se trouve d'ailleurs au milieu d'un cimetière. Il en va de même pour le plus vieil if de France : l'if de Lande-Patry (Normandie). Dans l'herbier de *Pierre Bulliard*, l'if commun figure parmi les plantes vénéneuses de France (voir figure 1.6³). Aujourd'hui, on rapporte encore de nombreux cas d'intoxications de jeunes enfants ainsi que des cas de suicides des suites d'ingestion de parties de la plante.

À Nancy un cas d'intoxication à l'if est malheureusement célèbre. Le vendredi 21 avril 2000 un individu a jeté des branches d'if dans l'enclos des ours bruns du petit zoo gratuit du parc de la pépinière [1]. L'if est abondant dans les parcs et jardins et ne fait pas défaut au parc de la Pépinière où on le trouve en profusion (voir figure 1.2). Il en a résulté le décès de deux des quatre ours du zoo : Mona, 27 ans, et Stanislas, 17 ans. Les deux autres ours bruns, Oscar et Kora, la mère de Stanislas, ont échappé à l'empoisonnement et les services vétérinaires de la ville ont dû leur prescrire des antidépresseurs, à cause de la mort de leurs congénères. Les deux ours malheureusement empoisonnés ont été naturalisés huit ans après leur disparition [70]. Et c'est en septembre 2008 qu'ils ont rejoint le Muséum-Aquarium de Nancy. Le Muséum-Aquarium de Nancy est visité par toutes les écoles primaires de Nancy et nul doute que les deux ours y sont célèbres. Peut-être marqueront-ils les esprits qui resteront sensibilisés à la dangerosité de l'if.

La toxicité de l'if est due à plusieurs taxoïdes appelés taxines qui sont les taxoïdes les plus présents dans l'if. Les taxines sont présentes dans toutes les parties de la plante à l'exception de l'arille [15]. Aujourd'hui plusieurs taxoïdes appartenant aux taxines ont été identifiées dont la taxine B qui est le taxoïde présent en plus grande quantité dans le végétal. La teneur en substance toxique reste constante dans le matériel végétal qu'il soit frais ou sec [4] et cela tout au long de l'année avec un maximum de concentration en hiver [74]. *T. baccata* et *T. cuspidata* sont les deux espèces de *Taxus* dans lesquelles les concentrations en taxines sont les plus importantes. La très grande majorité des cas d'empoisonnement par l'if

3. figure 1.6 : L'If n'est point originaire de nos contrées, mais il y est très commun. On le cultive comme arbre d'agrément, on lui donne toutes sortes de formes. Son bois est dur coloré et veiné, ses fleurs sont mâles sur un individu et femelles sur un autre, elles paraissent en mars. Ses fruits ne sont mûrs qu'en automne, les fleurs mâles sont composées d'un bouton écaillé d'où s'élèvent neuf à dix étamines réunies en un corps par leurs filets, les fleurs femelles sont composées de trois à quatre feuilles écaillées qui renferment un ovaire oblong surmonté d'un stygmate obtus. Chaque fleur femelle rapporte pour fruit une baie monosperme creusée en grelot sur le devant. *N.B.* La fig. A représente une branche d'If vue en dessus. La fig. B en représente une partie vue en dessous. La fig. C est celle d'une fleur mâle dessinée à la loupe, la fig. D celle d'un fruit naissant. Les figures E & F représentent deux baies à l'état de maturité. La fig. G est celle de la semence coupée verticalement. Ses baies sont mucilagineuses, sucrées, l'amande en est amère. Tout nous porte à croire que l'if est un poison pour l'homme ; cependant je vois beaucoup de gens en manger les fruits sans en ressentir la moindre incommodité ; ce qu'il y a de certain c'est qu'il tue les chevaux, les boeufs, les ânes qui pressés par la faim en broutent les jeunes tiges.

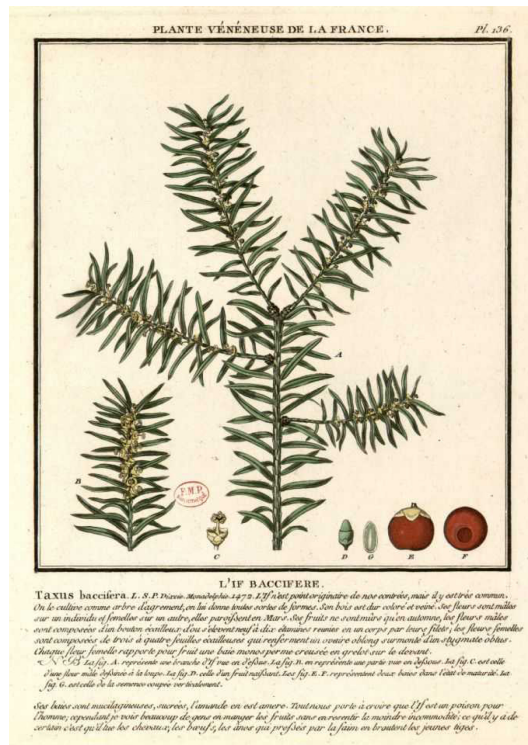


FIGURE 1.6 – L'if commun, une plante vénénéuse [16]

concerne le bétail et reste accidentelle.

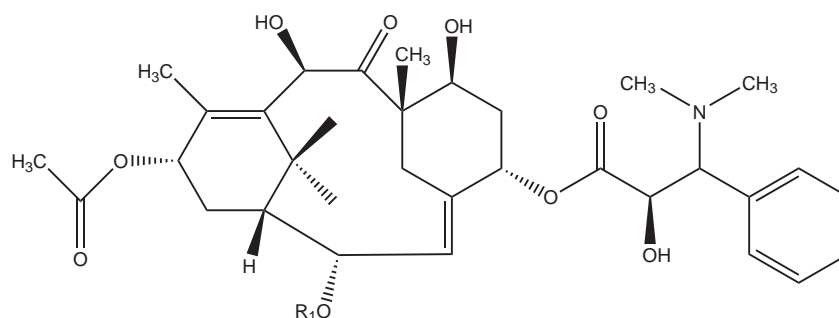
1.3.1 Taxines [76, 8]

Le genre *Taxus* est extrêmement étudié du fait qu'il contient une substance anticancéreuse isolée en 1971, le paclitaxel. Les nombreuses études menées conduisent à l'isolement de centaines de nouveaux métabolites [7]. Cependant, peu d'attention a été consacrée à la taxine (ou aux taxines) qui est le plus ancien et le plus notable des composés de l'if à avoir été mis en évidence. Le terme taxine est un nom collectif qui fait référence à un mélange de composés diterpéniques extraits de l'if. Nous verrons que lors des premières recherches la taxine était considérée comme un composé pur avant de découvrir qu'il s'agit en fait d'un mélange de plusieurs composés diterpéniques. De ce fait, *la taxine* passe au pluriel sous le terme *les taxines* dans le langage scientifique.

Les taxoïdes du type du paclitaxel dans lesquels l'azote amino-acide fait partie d'un groupement amide n'ont pas de propriétés basique. Par cette propriété ils se démarquent des composés appartenant aux taxines. Ainsi, les taxines sont à différencier des taxanes [8].

Premières découvertes

Les premières recherches ont été menées en 1828 par Piero Peretti, Professeur à l'université de Rome. Il réalise une analyse chimique sur des feuilles d'if. Peretti découvre que les feuilles contiennent une huile volatile, de l'acide oxalique et des résines. Ces résultats ont été rapportés par Lucas, pharmacien à Arnstadt en Thuringe, en 1856 [52], la méthodologie de Peretti n'est pas décrite.



| | |
|--------------------|----|
| Taxines | R1 |
| Taxine A | Ac |
| 2-Deacetyltaxine A | H |

FIGURE 1.7 – Structure des taxines A [76]

En 1856, Lucas est le premier à réaliser une analyse phytochimique du feuillage d'if afin d'y découvrir des taxoïdes. Il récupère une poudre blanche non cristalline qu'il appelle « taxines ». Vingt ans plus tard, Marmé, un scientifique français, est le premier à isoler une forme cristalline de la taxine en utilisant une méthode d'extraction similaire à celle de Lucas.

En 1890 Hilger & Brande donnent une formule basique de la taxine basée sur des analyses de combustion. Ils réalisent des sels de taxines et la composition en pourcentage de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène de ces sels est déterminée. À partir de ces informations ils proposent une formule brute de la taxine : $C_{37}H_{52}NO_{10}$.

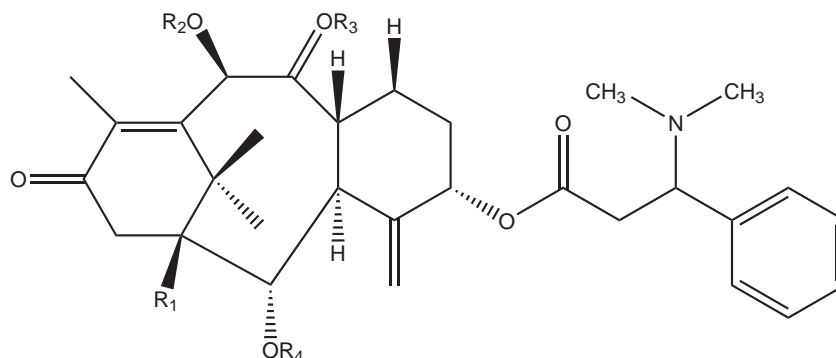
En 1921, Winterstein et ses collègues étudient les produits de dégradation de la taxine afin d'en déduire la structure [31]. En utilisant l'hydrolyse acide, ils récupèrent un produit de dégradation cristallin qu'ils identifient comme l'acide β -diméthylamino- β -phénylpropanoïque. À partir de ces résultats, ils suggèrent que la taxine est un taxoïde contenant des esters de ce composé. Cependant de nombreux chercheurs ont mis en doute ce résultat du fait de l'homogénéité discutable de l'extrait de départ. En effet le point de fusion de l'acide de Winterstein varie de 82°C à 124°C et son pouvoir rotatoire de +35° à +96°.

En 1956 Graf et Boeddeker ont découvert que la taxine était en fait un mélange de différents composés hétérogènes. La première preuve de cette hétérogénéité vient de l'analyse et de l'isolement de l'acide β -diméthylamino- β -phénylpropanoïque de Winterstein. Le clivage de ce composé donne de l'acide hydrocinnamique (caractérisé par spectrophotométrie) et du diméthylamine (caractérisé par hydrolyse alcaline). Des analyses supplémentaires par spectrophotométrie, chromatographie et par infrarouge ont permis à Graf de déterminer deux taxoïdes majoritaires : la taxine A (voir figure 1.7) et la taxine B [31] (voir figure 1.8).

Taxines A

En 1982 Engelbert Graf et ses collaborateurs découvrent la structure de la taxine A par RMN ainsi que par diffraction aux rayons X [33].

En 1994 Christiane Poupat, Alain Ahond et Pierre Potier isolent à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S un analogue de la taxine A, la 2-deacetyltaxine A (voir figure 1.7) ($C_{33}H_{45}NO_9$), à partir des aiguilles de *T. baccata*. La structure du 2-deacetyltaxine A a été découverte à l'aide de la RMN couplée à la spectrométrie de masse.



| Taxines | R1 | R2 | R3 | R4 |
|--------------------|----|----|----|----|
| Taxine B | OH | Ac | H | H |
| Isotaxine B | OH | H | Ac | H |
| 1-Deoxytaxine B | H | Ac | H | H |
| 1-Deoxyisotaxine B | H | H | Ac | H |

FIGURE 1.8 – Structure des taxines B [76]

Taxines B

Comme nous l'avons dit précédemment, l'analyse de la taxine sous forme amorphe par électrophorèse fait apparaître deux bandes majoritaires. La bande migrant le plus lentement des deux, la taxine B, représente approximativement 30% de la fraction totale des taxoïdes extraits de *T. baccata* [31, 32]. En 1986 Graf utilise la RMN pour déterminer la structure de la taxine B [34]. Cependant, en 1991, Ettouati et ses collègues ont révisé la formule de Graf au moyen d'analyses par RMN hétéronucléaire [27].

Des analyses RMN de fractions de différentes espèces de *Taxus* révèlent la présence de différentes taxines apparentées à la taxine B. L'isotaxine B ($C_{33}H_{45}NO_8$) qui est un isomère de structure de la taxine B est un constituant majeur de la fraction de taxoïde [59, 46, 58, 2]. Des composés présents en faibles quantités dans la fraction sont la 1-deoxytaxine B et la 1-deoxyisotaxine B (voir figure 1.8) [46, 58].

La taxine B, l'isotaxine B, la 1-deoxytaxine B, et la 1-deoxyisotaxine B sont facilement séparables par CLHP [46, 58]. On trouve également dans la fraction totale des taxoïdes des dérivés de la taxine B à hauteur de 2% [8].

1.3.2 Pharmacologie

Premières découvertes

Les études pharmacologiques indiquent que les taxines agissent sur le système cardiovasculaire. En 1921, Wintertsein et Iatrides injectent des doses mortelles de taxines (0.004-0.009 g/kg) à des lapins et à des chiens [15]. Ces injections ont déclenché une hypotension suivie d'un arrêt cardiaque.

Bryan-Brown a dirigé les premières recherches pharmacologiques sur les taxines en 1932 en réalisant des électrocardiogrammes sur des coeurs de lapins et de grenouilles. Ces analyses ont révélé que la taxine induit une bradycardie conduisant à l'arrêt cardiaque diastolique. Des recherches complémentaires ont montré que les taxines dépriment la conduction auriculo-ventriculaire [65, 68].

| Taxines | Formule Chimique | Point de fusion (°C) | Pouvoir rotatoire | UV max (nm) | IR max (cm ⁻¹) |
|--------------------|--|----------------------|--------------------------------|-------------|----------------------------|
| Taxine A | C ₃₅ H ₄₇ NO ₁₀ | 204-206 | $[\alpha]_D^{20} = -140^\circ$ | 220, 255 | 1780, 1250 |
| 2-Deacetyltaxine A | C ₃₃ H ₄₅ NO ₉ | - | $[\alpha]_D^{20} = -106^\circ$ | 224, 264 | 1734, 1691 |
| Taxine B | C ₃₃ H ₄₅ NO ₈ | 115 | $[\alpha]_D^{25} = +116^\circ$ | 210, 277 | 3578, 1730 |
| Isotaxine B | C ₃₃ H ₄₅ NO ₈ | - | - | 282 | - |

TABLE 1.5 – Propriétés physiques et chimiques des taxines [76]

| DM _{min} (g d'aiguilles d'if) | DM _{min} (g d'aiguilles d'if/kg) | DM _{min} estimée de taxines (mg/kg) |
|---|---|--|
| 50-100 | 0.6-1.3 | 3.0-6.5 |

TABLE 1.6 – Dose mortelle d'aiguilles d'if chez l'être humain de 80 kg [74]

Effets Cardio-vasculaires des taxines A et B

Les taxines A et B ont des effets cardiotoxiques différents [5, 9]. Des expérimentations montrent que la taxine B a un effet cardiotoxique supérieur à la taxine A [5, 9]. La taxine B induit un allongement de la période QRS et un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire.

La taxine A, quant à elle, n'induit pas de trouble de la conduction auriculo-ventriculaire ni d'allongement de la période QRS même aux plus hautes doses utilisées lors des expériences. La taxine A ne provoque qu'une baisse modérée du rythme cardiaque [5].

Mécanisme d'action

Les recherches menées sur le mécanisme d'action des taxines ont été réalisées à partir d'extraits bruts de taxines à partir de l'if et non à partir des taxines A et B purifiées. Cependant, comme la taxine B est présente en tant que toxoïde majeur il est considéré que les effets des taxines relevés dans les analyses sont causés par la taxine B.

De récentes études ont montré que les taxines sont des antagonistes des canaux Ca^{2+} et Na^+ [68, 67]. Les taxines ont donc un mécanisme d'action identique à certaines molécules d'intérêt pharmaceutique antiarythmique. Tekol et Göğüsten ont d'ailleurs comparé les effets des taxines à ceux du *vérapamil* [67] et ont conclu que les taxines sont moins puissantes que le *vérapamil* mais plus *cardiosélectives* des canaux Ca^{2+} . Les taxines ont donc un intérêt potentiel dans le traitement des troubles cardiaques. Cependant, elles ne sont que peu étudiées et il n'existe actuellement aucune spécialité pharmaceutique qui en dérive.

1.3.3 Symptômes, diagnostic et traitement

Symptômes

Les signes cliniques varient selon le degré d'intoxication. Si l'individu intoxiqué n'est pas trouvé mort, les signes cliniques comprennent : *ataxie*, *dyspnée*, *bradycardie*, tremblement musculaire, convulsion, évanouissement et arrêt cardiaque entraînant la mort [64, 13].

Diagnostic

La recherche d'un historique d'exposition à l'if et l'identification du végétal dans le système digestif du malade sont les éléments de diagnostics

Traitement

Il n'existe pas d'antidote aux taxines. Seul un traitement symptomatique est envisagé. Dans le cas de l'empoisonnement délibéré d'un humain par ingestion les traitements symptomatiques n'assurent pas toujours la survie de l'individu [30].

Chapitre 2

Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

Le genre *Taxus* est à l'origine de la découverte de deux médicaments anticancéreux : le Taxol® (paclitaxel) et le Taxotère® (docétaxel). Ces agents anticancéreux forment, à eux deux, la classe pharmaceutique des taxanes. Dans ce chapitre nous rappelons tout d'abord les étapes de recherche et de développement d'un médicament afin de retracer les étapes de la découverte des taxanes. Nous nous intéressons par la suite à la structure des taxanes, à leur moyens d'obtention ainsi qu'à leurs propriétés pharmacologiques. Afin d'introduire le mécanisme d'action des taxanes un rappel sur la mitose cellulaire est réalisé.

2.1 Stratégie de recherche et développement d'un médicament

2.1.1 Phase initiale de recherche

Le point de départ dans la découverte d'un nouveau médicament commence, bien sûr, par une phase de recherche. Dans un premier temps, l'effort est porté sur l'obtention de nouvelles molécules.

Pour obtenir ces molécules il y a plusieurs solutions : la synthèse organique, les biotechnologies ou encore l'extraction de molécules naturelles (comme cela a été le cas pour le paclitaxel).

L'étape suivante est de faire passer une batterie de tests systématiques aux molécules obtenues afin d'étudier leurs propriétés chimiques et pharmacologiques. Cette étape permet de repérer celles qui pourraient avoir un intérêt thérapeutique. Toutes les molécules subissent les tests initiaux, pour effectuer un premier tri. Celles qui répondent aux critères recherchés sont étudiées par une seconde série de tests, plus poussés et ainsi de suite jusqu'à ce que soit sélectionnés les substances dont les propriétés pharmacologiques paraissent suffisamment intéressantes : c'est le *screening*.

Une fois le *screening* effectué, l'étude toxicologique des molécules retenues est réalisée. Si les molécules répondent aux critères toxicologiques la phase de développement du médicament commence.

2.1.2 Première phase du développement : la formulation

La première étape du développement consiste en la formulation du médicament. En effet, afin que le médicament puisse être administré il est nécessaire de déterminer une forme d'administration convenable du médicament. Cette étape présentera des difficultés pour le paclitaxel qui est une molécule très peu soluble dans l'eau. Une fois la formulation du médicament effectuée les études cliniques commencent.

2.1.3 Les études cliniques

La phase I

Les études de phase I ont souvent pour but de tester *la sécurité d'emploi* des thérapeutiques.

Tolérance et toxicité Ce sont les études les plus précocement réalisées au cours du développement d'un projet de recherche concernant un nouveau produit. Elles sont habituellement conduites chez le volontaire sain.

- Un des objectifs est d'établir *les doses tolérables* en prise unique ou répétée.
- Il peut également s'agir de déterminer le rapport entre la dose efficace et la dose maximale tolérable.

Un certain nombre de molécules nouvelles ne dépassent jamais ce cap de la phase I, soit du fait d'une toxicité trop importante ou d'une activité insuffisante chez l'homme, soit parce que les doses efficaces et toxiques trop proches pour autoriser une utilisation sûre du produit.

Pharmacocinétique Des études de phase I ont pour but de préciser *la pharmacocinétique d'une molécule, sa pharmacodynamique et/ou son activité biologique*. Dans certains cas ces études peuvent être conduites chez des patients atteints d'affections sévères (cancers) ou ayant une pathologie spécifique (interférence thérapeutique, association pathologique) non retrouvées et ne pouvant être reproduites chez le sujet sain.

La phase II

Les essais de phase II ont pour objectif de préciser *l'efficacité (et la sécurité) du produit dans des conditions précises*. Ils sont habituellement conduits sur des populations limitées, homogènes, sélectionnées et de taille réduite.

La phase IIa C'est celle des études pilotes ciblées sur *l'efficacité en terme d'effet dose-réponse* du produit. Elles comparent l'intérêt des prises uniques ou multiples, sur des sous-groupes précis de population.

La phase IIb Elle est constituée d'essais contrôlés rigoureux visant à évaluer *l'efficacité (et la sécurité) du traitement*. Certains traitements seront retirés à l'issue de cette phase.

La phase III

La phase III comporte des *essais conduits sur des populations plus larges*, représentatives de la population à laquelle est destinée la thérapeutique. Elle ne débute habituellement que lorsque la certitude de l'efficacité thérapeutique (et d'une certaine innocuité) du traitement est acquise.

La phase IIIa Elle comporte les études réalisées *avant la soumission du dossier administratif d'agrément de la thérapeutique* (autorisation de mise sur le marché ou AMM en France). La population ciblée est généralement celle qui recevra le traitement dans la pratique courante. Des données complémentaires d'efficacité et de sécurité d'emploi sont recueillies à cette occasion sur de grandes populations. La plupart des informations nécessaires à l'utilisation ultérieure du produit sont alors collectées. Parfois des sous-groupes particuliers sont étudiés (insuffisances rénale, hépatique, cardiaque...), ainsi que des situations spécifiques dépendantes du malade (enfant, vieillard) ou de formes cliniques de la maladie.

La phase IIIb Elle débute après la soumission du dossier d'autorisation, avant son approbation et la reconnaissance de la thérapeutique par les autorités médicales et administratives. Les études réalisées au cours de cette phase *complètent les informations* issues des précédentes, et parfois s'intéressent à des *objectifs secondaires* (qualité de vie, coût-efficacité...). Il est assez rare que des thérapeutiques soient retirées à ce moment.

La phase IV

Elle débute *après la mise sur le marché de la thérapeutique*. Les études effectuées durant cette phase ont principalement pour but de compléter les informations concernant la sécurité d'emploi du traitement : avec deux objectifs : pharmacovigilance et modalités de prescription.

Pharmacovigilance Lorsque le produit est utilisé grandeur nature dans la population cible réelle, l'importance quantitative et qualitative des effets indésirables peut être réellement appréciée. Même si les études préalables ont permis d'éviter de commercialiser certains produits mal tolérés, d'autres thérapeutiques seront retirées secondairement du fait de la découverte d'un effet secondaire rare mais grave ou d'une interaction avec d'autres traitements. Il s'agit d'une situation difficile puisqu'ignorée du médecin et de son malade. L'essai de phase IV est une indéniable sécurité puisque la survenue d'éventuels incidents ou accidents dus aux thérapeutiques entraînera une enquête, des recoupements d'informations et, à terme, des décisions. Comparativement, le même phénomène survenant en dehors de tout essai risque d'être incorrectement interprété, voire de passer inaperçu.

Modalités de prescription Certaines études conduites dans cette phase auront pour objectif d'explorer *des dosages, des durées, des formes ou des fréquences d'administration* différents. La recherche *d'interactions thérapeutiques* pourra également constituer l'objectif principal d'une étude de phase IV. En revanche il est habituel d'exclure de ce cadre les études destinées à analyser une extension d'activité ou une indication secondaire du traitement. Ces études sont plus volontiers classées en phase II. Il est essentiel de distinguer les études précédentes, qui, bien conduites, sont totalement justifiables, de celles dont la visée est surtout « marketing ». L'objectif de ces études est la connaissance du produit par les prescripteurs, ce qui permet de mieux le vendre. C'est certes un objectif louable pour le promoteur mais non médical. Malheureusement, il n'est pas toujours aisé de distinguer une étude dont l'intérêt est scientifique d'une autre dont l'intérêt pécunier peut être masqué.

2.2 Découverte et développement du Paclitaxel

2.2.1 Première découverte et étude du Taxol

Les premiers échantillons d'écorce de *T. brevifolia* (if du Pacifique) ont été récoltés par l'*United States Department of Agriculture (USDA)* en 1962 dans le cadre d'un programme de

recherche du *Chemotherapy National Service Center (CCNSC)* du *National Cancer Institute (NCI)*.

On a confirmé que l'extrait de cette écorce était cytotoxique sur les *cellules KB* en 1964. Une nouvelle collecte a été menée en 1965 afin de fournir du matériel végétal au *Docteur Monroe Wall* de l'institut de recherche *RTI International*.

Le Taxol fut isolé comme le composé actif de l'extrait d'écorce en 1969 et le rapport de son isolement et de sa découverte structurale a été publié en 1971 [73]. Des analyses de la cytotoxicité des différentes parties de la plante ont été menées sur les cellules KB en 1969. Ces analyses ont montré que l'extrait d'écorce était nettement plus actif que les extraits des autres parties de la plante bien que les extraits d'aiguilles et de racines aient des activités conséquentes. Le bois est, quant à lui, dénué d'activité cytotoxique. Comme beaucoup d'agents anticancéreux le Taxol montrait une activité cytotoxique *in vivo* modérée sur les modèles de leucémies murines P388 et L1210. Mais c'est l'observation de la forte activité du Taxol sur le mélanome B16 en 1975 qui a réellement fait naître l'intérêt autour du Taxol.

En 1977, le Taxol a été accepté comme candidat pour la phase de développement préclinique. C'est alors que le Taxol a montré son activité sur plusieurs greffes exogènes tumorales et notamment sur la tumeur mammaire MX-1.

L'intérêt porté au Taxol s'est encore intensifié en 1979 quand Horwitz a démontré le mécanisme d'action cytotoxique du Taxol. En effet le Taxol a un effet de promoteur de la polymérisation des tubulines et de stabilisation des microtubules contre la dépolymérisation [53]. Les agents anticancéreux de ce type sont aujourd'hui communément appelés *stabilisateurs du fuseau*. Le mécanisme d'action du Taxol est détaillé en 2.6.

La formulation du médicament est terminée en 1980 et c'est alors que les tests toxicologiques commencent. Une fois les études précliniques achevées le Taxol a l'autorisation de passer en essai de phase I en 1983.

2.2.2 Développement et mise sur le marché du Taxol

Dans le cas du Taxol les premiers essais cliniques ont été marqués par de sérieux problèmes de toxicité. Ces problèmes de toxicité étaient en particulier des réactions allergiques dont l'anaphylaxie. Ces problèmes ont failli mettre un terme aux études cliniques du Taxol et donc à son développement.

La toxicité du médicament n'est pas liée au Taxol à proprement parler mais à sa formulation en tant que médicament. En effet le Taxol est très faiblement soluble dans les phases aqueuses et il nécessite une forte dose thérapeutique comparativement aux autres anticancéreux comme les alcaloïdes extraits de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). La mise au point d'une formulation pour administrer le Taxol a donc été très difficile car il était indispensable de solubiliser le Taxol dans une phase organique. Finalement les recherches ont mis au point une formulation à base de *Cremophor® EL* (qui est toxique et allergisant) et d'éthanol. Aujourd'hui encore les scientifiques recherchent des formulations optimisées du Taxol® [78].

Durant les essais de phase II, on a découvert un effet anticancéreux important du Taxol sur le cancer des ovaires. Ainsi, l'intérêt porté au Taxol s'est encore intensifié. En plus de l'action du Taxol sur le cancer des ovaires une publication de Holmes et ses collaborateurs [40] a montré que le Taxol avait une activité chez les patientes atteintes d'un cancer du sein avec métastases [61, 28]. D'autres publications sont venues confirmer ces résultats.

Enfin des réponses au Taxol ont été observées chez des patients atteints par d'autres formes avancées de cancer dont : le cancer des poumons [18], les cancers des régions de la tête et du cou, les mélanomes malins [26] et les lymphômes.

En juillet 1992 le laboratoire pharmaceutique *Bristol-Myers Squibb (BMS)* dépose une

2. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

2.3. Structure des taxanes : paclitaxel et docétaxel

demande d'autorisation de mise sur le marché appelée *New Drug Application (NDA)* au États-Unis. Cette NDA est acceptée par l'agence américaine du médicament : la *Food and Drug Administration (FDA)* en novembre 1992 pour le traitement des cancers ovariens. L'appellation Taxol a été déposée comme nom commercial par la société BMS et paclitaxel en est devenue la dénomination commune internationale. En 1994, le paclitaxel a également été approuvé par la FDA pour le traitement du cancer du sein et encore plus récemment pour le cancer bronchique non à petites cellules. Le paclitaxel est commercialisé aux États-Unis et au Canada depuis janvier 1993 et en France depuis 1995. Actuellement il est aussi disponible dans beaucoup d'autres pays.

Au cours des études sur l'hémisynthèse du paclitaxel réalisées par Pierre Potier et ses collègues en 1986 à l'*Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN)*, un intermédiaire (le docétaxel) s'est révélé plus puissant que le paclitaxel lui-même. Ce nouvel agent anticancéreux non naturel a été développé dès 1987 en France par la société Rhône-Poulenc Rorer (aujourd'hui connue sous le nom de Sanofi-aventis).

En 1990 les essais cliniques ont été initiés et en juillet 1994, deux ans après la reconnaissance du Taxol comme médicament, Rhône-Poulenc Rorer a aussi déposé une demande d'AMM pour cette nouvelle molécule sous le nom de Taxotère®. Sa commercialisation a commencé en 1995 au Canada et en Afrique du Sud et en 1996 en Europe. Le paclitaxel et le docétaxel sont les deux représentants de la classe pharmaceutique des *taxanes*. Aujourd'hui le Taxol® est générique (Paxene®) et les taxanes continuent à jouer un rôle primordial dans la lutte contre le cancer.

2.3 Structure des taxanes : paclitaxel et docétaxel

Le paclitaxel est un composé diterpénique appartenant à la sous-classe des taxanes. Cette sous-classe de composés se caractérise par la présence d'un squelette taxène du type méthanobenzocyclodécène polyoxygéné. Le paclitaxel, en particulier, a en plus un cycle oxétane accolé en position 4 et 5 et une chaîne latérale du type ester liée au C¹³. Ce produit naturel présente 11 centres chiraux.

Le docétaxel est un analogue hémisynthétique du paclitaxel désacétylé en position 10 et dans lequel le groupe t-butyloxycarbonyl (Boc) remplace en 3' le groupe benzoyl de la chaîne latérale. Les différences de structure entre paclitaxel et docétaxel apparaissent de couleur rouge dans les figures 2.1 et 2.2.

Les dénominations scientifiques du paclitaxel et du docétaxel sont respectivement :

Paclitaxel : (2*R*,3*S*)-3-benzoylamino-2-hydroxy-3-phénylpropanoate de [2*aR*-[2*a*α,4*β*,4*a*β,6*β*,9α(*αR**,*βS**,11α,12α,12*a*α,12*b*α)]β(benzoylamino-α-hydroxy-6,12*b*-bis-(acétyloxy-12-(benzoyloxy)-2*a*,3,4,4*a*,5,6,9,10,11,12,12*a*,12*b*-dodécahydro-4,11-dihydroxy-4*a*,8,13,13-tétraméthyl-5-oxo-7,11-méthano-1*H*-cyclodéca[1,2-*b*]oxét-9-yle.

Docétaxel : ((2*R*,3*S*)-3-[(1,1-diméthyléthoxy)carbonyl]amino]-2-hydroxy-3-phénylpropanoate de [2*aR*-[2*a*α,4*β*,4*a*β,6*β*,9α(*αR**,*βS**),11α,12α,12*a*α,12*b*α)]β-[(1,1-diméthoxyéthoxy)carbonyl]-amino]-α-hydroxy-12*b*-acétoxy)-12-(benzoyloxy)-2*a*,3,4,4*a*,5,6,9,10,11,12,12*a*,12*b*-dodécahydro-4,6,11-trihydroxy-4*a*,8,13,13-tétraméthyl-5-oxo-7-11-méthano-1*H*-cyclodéca[3,4]benz[1,2-*b*]oxét-9-yle.

2.4 Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel

2.4.1 Extraction du paclitaxel à partir de *Taxus brevifolia*

La première source d'approvisionnement en paclitaxel consistait à l'extraire de l'écorce de l'if du Pacifique. Cependant cette méthode présentait à la fois un rendement de production

2. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

2.4. Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel

| Date | Événement |
|----------------|---|
| Juin 1960 | Début des contrats avec le National Cancer Institute |
| Aout 1962 | Collecte de <i>Taxus brevifolia</i> dans l'état de Washington (U.S.A.) |
| Avril 1964 | Cytotoxicité de l'extrait de l'écorce de <i>T. brevifolia</i> sur les cellules KB |
| Juin 1964 | Confirmation de la cytotoxicité sur les cellules KB |
| Octobre 1964 | Envoi de 13,6 kg d'écorce de <i>T. brevifolia</i> à M. Wall au <i>RTI international</i> |
| Octobre 1966 | Isolement du Taxol pur pour la première fois |
| Octobre 1966 | Cytotoxicité du Taxol pur sur les cellules KB |
| ? ? 1967 | Rapport de l'isolement du Taxol à la réunion nationale de l' <i>American Chemical Society (ACS)</i> |
| 1965-1967 | Étude de l'activité d'autres espèces de <i>Taxus</i> et étude de l'activité de <i>T. brevifolia</i> selon son emplacement géographique |
| 1967 | Activité anticancéreuse <i>in vivo</i> du Taxol sur la leucémie L1210 et sur un carcinome de Walker 256 |
| 1968 | Activité anticancéreuse <i>in vivo</i> du Taxol sur les leucémies P1534 et P388 |
| 1968-1969 | Étude de l'activité des différentes parties végétales de <i>T. brevifolia</i> |
| Mai 1971 | Publication de la structure chimique du Taxol [73] |
| Avril 1974 | Observation de l'activité du Taxol sur le mélanome B16 |
| Juin 1975 | Confirmation de l'activité du Taxol sur le mélanome B16 ; le Taxol entre en phase de développement |
| Aout 1978 | Publication du Taxol en tant que médicament anticancéreux |
| Novembre 1978 | Activité sur les greffes de sein exogènes MX-1 |
| Décembre 1978 | Confirmation de l'activité sur les greffes de sein exogènes MX-1 |
| Février 1979 | Publication du Taxol en tant que promoteur de l'assemblage des microtubules |
| Juin 1980 | La formulation à base de Cremophor est active sur le mélanome B16 et elle est préférée à la formulation à base de polyéthylène glycol (PEG) |
| Octobre 1980 | Le Taxol passe l'étape de décision 2B, les tests toxicologiques commencent |
| Juin 1982 | Les tests toxicologiques sont terminés |
| Novembre 1982 | Autorisation donnée au Taxol pour remplir une <i>Investigational New Drug Application (INDA)</i> |
| Septembre 1983 | L'INDA est remplie |
| Avril 1984 | L'INDA est acceptée par la FDA |
| Avril 1984 | Les essais cliniques de phase I commencent |
| Avril 1985 | Le Taxol entre en essais cliniques de phase II |

TABLE 2.1 – Chronologie de la découverte et du développement du Taxol (par M. Wall) [39] 1/2

2. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

2.4. Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel

| Date | Événement |
|----------------|--|
| 1984-89 | Les essais de phase II sont limités du fait des difficultés d'approvisionnement en Taxol |
| Août 1989 | Le rapport de l'activité du Taxol sur le cancer des ovaires en état avancé est publié par le groupe de recherche de Johns Hopkins |
| Novembre 1989 | Sélection de BMS comme partenaire via un <i>CRADA</i> |
| Juin 1990 | Conférence du NCI sur le Taxol et sur le genre <i>Taxus</i> |
| Décembre 1991 | Publication de l'activité du Taxol dans le cancer du sein avec métastases par le groupe de recherche du docteur Anderson |
| 1990-93 | Production à grande échelle de Taxol par Hauser Inc. |
| Juillet 1992 | Demande d'autorisation de mise sur le marché (<i>New Drug Application, NDA</i>) auprès de l'agence américaine du médicament (la FDA) |
| Septembre 1992 | 2 ^e conférence sur le Taxol et le genre <i>Taxus</i> |
| Décembre 1992 | L'autorisation de mise sur le marché est accordée pour le traitement du cancer des ovaires en 2 ^e intention |
| Avril 1994 | Élargissement de l'autorisation de mise sur le marché au cancer du sein avec métastases |

TABLE 2.2 – Chronologie de la découverte et du développement du Taxol (par M. Wall) [39] 2/2

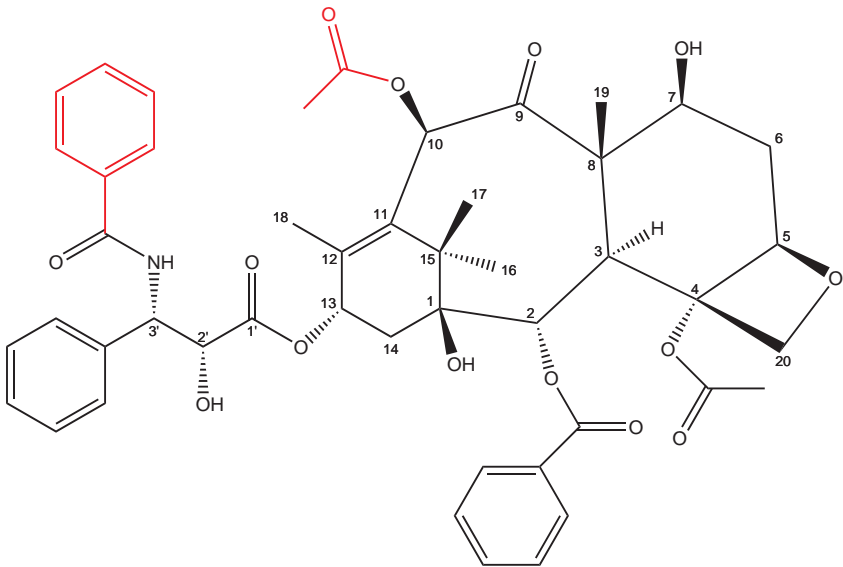


FIGURE 2.1 – Structure du paclitaxel

| DCI | spécialité | laboratoire | formule brute | masse molaire (g/mol) |
|------------|------------|----------------|--|-----------------------|
| paclitaxel | Taxol® | BMS | C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄ | 853.9 |
| docétaxel | Taxotère® | Sanofi-aventis | C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄ | 807.9 |

TABLE 2.3 – Caractéristiques du paclitaxel et du docétaxel

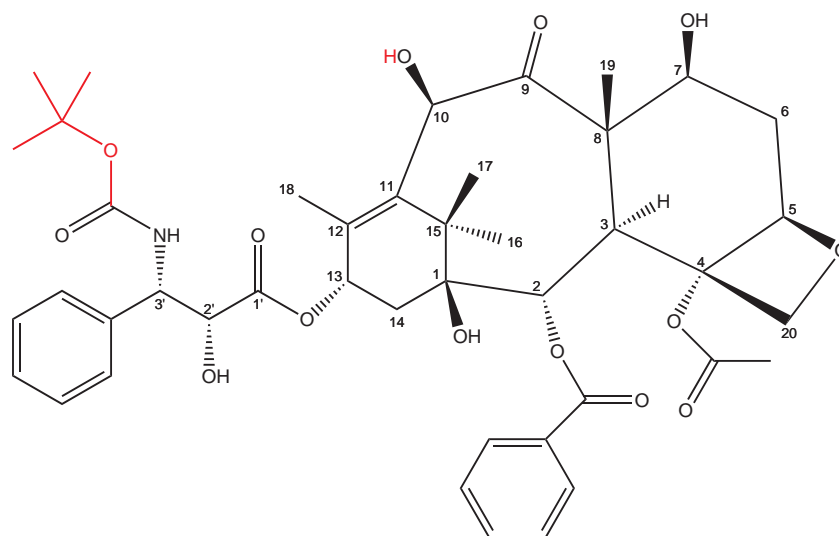


FIGURE 2.2 – Structure du docétaxel

extrêmement faible car 10 kg d'écorce sèche sont nécessaires pour produire 1g de paclitaxel et un bilan écologique négatif car cela nécessitait la destruction de l'arbre.

Ainsi, l'approvisionnement en paclitaxel est rapidement devenu problématique dès la phase de développement du médicament avec la raréfaction de l'if du Pacifique et l'augmentation des quantités de paclitaxel requises pour les différents essais.

Les méthodes d'extraction utilisées à l'époque ne sont pas décrites mais reposent sur des extractions liquide/solide et liquide/liquide à l'aide de solvants organiques et aqueux.

2.4.2 La voie de l'hémisynthèse

Paclitaxel

L'obtention du paclitaxel en grande quantité à partir de l'écorce de l'if du Pacifique n'est plus envisageable. En effet pour extraire 1kg de paclitaxel, il faut abattre 2500 arbres, ce qui crée un grave problème écologique.

Une solution alternative à ce problème est la voie de l'*hémisynthèse* découverte en 1986. Pierre Potier et son équipe (Institut de Chimie des substances Naturelles, ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette) ont découvert un produit naturel non cytotoxique : la 10-déacétylbaccatine III (voir figure 2.3) qui possède déjà la partie diterpénique complexe des taxanes et qui peut donc être utilisée comme précurseur [35]. Ce composé présente l'avantage d'être extrait d'une source renouvelable : les aiguilles de l'if commun (*T. baccata*). Un kilogramme d'aiguilles fraîches contient en moyenne un gramme de ce précurseur. Aujourd'hui l'extraction de la 10-déacétylbaccatine III est réalisée à l'aide de fluides supercritiques comme en témoignent les nombreux brevets et articles sur le sujet[48, 45, 39].

L'hémisynthèse du paclitaxel et du docétaxel est fondée dans un premier temps sur une étape de protection des fonctions alcool libres en C⁷ et C¹⁰ de la 10-déacétylbaccatine III. En effet la structure de la 10-déacétylbaccatine III présente quatre *hydroxyles* libres (C¹, C⁷, C¹⁰ et C¹³). Les hydroxyles en position C¹ et C¹³ sont beaucoup moins réactifs que ceux en C⁷ et C¹⁰ et ceci en raison de leur *encombrement stérique*. Ainsi une protection sélective de C⁷ et C¹⁰ est réalisable. Une réaction d'*acylation* de l'hydroxyle en C¹³ à l'aide de précurseurs des chaînes latérales, suivie d'une étape de déprotection d'un ou des deux

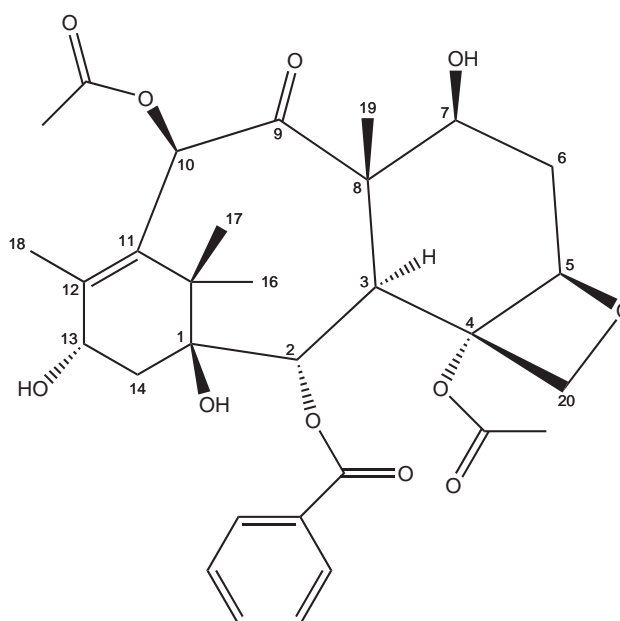


FIGURE 2.3 – 10-déacétylbaccatine III

hydroxyles (C^7 : paclitaxel; C^7 et C^{10} : docétaxel) conduit enfin au composé désiré.

Il a été montré que le réactif *chlorure de triéthylsilyle* (TESCl) était capable de protéger temporairement et sélectivement l'hydroxyle en C^7 sans toucher la position C^{10} . En fait, la présence du groupement *triéthylsilyloxy* en C^7 gêne l'approche du réactif vers la position 10. Cela a donc permis d'introduire des groupes protecteurs distincts en C^7 et C^{10} . Pour le paclitaxel, la première étape consiste à protéger, à l'aide de TESCl, l'hydroxyle C^7 et dans un second temps à acyler l'hydroxyle en C^{10} avec de l'anhydride acétique.

Après avoir protégé les deux hydroxyles les plus réactifs, la position C^{13} devrait être fonctionnalisée. Pour palier le fort encombrement autour de l'hydroxyle en C^{13} , il a été nécessaire de faire réagir l'acoolate correspondant avec le β -lactame, précurseur cyclique de la chaîne latérale. Finalement une étape de désilylation en C^7 et sur la chaîne latérale en milieu acide conduit au paclitaxel.

Ce mécanisme réactionnel de l'hémisynthèse du paclitaxel est illustré dans la figure 2.4.

Docétaxel

Pour le docétaxel, la protection des hydroxyles en C^7 et C^{10} a été effectuée avec un même groupe protecteur Troc ($\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OCO}$), étant donné que les deux hydroxyles sont déprotégés simultanément à l'étape finale. Un couplage entre l'alcool obtenu et le précurseur de la chaîne latérale, dans lequel les fonctions amine et alcool sont masquées, suivi d'un traitement par l'acide méthanoïque pour libérer la fonction aminoalcool, donne l'ester E de la figure 2.6. L'introduction du groupe Boc ($t\text{-BuOCO}$) sur l'atome d'azote et enfin la déprotection des hydroxyles en C^7 et C^{10} conduisent à la formation du docétaxel.

La réaction d'estérification directe de la 10-déacétylbaccatine III avec la *phényl isosérine N-protégée* a également pu être mise au point (DCC, DMAP, toluène) et ceci malgré la faible réactivité de l'hydroxyle en C^{13} . Ainsi, de nombreuses approches synthétiques à la chaîne latérale ont été décrites dans la littérature. D'autre part, des travaux se poursuivent pour améliorer les rendements en 10-déacétylbaccatine III à partir de diverses espèces de *Taxus*

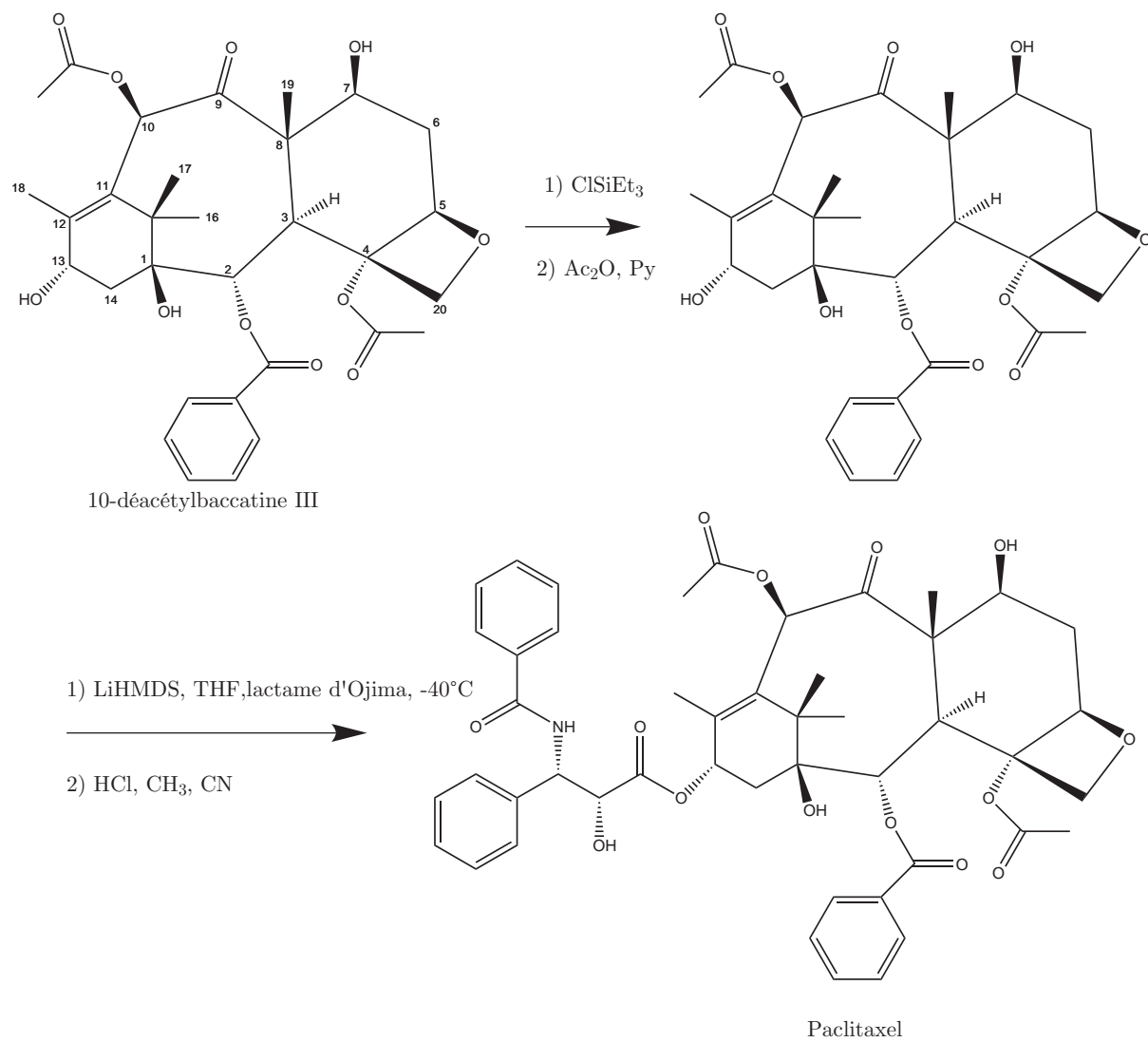


FIGURE 2.4 – Hémisynthèse du paclitaxel [11]

2. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

2.4. Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel

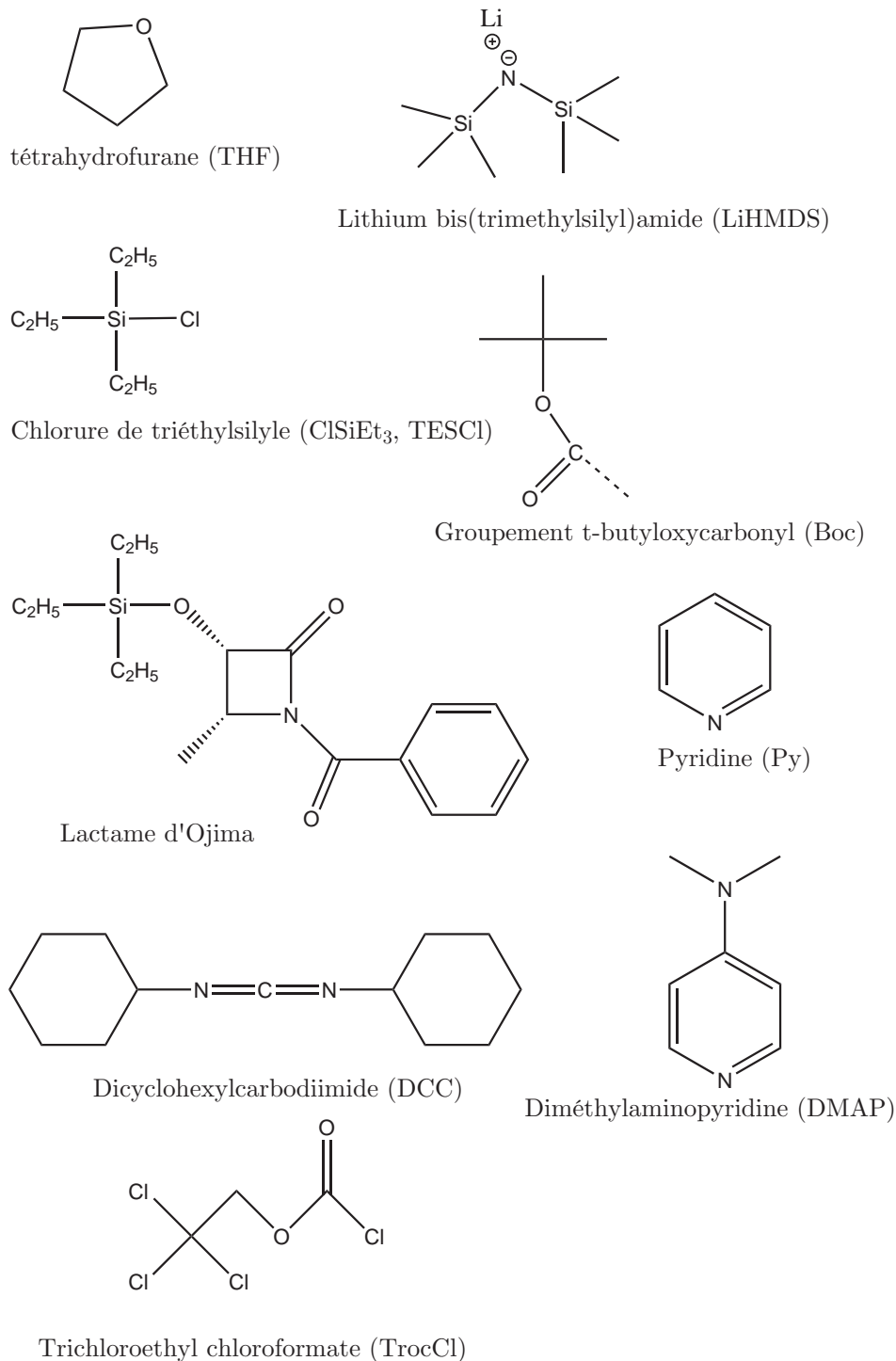


FIGURE 2.5 – Lexique des réactifs et groupements chimiques utilisés pour les hémisynthèses du paclitaxel et du docétaxel

2. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

2.4. Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel

spontanées ou cultivées, ou par des procédés biotechnologiques (par exemple par biosynthèse par un champignon symbiotique des *Taxus*).

2.4.3 La synthèse totale

La synthèse totale du paclitaxel fut l'une des courses les plus disputées dans les années 1990 avec environ 30 équipes de recherche en compétition en 1992.

La synthèse totale du paclitaxel a été achevée pour la première fois en 1994. Cette découverte fut réalisée au même moment et indépendamment par deux équipes de recherche : l'équipe d'Holton (premier article accepté pour la publication) et l'équipe de Nicolaou (premier article publié). On note que Nicolaou a publié sa découverte dans la revue mondialement connue *Nature*. Cela traduit la portée de la découverte qui a franchi les frontières du monde de la chimie pour résonner dans le monde scientifique général. Holton, quant à lui a publié son article dans une revue de référence en matière de chimie : le *Journal of the American Chemical Society*.

Aujourd'hui 6 groupes de recherche ont actuellement publié la synthèse totale du paclitaxel. Ces 6 groupes et leurs stratégies de synthèse sont les suivants :

1. synthèse totale du paclitaxel par Holton [42, 41] - année : 1994 - précurseur : *Patchoulol* - stratégie : synthèse linéaire.
2. synthèse totale du paclitaxel par Nicolaou [56] - année : 1994 - précurseur : *Mucic acid* - stratégie : synthèse convergente.
3. synthèse totale du paclitaxel par Danishefsky [25] - année : 1996 - précurseur : *Wieland-Miescher ketone* - stratégie : synthèse convergente.
4. synthèse totale du paclitaxel par Wender [75] - année : 1997 - précurseur : *Pinene* - stratégie : synthèse linéaire.
5. synthèse totale du paclitaxel par Kuwajima [54] - année : 1998 - précurseur : *synthetic building blocks* - stratégie : synthèse linéaire.
6. synthèse totale du paclitaxel par Mukaiyama [63] - année : 1998 [7] - précurseur : *L-serine* - stratégie : synthèse linéaire.

Malgré la prouesse scientifique que représente une telle découverte la synthèse totale ne peut être exploitée à l'échelle industrielle pour produire du paclitaxel. Le passage d'une synthèse organique ou d'un procédé chimique de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle, appelé *industrialisation*, est une étape de croissance d'un projet qui peut en déterminer la poursuite ou l'arrêt. Chacun peut comprendre que le passage de la verrerie de laboratoire à des cuves en acier inoxydable de grandes dimensions n'est pas direct. À Nancy, en Lorraine, l'*École Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC)* forme des ingénieurs spécialisés dans ce domaine.

Dans le cas du paclitaxel la synthèse est déjà très difficile à réaliser au niveau du laboratoire avec 40 étapes en moyenne et un rendement très faible. À l'échelle industrielle l'équipement et les quantités de solvants et de réactifs nécessaires posent des problèmes d'écologie et de coût.

2.4.4 Les biotechnologies

De nombreuses études et brevets portent sur l'obtention du paclitaxel via la culture cellulaire. Homare Tabata du *Life Science Laboratory, Mitsui Chemicals* au Japon est l'un des pionniers de la culture cellulaire du paclitaxel. Il atteint en 2004 une production de paclitaxel de 295 mg/l avec un procédé de culture cellulaire à grande échelle de *Taxus x media* [66]. En 2004 la compagnie Bristol-Myers Squibb remporte le *Green Synthetic Pathways Award*

2. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus*

2.4. Les voies d'accès au paclitaxel et au docétaxel

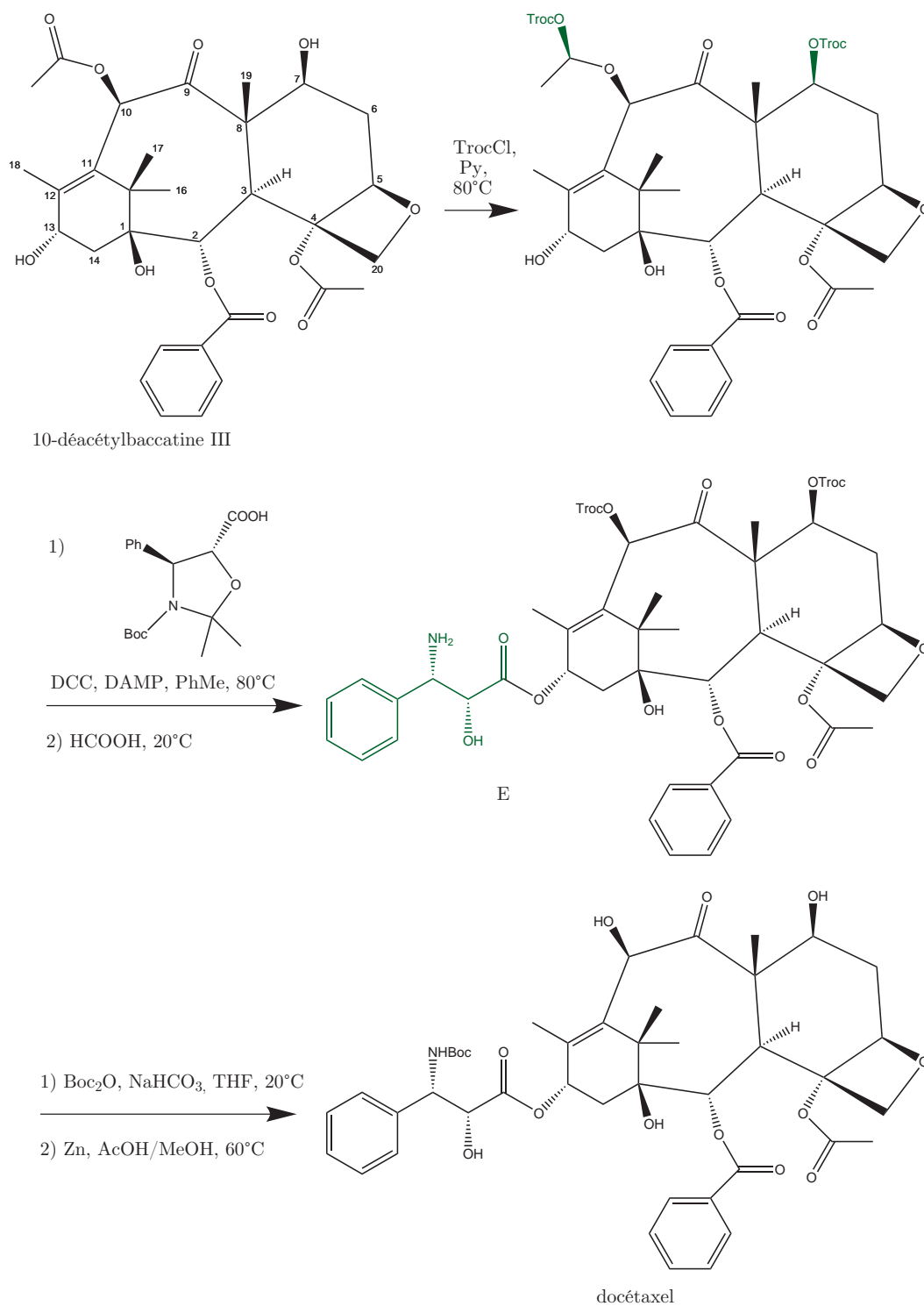


FIGURE 2.6 – Hémisynthèse du docétaxel [11]

décerné par l'*United States Environmental Protection Agency (EPA)*. En effet BMS a développé un procédé durable en utilisant les dernières technologies de culture cellulaire végétale (*Plant Cell Fermentation, PCF*) pour produire du paclitaxel. Durant l'étape de culture cellulaire du procédé, des cals d'une lignée cellulaire spécifique de *Taxus* se développent dans un milieu aqueux dans de grandes cuves de cultures sous des conditions contrôlées de pression et de température. Les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des cellules sont des composés renouvelables : sucres, acides aminés, vitamines... BMS extrait le paclitaxel directement à partir de culture cellulaire, le purifie par chromatographie et l'isole par cristallisation. Comparé à l'hémisynthèse du paclitaxel à partir du 10-déacétylbaccatine III aucune transformation chimique n'intervient dans la culture cellulaire donc aucun solvant n'est utilisé. BMS ne produit aujourd'hui le paclitaxel que par culture cellulaire.

2.5 Pharmacocinétique et métabolisme

Les paramètres pharmacocinétiques du paclitaxel ont été déterminés à des doses de 135-175 mg/m² (m² de surface corporelle) pour des périodes de perfusion de 3 heures et de 24 heures. La concentration plasmatique de paclitaxel diminue en suivant une courbe biphasique ; la demi-vie terminale moyenne du produit a été estimée à des valeurs entre 3 et 52.7 heures. La clairance corporelle totale a varié entre 11.6 et 24 l/h/m² et le volume moyen de distribution à l'état d'équilibre se situe dans un intervalle variant de 198 à 688 l/m². Le paclitaxel se lie à 95-98% aux protéines plasmatiques et présente une bonne diffusion tissulaire.

À des doses de 20 à 115 mg/m², la cinétique du docétaxel est indépendante de la dose et consiste en un modèle à trois compartiments avec des temps de demi-vie pour les phases α , β et γ respectivement de 4 minutes, 36 minutes et 11.1 heures. Les valeurs moyennes de la clairance totale et du volume de distribution à l'équilibre sont respectivement de 21 l/h/m² et de 113 l/h/m². La pharmacocinétique du docétaxel ne varie pas en fonction de l'âge et du sexe de l'individu. Le docétaxel se lie à plus de 95% aux protéines plasmatiques.

Les principaux métabolites du paclitaxel et du docétaxel résultent de processus d'hydroxylation hépatique par les cytochromes P450 (CYP 3A et 2C), qui conduisent à des métabolites dénués de cytotoxicité.

Pour le paclitaxel, le composé 6- α -hydroxypaclitaxel est le métabolite majoritaire présent dans la bile. Le composé issu de l'hydroxylation en *para* du groupement benzoylamino en C^{3'} est le métabolite minoritaire. L'élimination du paclitaxel est essentiellement biliaire et fécale. 60% du paclitaxel sont éliminés par la voie biliaire. Seulement moins de 5% du paclitaxel sont éliminés par la voie urinaire.

Le métabolisme hépatique représente 45% du métabolisme du docétaxel chez l'Homme. Et, le processus d'hydroxylation est probablement responsable de la plus grande part du métabolisme hépatique. L'hydroxylation sur le groupe t-butyle est majoritaire (voir figure 2.8). Les métabolites 12 et 13 issus d'oxydations supplémentaires ont aussi été isolés des fèces humaines. Le docétaxel et ses métabolites sont éliminés à 80% par voie biliaire et fécale et à 6% par voie urinaire.

2.6 Mécanisme d'action pharmacologique

2.6.1 Le cycle cellulaire [3]

Le *cycle cellulaire eucaryote* est divisé en quatre stades, ou *phases*, représentées dans la figure 2.9. Au microscope, les deux événements les plus spectaculaires se produisent quand le noyau se divise, processus appelé *mitose*, et quand la cellule se divise en deux, processus

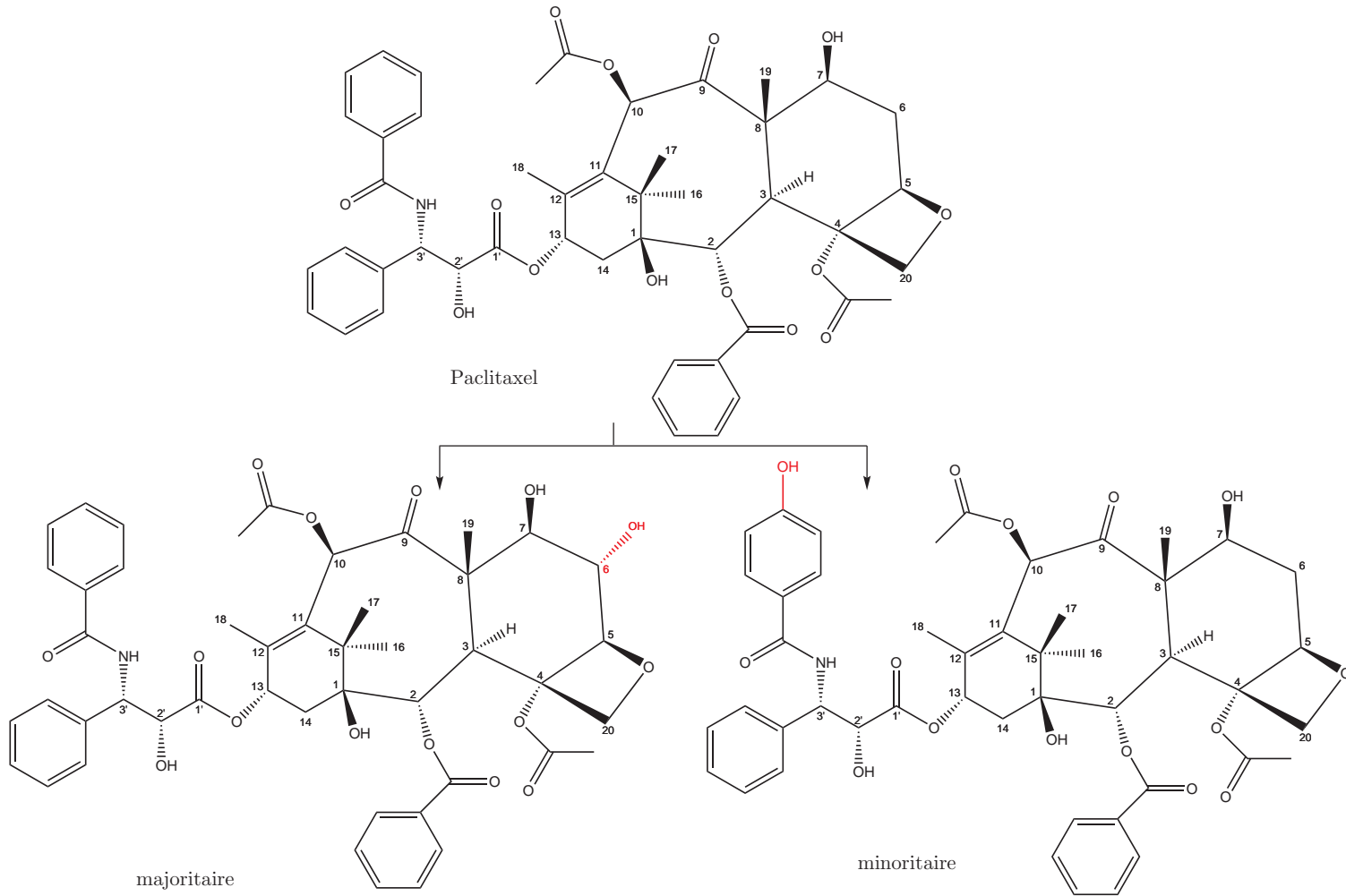


FIGURE 2.7 – Métabolisme du paclitaxel [11]

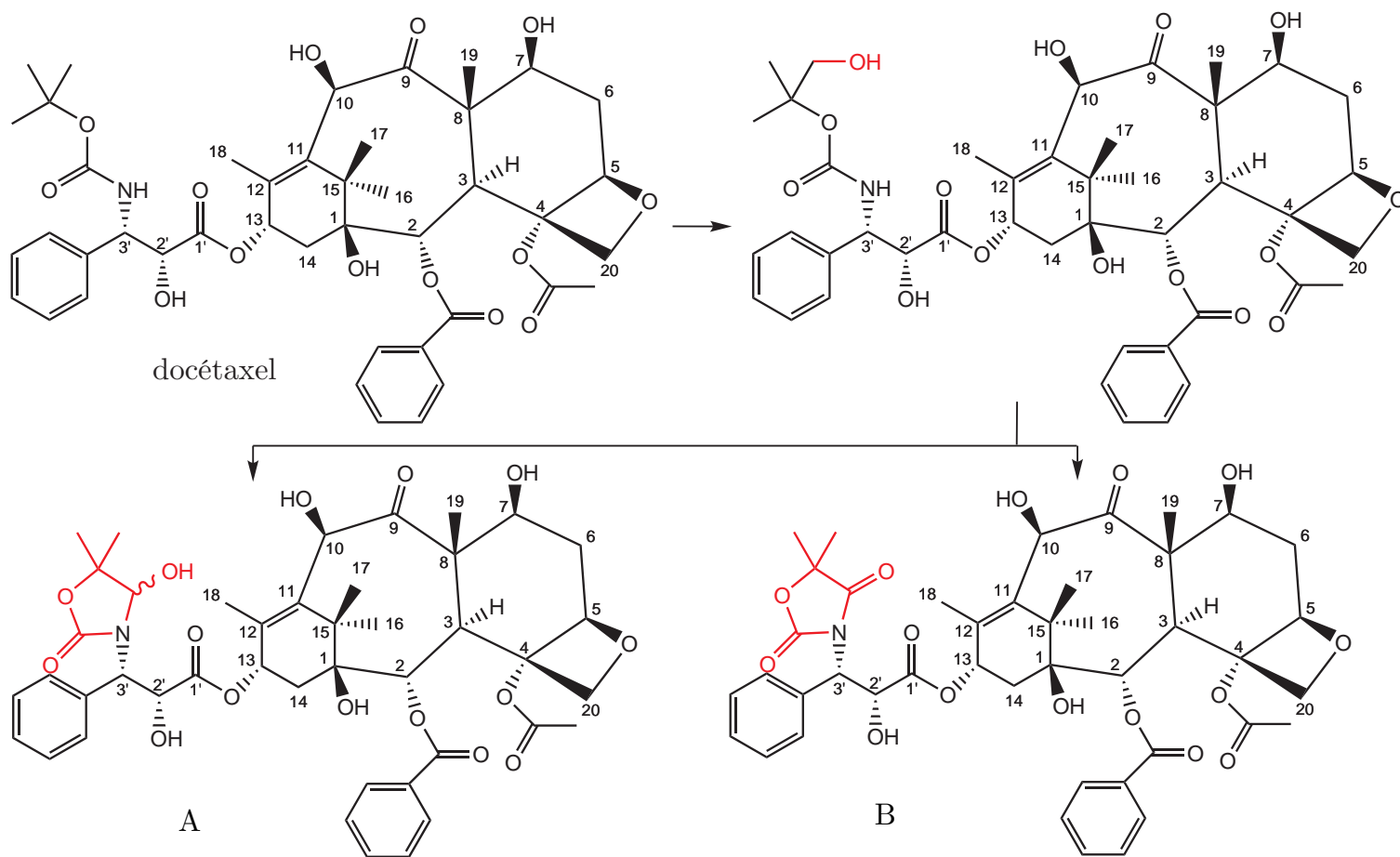


FIGURE 2.8 – Métabolisme du docétaxel [11]

appelé *cytodiérèse* (ou *cytocinèse*). Ces deux processus constituent ensemble la *phase M* du cycle cellulaire. Dans une cellule typique de mammifère, la phase M en entier prend une heure, ce qui n'est qu'une petite fraction de la durée totale du cycle cellulaire. La période entre une phase M et celle qui suit est appelée *interphase*. Au microscope elle apparaît comme un interlude sans événement, durant lequel la cellule ne fait que grandir en taille. Cependant, l'interphase est pour la cellule une période très active, et elle est divisée en trois autres phases du cycle cellulaire. Pendant la phase S (S=synthèse), la cellule réplique son ADN nucléaire, ce qui constitue un pré-requis essentiel pour la division cellulaire. La phase G_1 (G pour *gap* en anglais) est l'intervalle entre la fin de la phase M et le début de la *phase S* (synthèse de l'ADN). La phase G_2 est l'intervalle entre la phase S et le début de la phase M.

2.6.2 La mitose

Prophase

À la *prophase* les chromosomes répliqués, constitués chacun de deux chromatides soeurs étroitement associées, se condensent. Le *fuseau mitotique* s'assemble en dehors du noyau, entre les deux *centrosomes* qui se sont répliqués et séparés (voir figure 2.11).

Prométaphase

La *prométaphase* débute brusquement par la rupture de l'enveloppe nucléaire. Les chromosomes peuvent alors s'attacher aux microtubules du fuseau par leurs *kinétochores*, et subir un mouvement actif (voir figure 2.11).

Métaphase

À la *métaphase*, les chromosomes sont alignés à l'équateur du fuseau, à mi-chemin entre les pôles du fuseau. Les microtubules appariés du kinétochore de chaque chromosome s'attachent aux pôles opposés du fuseau (voir figure 2.11).

Anaphase

À l'*anaphase*, les chromatides appariées se séparent de façon synchrone pour former deux chromosomes fils, tirés chacun lentement vers le pôle du fuseau qu'ils regardent. Les microtubules du kinétochore raccourcissent et les pôles du fuseau s'écartent aussi contribuant ensemble à la séparation des chromosomes (voir figure 2.12).

Télophase

Pendant la *télophase*, chacun des deux jeux de chromosomes fils arrive à un pôle du fuseau. Une enveloppe nucléaire nouvelle se réassemble autour de chaque jeu, terminant la formation des noyaux et marquant la fin de la mitose. La division du cytoplasme commence avec l'assemblage d'un anneau contractile d'*actine* (voir figure 2.12).

Cytodiérèse

Durant la *cytodiérèse* d'une cellule animale, le cytoplasme est divisé en deux par un anneau contractile d'actine et de myosine, qui pince la cellule pour créer deux cellules filles, avec chacune un noyau (voir figure 2.12).

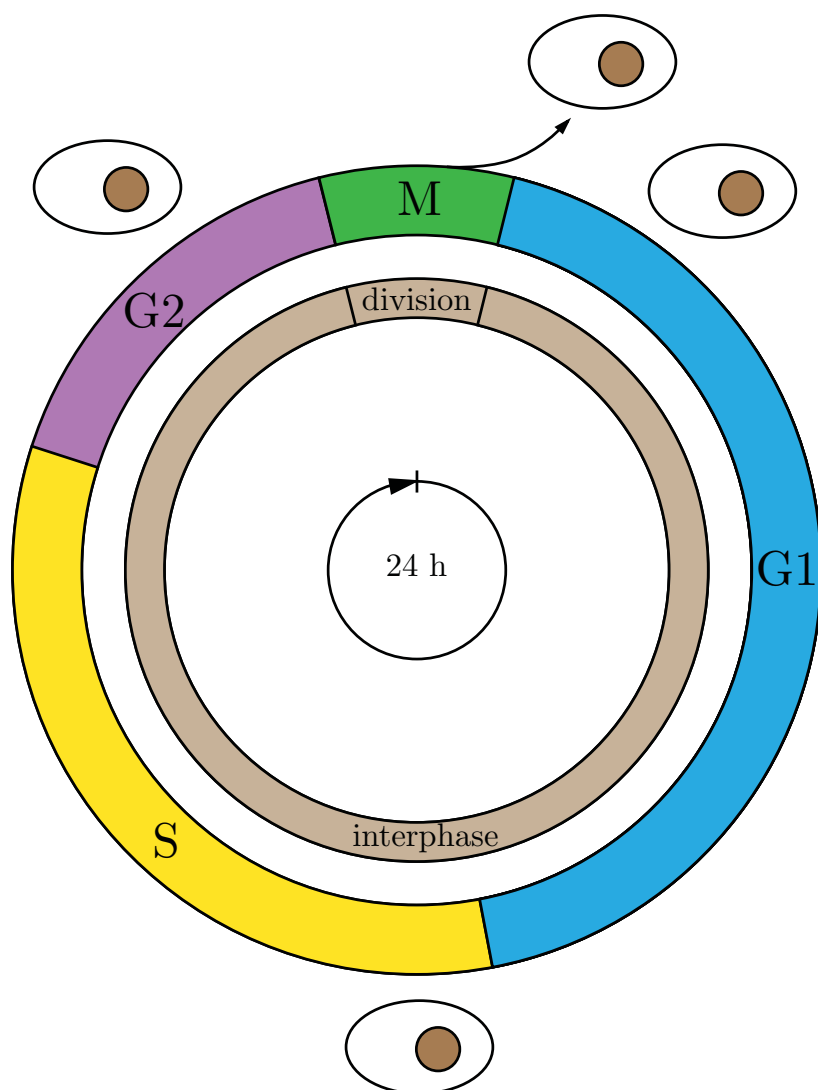


FIGURE 2.9 – Les quatres phases successives d'un cycle cellulaire standard d'une cellule eucaryote [3]

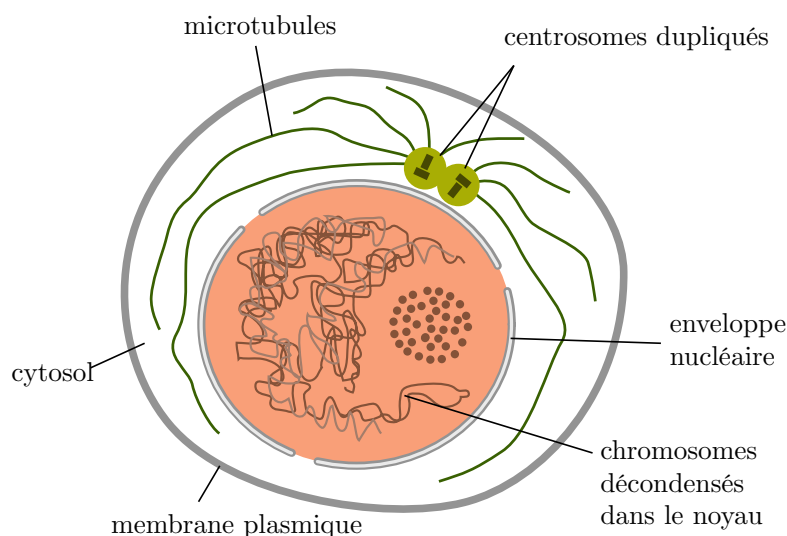


FIGURE 2.10 – Cellule à l'interphase [3]

2.6.3 Les microtubules

Les *microtubules* ont, dans toutes les cellules eucaryotes, un rôle d'organisation essentiel. Ce sont des tubes protéiques longs et relativement rigides, qui peuvent rapidement se désassembler à un endroit et se réassembler dans un autre. Dans une cellule animale typique, les microtubules se développent à partir d'une petite structure proche du centre de la cellule, appelée *centrosome*. En s'étendant vers la périphérie de la cellule, ils créent un système de voies intracellulaires, le long desquelles les vésicules, les organites et d'autres constituants cellulaires peuvent se déplacer. Ceux-ci, ainsi que d'autres systèmes de microtubules cytoplasmiques, représentent la partie du cytosquelette principalement responsable de la détermination de la position des organites intracellulaire liés à la membrane cellulaire, et du guidage du transport intracellulaire.

Quand une cellule entre en mitose, les microtubules cytoplasmiques se désassemblent, puis se réassemblent dans une structure compliquée appelée *fuseau mitotique*. Le fuseau mitotique fournit la machinerie séparant les chromosomes de façon égale entre les deux cellules filles, juste avant que la cellule ne se divise. Des microtubules peuvent aussi former des structures permanentes appelées *cils* et *flagelles* que les cellules utilisent soit comme moyen de propulsion, soit pour balayer le liquide à leur surface. Les cils et flagelles n'interviennent pas dans le mécanisme d'action des taxanes et ne seront donc pas abordés ici.

Les microtubules sont des tubes creux ayant des extrémités de structure distincte

Les microtubules sont construits à partir de sous-unités. Ces sous-unités sont des molécules de *tubuline*. La tubuline est constituée de deux protéines très semblables appelées α -tubuline et β -tubuline, étroitement unies par une liaison non covalente. Les sous-unités s'assemblent à nouveau de façon non covalente, pour former la paroi du microtubule creux cylindrique. L'assemblage de la tubuline en chaîne linéaire forme des *protofilaments*. Tout au long du protofilament il y a alternance d' α -tubuline et de β -tubuline. Un microtubule est constitué par l'assemblage de 13 protofilaments parallèles. Chaque protofilament a une struc-

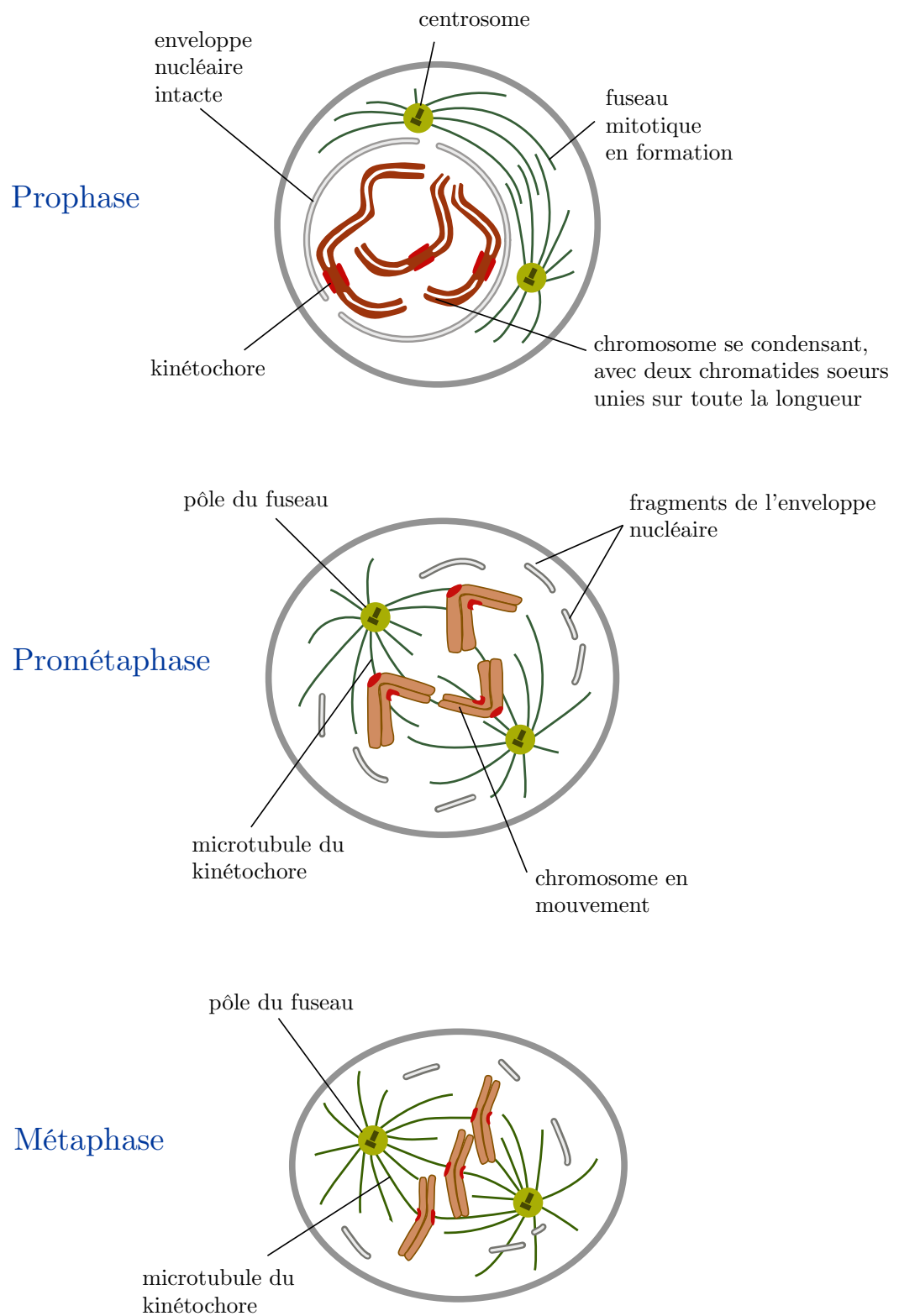


FIGURE 2.11 – Prophase, prométaphase et métaphase [3]

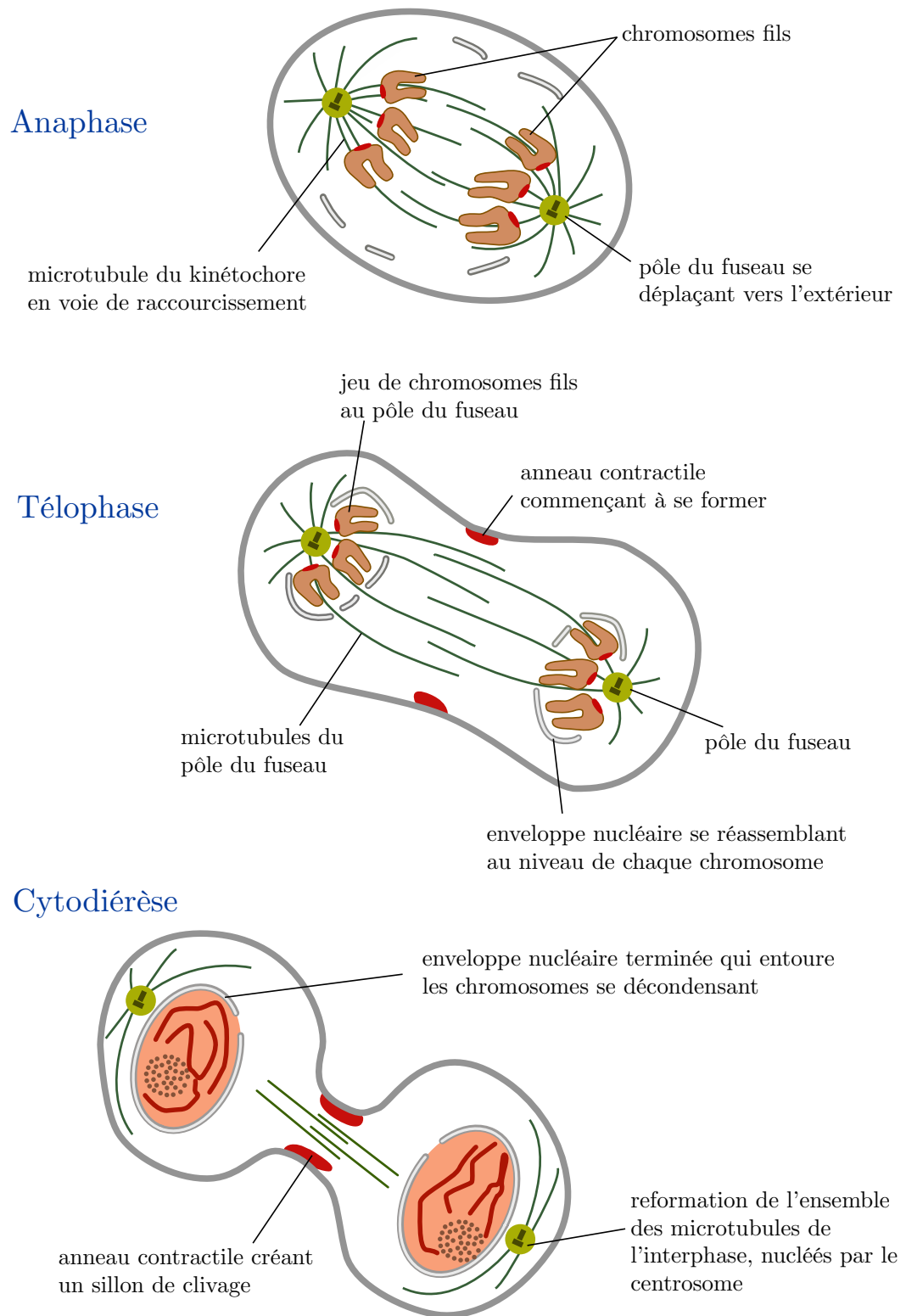


FIGURE 2.12 – Anaphase, télophase et cytotdiérèse [3]

ture polarisée, avec une α -tubuline à une extrémité et une β -tubuline à l'autre extrémité, et cette polarité est la même pour chaque protofilament d'un microtubule. Le microtubule a donc une polarité fonctionnelle avec 13 α -tubulines à une extrémité et 13 β -tubulines à l'autre extrémité. L'extrémité de la β -tubuline du microtubule est appelée *extrémité plus* et l'extrémité de l' α -tubuline du microtubule est appelée *extrémité moins*.

La croissance d'un microtubule se fait à partir d'un anneau initial de 13 molécules de tubuline; les molécules de tubuline sont ajoutées individuellement, construisant graduellement la structure du tube creux. *In vitro*, dans une solution concentrée de tubuline pure, les dimères vont s'ajouter à chaque extrémité du microtubule en croissance. On note qu'ils s'ajoutent plus rapidement à l'extrémité plus qu'à l'extrémité moins (et c'est pourquoi ces extrémités ont été ainsi dénommées initialement). La polarité du microtubule est cruciale tant pour l'assemblage des microtubules que pour leur rôle une fois formés. S'ils n'avaient pas de polarité, ils ne pourraient pas assumer, par exemple, leur fonction de définition d'une direction du transport intracellulaire.

Les microtubules sont maintenus par un équilibre entre assemblage et désassemblage

Une cellule vivante contient un mélange de microtubules et de sous-unités libres de tubuline. Par exemple, dans un *fibroblaste* typique, à chaque instant la moitié de la tubuline cellulaire est sous forme de microtubules, alors que l'autre moitié est libre dans le cytosol, cette seconde moitié formant un pool de sous-unités disponibles pour la croissance des microtubules. La relative instabilité des microtubules leur permet de subir un remodelage rapide continu, ce qui est essentiel à la fonction des microtubules, comme cela est démontré par l'effet de certaines substances (comme le paclitaxel et la *colchicine*) qui empêchent la polymérisation ou la dépolymérisation de la tubuline.

2.6.4 Mécanisme d'action pharmacologique des taxanes

Dans les paragraphes précédents nous avons évoqué le rôle indispensable du fuseau mitotique, qui est composé de microtubules, lors de la mitose cellulaire. Il est donc évident que l'inactivation ou la destruction du fuseau mitotique va bloquer la division cellulaire et va, à terme, entraîner la mort de la cellule.

Les cellules cancéreuses, qui se divisent plus rapidement que la plupart des autres cellules du corps, peuvent par conséquent être tuées préférentiellement par des substances stabilisant ou destabilisant les microtubules. La découverte de telles substances a donné lieu à la création de médicaments appartenant à la classe pharmacologique des *agents du fuseau*. Bien-sûr, les taxanes, représentés par le paclitaxel et le docétaxel sont des agents du fuseau. Il est à noter que les agents du fuseau se divisent en deux sous-classes selon qu'ils stabilisent ou destabilisent les microtubules :

- Les *poisons du fuseau* représentés par les alcaloïdes de la pervenche de Madagascar (*Catharantus roseus*) sont des substances qui destabilisent les microtubules.
- Les *stabilisateurs du fuseau* représentés par les taxanes qui ont un effet stabilisant des microtubules.

Les taxanes sont des promoteurs de l'assemblage des molécules de tubuline en microtubules et ceci même en l'absence de facteurs normalement nécessaires à la polymérisation tels que le GTP (Guanosine triphosphate) et les MAPS (Microtubule-Associated Proteins).

Parallèlement, le paclitaxel et le docétaxel inhibent la dépolymérisation des microtubules constitués ce qui leur vaut l'appellation de stabilisant du fuseau et ce qui conduit à une diminution marquée de la tubuline libre. Les microtubules ainsi formés sont rigides et non fonctionnels et ne peuvent plus se désassembler *in vitro* dans les conditions usuelles telles

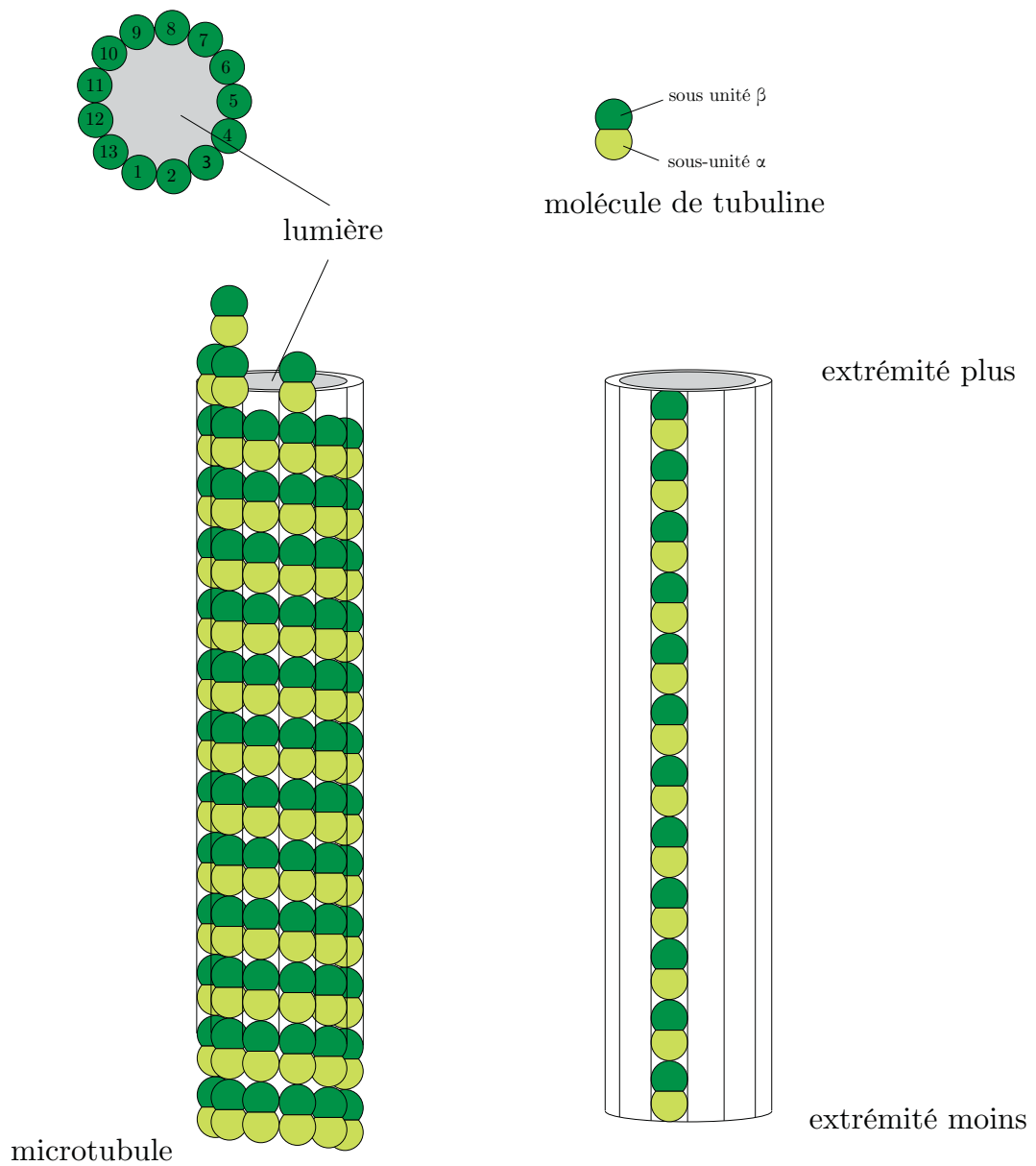


FIGURE 2.13 – Structure de la tubuline et des microtubules

que l'action des ions Ca^{2+} ou du froid. Étant donné que les microtubules sont non fonctionnels, la cellule reste bloquée en phase G₂-M de mitose empêchant toute multiplication cellulaire et, par là-même, toute prolifération tumorale. En résumé il y a inhibition de la dépolymérisation des microtubules fusoriaux (blocage en fin de mitose) par liaison stable à la tubuline. Le site de fixation des taxanes aux microtubules est situé sur l'une des faces de la β -tubuline [51].

De récentes études montrent que les effets pharmacologiques bénéfiques, ainsi que les effets secondaires indésirables rencontrés durant l'administration du paclitaxel, ne peuvent pas être expliqués uniquement par le mécanisme de stabilisation des microtubules décrits ci-dessus. À l'heure actuelle, plusieurs travaux suggèrent que les taxanes sont impliqués dans des processus de régulation de l'expression de gènes. Par exemple, il a été mis en évidence que le paclitaxel induit le gène *cox-2* lequel catalyse la formation de *prostaglandines*. Cette induction pourrait être en partie responsable de la réaction d'hypersensibilité du paclitaxel. D'autres études ont montré que contrairement au paclitaxel, les *épothilones*, macrolides naturels montrant une cytotoxicité similaire à celle du paclitaxel (stabilisation de microtubules), n'activent pas les macrophages pour une production de cytokines pro-inflammatoires et de monoxyde d'azote. Les taxanes semblent également induire l'expression du gène de transcription *krox-24* dont l'expression est déficitaire dans plusieurs cellules tumorales. Cette augmentation de l'expression du gène *krox-24* pourrait prévenir des transformations oncogéniques.

De plus, le paclitaxel est aussi capable de neutraliser, en induisant sa phosphorylation, la protéine humaine Bcl-2 qui a pour fonction d'empêcher les cellules de subir un processus d'*apoptose* [12]. Ainsi, cette découverte indique que le paclitaxel, en plus de ses activités antimitotiques, contribue à la mort cellulaire par apoptose.

Des phénomènes de résistance au paclitaxel et au docétaxel ont été mis en évidence. Comme avec d'autres antitumoraux, ils sont liés entre autre à une surexpression des gènes *mdr* codant pour la *glycoprotéine P*, entraînant une élimination accrue (efflux) du produit actif et une diminution marquée de sa concentration intracellulaire. La *MRP1* (*Multidrug Resistance Associated Proteins*) en revanche transporte peu le paclitaxel. Récemment, il a été démontré que la *LRP* (*Lung Resistance Protein*) est aussi impliquée dans la résistance au paclitaxel. Des altérations par mutation des sites de liaison des taxoïdes à la tubuline sont également possibles.

2.7 Relation structure-activité du paclitaxel

Il a été montré que l'ensemble de la structure du paclitaxel était indispensable pour permettre son activité, la partie taxane et la chaîne latérale étant par elles-mêmes inactives, tout du moins *in vivo*. Sur la partie taxane des modifications au niveau de C⁷, C⁹ et C¹⁰ n'apportent pas de changements significatifs de l'activité. En revanche, l'hydroxyle en C¹, le cycle oxétane ainsi que le groupe benzoyle en C² sont fondamentaux, toutes modifications à leur endroit sont défavorables (exemple : remplacement de O de l'oxétane par S, NH ou CH₂). Le groupe acétate en C⁴ semble aussi avoir un effet important, étant donné que le dérivé désacétylé montre une cytotoxicité réduite.

La chaîne latérale phénylisosérine en 13 doit avoir la configuration absolue (2'R,3'S) et une conformation privilégiée qui permet une interaction convenable avec la tubuline, indispensable pour l'activité. La fonction alcool située en C^{2'} et des groupements lipophiles en C^{3'} sont essentiels mais la nature des groupes N-acyle hydrophobes en C^{3'} n'affecte pas l'activité. Toutefois une étude récente [37] remet en question l'importance réelle de cette chaîne qui jouerait surtout le rôle d'un point d'ancrage complémentaire sur la tubuline.

Les relations structure-activité du paclitaxel sont résumées dans la figure 2.14.

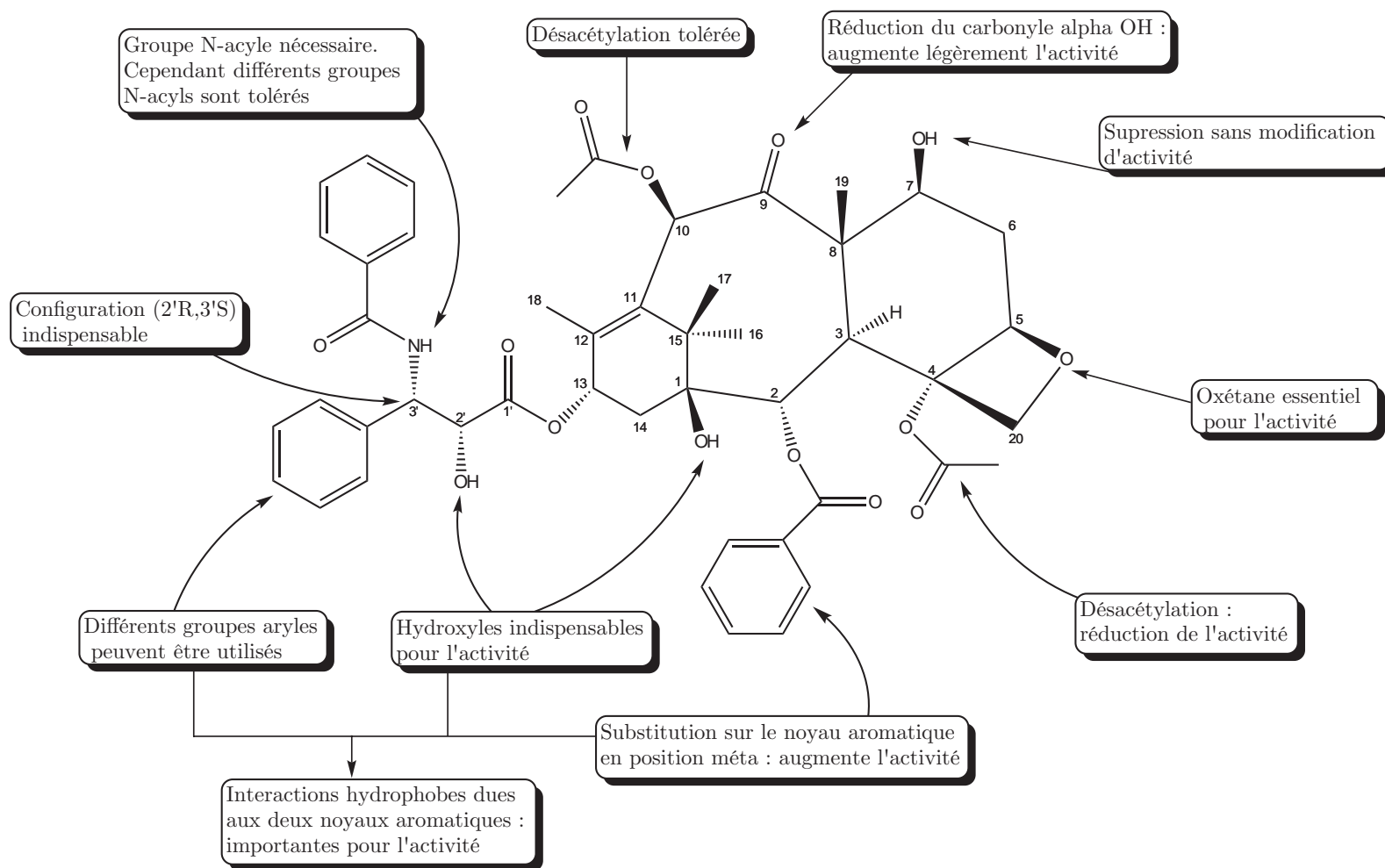


FIGURE 2.14 – Relations structure-activité du paclitaxel

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre 3

Culture *in vitro* de *Taxus baccata* et *Taxus x media* var. *Hicksii*

3.1 Introduction

L'étude présentée ici concerne la micropropagation de pousses de *T. x media* var. *Hicksii*. Cette variété présente un intérêt particulier car on lui attribue de fortes teneurs en taxanes dans ses tissus. Nous réalisons la culture *in vitro* de *T. x media* var. *Hicksii* en milieu stérile afin de multiplier les plants et de stimuler la croissance des racines. La croissance de *T. x media* var. *Hicksii* en milieu stérile se révèle être lente et difficile. De plus, le matériel végétal dont nous disposons n'est disponible qu'en faibles quantités. En parallèle de l'étude menée sur *T. x media* var. *Hicksii* nous réalisons des expérimentations de culture *in vitro* sur *T. baccata*. Ces expérimentations nous permettent d'obtenir des informations complémentaires sur la stérilisation du matériel végétal ainsi que sur la croissance du genre *Taxus* en milieu stérile. Ces études ont été réalisées par l'auteur sous la direction du Professeur Max HENRY au Laboratoire de Botanique et Mycologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy d'avril à juin 2007.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Matériel végétal

Taxus x media var. *Hicksii*

Le matériel végétal consiste en 24 plants (La figure 3.1 illustre un de ces plants). Ces plants sont cultivés en conditions stériles sur un milieu de culture WPM 1/2 dans des tubes en verre de 2,5 cm de diamètre et 16 cm de hauteur. Ils sont isolés du milieu extérieur par un bouchon de coton dense ainsi que par un surbouchon de plastique. Parmi ces 24 plants, 12 sont des plantules avec un socle de cal (voir figure 3.1) et 12 sont des cals seuls ou des bourgeons seuls sur socle de cal. Ces 24 plants ont été obtenus par le Professeur Max Henry à partir d'explants non stériles (branches) prélevés sur un plant de *T. x media* var. *Hicksii* fourni par une entreprise tiers.

Taxus baccata

Taxus baccata est une espèce très répandue dans nos régions dans les parcs et jardins. Le matériel végétal utilisé dans cette étude a été récolté sur un arbre adulte dans la nature.

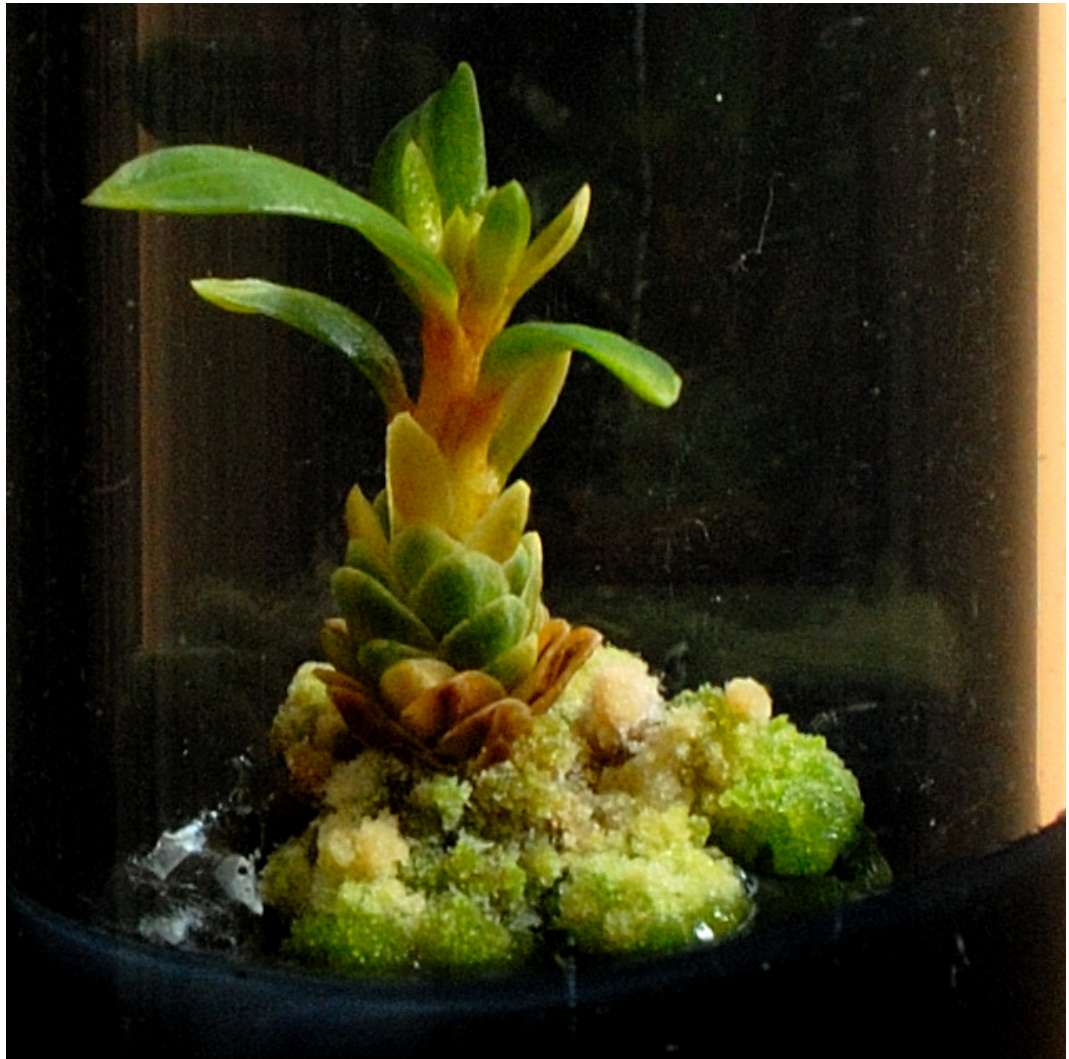


FIGURE 3.1 – Plantule de *Taxus x media* var. *Hicksii* sur socle de cal

3.2.2 Milieu de culture

Nous avons utilisé le même milieu de culture pour *T. x media* var. *Hicksii* et *T. baccata*. Le milieu utilisé est le *Woody Plant Medium* (=WPM) dans lequel les concentrations des sels majeurs sont réduites de moitié (=WPM *major salt half strength*). De plus, on ajoute à ce milieu de base 5 % (m/v) de charbon actif. Le charbon actif a pour but de piéger les composés phénoliques toxiques pour le végétal responsables du brunissement des tissus [79]. En effet le brunissement des tissus provient de l'oxydation par les polyphénoloxydases des composés polyphénoliques excrétés par les explants. Ces composés, ainsi que les produits de leur oxydation, sont connus pour inhiber les activités enzymatiques, ce qui a pour effet d'entraîner la mort des tissus. Ce phénomène est particulièrement marqué chez les ligneux. Enfin des hormones de croissance peuvent être ajoutées au milieu afin d'optimiser la croissance du végétal.

Des études montrent que le milieu de culture WPM *major salt half strength* & *charbon actif* est le mieux adapté à la culture de *T. x media* var. *Hicksii* [50]. Dans la suite de ce travail, nous ferons référence à ce milieu sous le terme WPM 1/2.

Préparation du milieu WPM 1/2

Le milieu décrit ci-dessus a été réalisé plusieurs fois à partir de solutions mères. Ces solutions mères sont au nombre de 8. Il s'agit des solutions A, B, C, D, E, F, G et H présentées dans le tableau 3.1 (le tableau 3.2 fournit des informations quant à la préparation des solutions). Ces solutions mères ont été préparées avec de l'eau *ultra-pure* et ont été conservées à faible température afin de retarder la prolifération bactérienne.

La préparation de milieu WPM 1/2 se fait par volume de 1 litre, ce qui permet de préparer un portoir de 48 tubes de culture. Les volumes des solutions mères à utiliser pour réaliser 1 litre de milieu figurent dans le tableau 3.3. La figure 3.2 détaille cette procédure de préparation. Une fois la préparation terminée, les tubes de milieu peuvent être conservés dans un lieu approprié dans l'attente de leur utilisation.

Procédure de préparation du milieu WPM 1/2 Pour la préparation du milieu WPM 1/2 on utilise deux erlenmeyers : le premier erlenmeyer contient le mélange nutritionnel additionné d'éventuelles hormones de croissance tandis que le deuxième erlenmeyer contient la solution gélifiante à base d'agar-agar. La composition des deux erlenmeyers est détaillée dans le tableau 3.3. Dans ce tableau nous pouvons remarquer que les volumes des solutions A, B, C, D, E et F sont réduits de moitié par rapport aux volumes du tableau 3.1 qui décrit la composition d'un milieu WPM. En effet, nous préparons un milieu WPM où les concentrations des sels majeurs sont réduites de moitié.

L'agar-agar est dissout dans 500 ml d'eau distillée dans l'erlenmeyer par apport de chaleur et sous agitation. Toujours avec apport de chaleur et sous agitation on verse le contenu de l'erlenmeyer 1 dans l'erlenmeyer 2 et on ajoute le charbon actif.

Une fois le mélange effectué et bien homogénéisé on peut couler 48 tubes de culture.

Les hormones de croissance L'orientation de l'organogénèse *in vitro* des végétaux dépend essentiellement de l'équilibre entre deux types d'hormones de croissance : les *auxines* et les *cytokinines*. Les concentrations de ces hormones dans le végétal, et donc dans le milieu de culture auront des conséquences sur la croissance des végétaux. Ici, nous utilisons deux auxines :

- l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D).
- l'acide indole-acétique (AIA).

Et nous utilisons une cytokinine, la *kinétine* (KIN).

| | Produits chimiques | Concentrations des solutions mères (mg/ml) | Volume de solution mère à prélever pour faire 1l de milieu WPM (ml) | Volume total pour chacune des solutions mères (ml) | Quantité à peser (g) | Concentration finale dans le milieu WPM (mg/ml) |
|---|---|--|---|--|--------------------------------|---|
| A | NH ₄ NO ₃ Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 20 27.8 | 20 | 400 | 8 11.12 | 400 556 |
| B | K ₂ SO ₄ | 49.5 | 20 | 400 | 19.8 | 990 |
| C | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 19.2 | 5 | 100 | 1.92 | 96 |
| D | KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 34 1.24 0.05 | 5 | 100 | 3.4 0.124 0.005 | 170 6.2 0.25 |
| E | MgSO ₄ ·7H ₂ O MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O | 74 4.46 1.72 0.05 | 5 | 100 | 7.4 0.446 0.172 0.005 | 370 22.3 8.6 0.25 |
| F | FeSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ EDTA | 5.57 7.45 | 5 | 100 | 0.557 0.745 | 27.8 37.3 |
| G | Thiamine HCl Acide Nicotinique Pyridoxine HCl Glycine | 0.2 0.1 0.1 0.4 | 5 | 100 | 0.02 0.01 0.01 0.04 | 1 0.5 0.5 2 |
| H | Myo-inositol | 20 | 5 | 100 | 2 | 100 |
| I | Saccharose | | | | 0 | 20 g/l |
| J | Agar | | | | 0 | 7 g/l |

TABLE 3.1 – Composition du Woody Plant Medium (=milieu WPM)

| | |
|--|---|
| 2,4-D = acide 2,4-dichlorophénoxyacétique | Pour 100 ml, peser 0.05 g. Ajouter NaOH ou KOH à 0.5 N jusqu'à ce que le produit soit dissous. Ajuster ensuite avec H ₂ O. |
| Adénine | Chauffer pour dissoudre et ajuster. |
| Kinétine = 6-(Furfurylamino)-purine | Pour 100 ml, peser 0.05 g. Ajouter HCl à 0.5 N jusqu'à ce que le produit soit dissous. Ajuster ensuite avec H ₂ O. |
| Vitamines | Chauffer pour dissoudre. Vitamine M2 : 1 goutte + NaOH 0.5 N |
| Fe EDTA | Peser le fer et l'EDTA séparément. Mélanger, chauffer jusqu'à ébullition. Ne pas conserver la solution au réfrigérateur sinon elle cristallise. |
| Macroéléments | Chauffer pour dissoudre |
| Microéléments | Dissoudre avec HCl |
| AIA | Ajouter quelques gouttes de NaOH pour dissoudre. |

TABLE 3.2 – Préparation des solutions

| erlenmeyer 1 | |
|---------------|------------|
| solution A | 10 ml |
| solution B | 10 ml |
| solution C | 2.5 ml |
| solution D | 2.5 ml |
| solution E | 2.5 ml |
| solution F | 2.5 ml |
| solution G | 5 ml |
| solution H | 5 ml |
| saccharose I | 20 g |
| eau distillée | qsp 500 ml |

| erlenmeyer 2 | |
|---------------|------------|
| agar | 6 g |
| eau distillée | qsp 500 ml |

TABLE 3.3 – Composition des erlenmeyers 1 et 2 pour la préparation d'un litre de milieu WPM 1/2

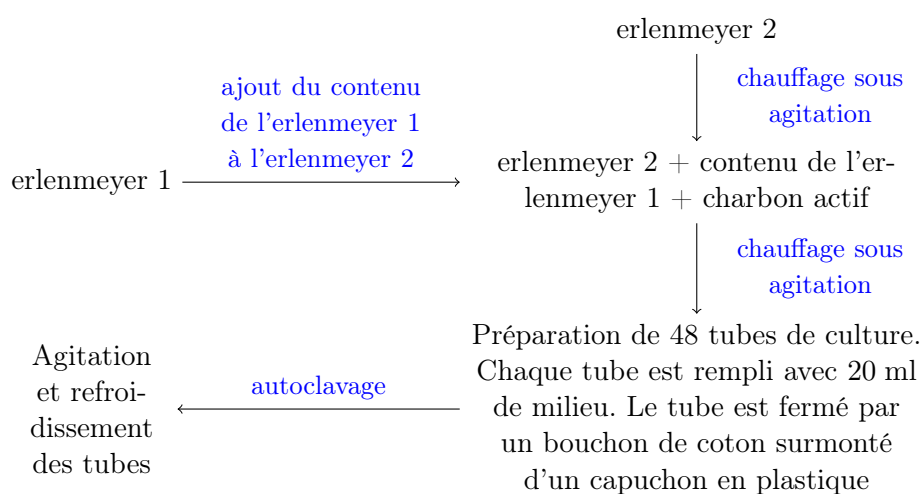


FIGURE 3.2 – Mode opératoire de la préparation du milieu WPM

Les effets classiques de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse *in vitro* des végétaux sont illustrés dans la figure 3.3. Le tableau 3.2 fournit des informations quant à l'ajout des hormones de croissance au milieu de culture.

3.2.3 Culture *in vitro* de *T. baccata*

Afin d'étudier les effets de l'équilibre auxines/cytokinines sur la croissance *in vitro* des bourgeons de *T. baccata*, il a été réalisé 5 fois un litre de milieu de culture. Dans chaque litre de milieu les concentrations en hormones de croissance sont différentes (voir tableau 3.4). Ainsi, nous étudions la croissance des bourgeons de *T. baccata* sur 5 portoirs de 48 tubes de culture, chaque tube accueillant un bourgeon.

Stérilisation des récoltes de *T. baccata*

Nous avons réalisé l'étude comparative de deux procédures de stérilisation : l'une utilise l'hypochlorite de sodium (NaClO) et l'autre utilise l'eau oxygénée (H_2O_2). Ces deux procédures sont illustrées par la figure 3.4. La stérilisation se fait sur les branches entières. Ce n'est qu'à l'issue de la procédure que l'on sectionne les bourgeons à mettre en culture. En effet, si l'on sectionne les bourgeons avant la stérilisation, les produits stérilisants pourront facilement diffuser à l'intérieur des bourgeons à partir des points de section.

3.2.4 Culture *in vitro* de *T. x media* var. *Hicksii*

Le travail de culture *in vitro* sur *T. x media* var. *Hicksii* consiste à multiplier les plants existants par repiquage.

Le repiquage a deux objectifs :

- procéder à un changement du milieu de culture.
- procéder à la multiplication des plants. En effet, dès qu'on en a la possibilité on divise un même plant en plusieurs nouveaux plants.

Exemple : Si un plant se compose d'un socle de cal surmonté d'une plantule et d'un bourgeon on pourra diviser ce plant en trois nouveaux plants : le cal, le bourgeon et la plantule.

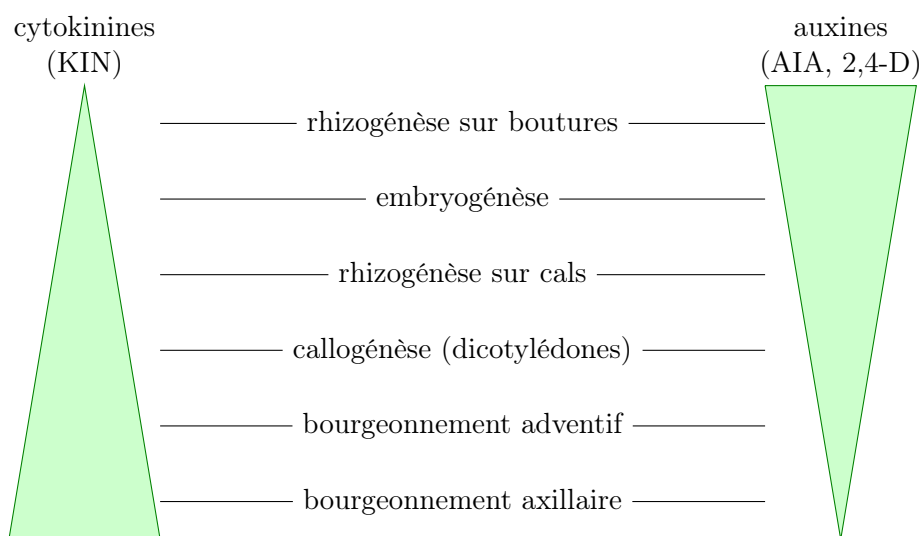


FIGURE 3.3 – Effets classiques de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse *in vitro* des végétaux [79]

Procédure de repiquage

Le repiquage est pratiqué sous une hotte à flux laminaire. Les instruments stériles utilisés sont : trois pinces longues, trois scalpels et une spatule. Les scalpels sont montés avec des lames chirurgicales neuves (Swann-Morton, Carbon Steel V.P.I Protected surgical blades). On utilise un masque à usage unique (masque simple-pli à usage unique, Laboratoire Euro-medix). L'asepsie des mains de l'utilisateur est réalisée avec de l'éthanol à 95 % v/v.

Après chaque utilisation, le matériel réutilisable est nettoyé à la main puis nettoyé aux ultrasons (environ 2h30 à 60°C avec une solution détergente). Enfin le matériel est stérilisé dans un Poupinel *WTC Binder*. Le cycle de stérilisation est de 2 heures à 180°C.

La procédure de repiquage est la suivante :

- Désinfection du plan de travail avec de l'éthanol à 95 % v/v.
- Prendre une boîte de Pétri stérile en verre.
- Prendre un tube de culture, l'ouvrir et sortir l'explant avec une pince stérile.
- Diviser l'explant à l'aide du scalpel et sélectionner les parties à repiquer.
- Prendre un nouveau tube de culture, l'ouvrir, le passer à la flamme. Déposer une des parties à repiquer dans ce nouveau tube. Passer le tube à la flamme et reboucher.
- Mettre le scalpel et la pince utilisés dans un bain d'éthanol à 95 % v/v, les passer à la flamme puis les laisser refroidir.
- Utiliser un autre jeu de pince + scalpel pendant que le précédent refroidit.

Durant l'étude réalisée sur *T. x media* var. *Hicksii* plusieurs repiquages ont été effectués notamment pour changer de milieu de culture. En effet, l'influence des concentrations en hormones de croissance sur le développement de ce végétal n'était pas connue en début d'étude. Au fur et à mesure de l'étude réalisée sur *T. baccata* nous avons donc procédé à plusieurs changements de milieu par repiquage. Ces repiquages successifs avaient également l'avantage de stimuler la croissance racinaire du végétal.

La figure 3.5 représente schématiquement les changements de milieux effectués sur la population initiale de *T. x media* var. *Hicksii*. Au début de l'étude cette population initiale est en culture depuis 10 mois sur un milieu WPM 1/2 avec 1 mg/l d'AIA. Le premier repiquage effectué consiste à séparer bourgeons, plantules et cals pour multiplier la population

initiale. Ce premier repiquage a également permis de renouveler et de changer le milieu en remplaçant l'AIA par de la kinétine.

3.3 Résultats et discussions

3.3.1 Culture *in vitro* de *T. baccata*

Stérilisation des récoltes de *T. baccata*

La figure 3.7 montre que la stérilisation par NaClO est beaucoup plus efficace que celle par H₂O₂. En effet, parmi le matériel végétal stérilisé par H₂O₂ le pourcentage de plants contaminés après 61 jours de culture *in vitro* est de 78% alors que pour le matériel végétal stérilisé par NaClO la contamination n'est que de 16%.

Cependant la procédure de stérilisation par NaClO se révèle être extrêmement agressive pour le végétal. À tel point que le végétal devient inutilisable pour une quelconque étude. La figure 3.8 représente deux plants distincts de *T. baccata*, l'un ayant été stérilisé par NaClO et l'autre par H₂O₂. Le plant stérilisé par NaClO a été complètement brûlé et n'a eu aucune évolution durant la phase d'étude. Le plant stérilisé par H₂O₂, quant à lui n'a pas été brûlé et a subi une évolution interprétable durant la phase d'étude.

Ainsi, même si le traitement par NaClO est plus efficace que celui par H₂O₂, c'est ce dernier qui nous a permis d'étudier la croissance du végétal.

Culture *in vitro* de *T. baccata*

Nous constatons que la variation des concentrations des trois hormones de croissance (kinétine, 2,4-D et AIA) dans le milieu de culture de *T. baccata* a des conséquences sur la croissance du végétal. En effet, les plants dont les milieux de cultures contiennent seulement de la kinétine présentent un fort développement du cal mais un très faible développement aérien. Les plants dont les milieux de culture contiennent de la kinétine ainsi que du 2,4-D ou de l'AIA présentent un développement moyen tant au niveau du cal qu'au niveau des bourgeons. Enfin, les plants dont les milieux de culture contiennent uniquement du 2,4-D ou de l'AIA présentent un très bon développement aérien. Le tableau 3.4 et les photos de la figure 3.10 présentent ces résultats.

Au vu des résultats nous concluons que les effets de la balance auxines-cytokinines dans le milieu de culture des bourgeons de *T. baccata* sont les suivants :

- Les auxines favorisent le développement des bourgeons.
- Les cytokinines favorisent le développement du cal et freinent voire empêchent le développement des bourgeons.

Ces effets sont représentés dans la figure 3.9. Nous pouvons voir que ces effets sont contraires à ceux généralement constatés chez les végétaux (les effets classiques de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse *in vitro* des végétaux sont représentés dans la figure 3.3).

3.3.2 Culture *in vitro* de *T. x media* var. *Hicksii*

Le but des manipulations était de multiplier les plants initiaux de *T. x media* var. *Hicksii*. Au fur et à mesure des repiquages de *T. x media* var. *Hicksii* sur des milieux de culture de composition différentes (voir figure 3.5) nous avons pu suivre qualitativement et en continu les tendances de croissance de *T. x media* var. *Hicksii* en fonction de l'équilibre auxines/cytokinines du milieu. Comme nous pouvions l'imaginer ces tendances de croissance sont les mêmes que celles de *T. baccata*. Cela était d'ailleurs notre hypothèse de travail dans la conduite de l'étude sur *T. x media* var. *Hicksii*.

| milieu de culture | kinétine (1 mg/l) | 2,4-D (1 mg/l) | AIA (1 mg/l) | matériel végétal | méthode de stérilisation du matériel végétal | description du plant après 70 jours de cultures | photo après 70 jours de culture |
|-------------------|-------------------|----------------|--------------|-------------------------------|--|---|---------------------------------|
| WPM 1/2 | oui | non | non | bourgeon de <i>T. baccata</i> | H ₂ O ₂ | Les bourgeons sont petits et bruns à l'extrémité supérieure ; la quantité de cal est importante | figure 3.10c |
| WPM 1/2 | non | oui | non | bourgeon de <i>T. baccata</i> | H ₂ O ₂ | Les bourgeons sont bien développés en hauteur et ils sont bien verts | figure 3.10b |
| WPM 1/2 | oui | oui | non | bourgeon de <i>T. baccata</i> | H ₂ O ₂ | Les bourgeons sont verts mais assez petits avec parfois présence de cal | figure 3.10e |
| WPM 1/2 | non | non | oui | bourgeon de <i>T. baccata</i> | H ₂ O ₂ | Les bourgeons sont très bien développés en hauteur et ils sont bien verts | figure 3.10a |
| WPM 1/2 | oui | non | oui | bourgeon de <i>T. baccata</i> | H ₂ O ₂ | Les bourgeons sont verts mais assez petits avec parfois présence de cal | figure 3.10d |

TABLE 3.4 – Suivi des cultures *in vitro* de *T. baccata*

Ainsi, durant les 10 mois qui ont précédé les manipulations, la population de *T. x media* var. *Hicksii* a bénéficié d'un milieu de culture à base d'AIA propice au bourgeonnement et à la croissance aérienne (voir figure 3.5). Le repiquage de cette population sur un milieu additionné de kinétine a eu un effet négatif sur la croissance de *T. x media* var. *Hicksii* puisqu'il n'a pas promu le développement de bourgeons. De plus, quelques cas de brunissement des plantules ont été observés. La figure 3.12 illustre bien ce phénomène de brunissement qui peut être attribuable au changement brutal de la composition du milieu : la plantule ne s'adapte pas au changement de milieu nutritif, d'où l'apparition de carences.

Au fil des repiquages et de l'observation des cultures nous avons constaté l'apparition de quelques *radicelles* sur le cal. Ces radicelles n'avaient pas été observées auparavant. Leur formation peut avoir pour origine les repiquages successifs qui stimule la *totipotence* des cellules végétales. Un deuxième élément favorable à l'apparition de radicelles est bien-sûr la présence de kinétine dans le milieu de culture qui promeut le développement racinaire des *Taxus*.

Au terme de l'étude toute la population de *T. x media* var. *Hicksii* a été repiquée sur un milieu additionné d'AIA. En effet, ce type de milieu stimule le bourgeonnement du végétal. Bourgeonnement que nous souhaitons maintenir au terme de l'étude afin de continuer la multiplication des plants.

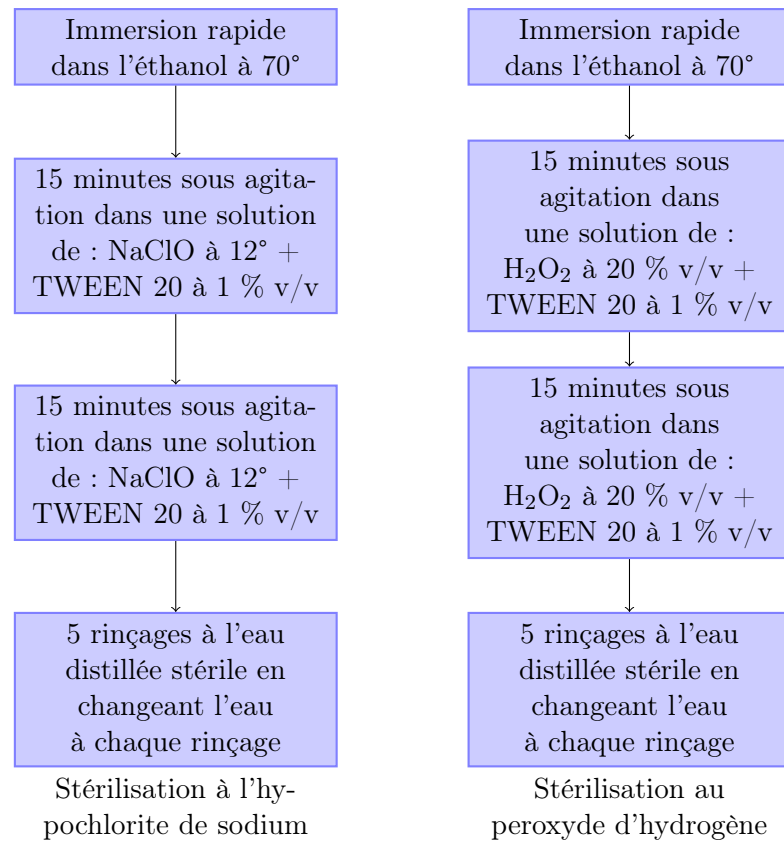
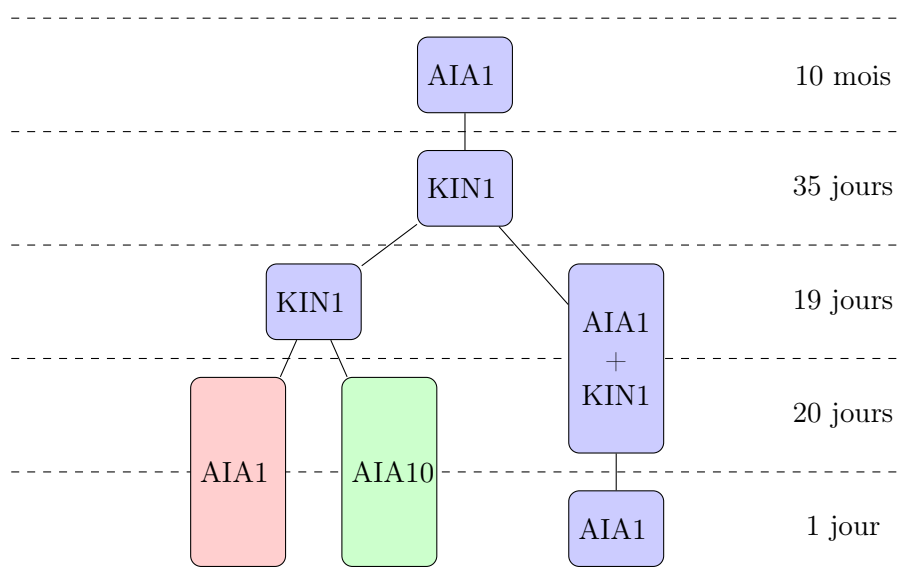


FIGURE 3.4 – Procédures de stérilisation à l'hypochlorite de sodium et au peroxyde d'hydrogène



AIA1 : ajout de 1 mg/l d'acide 3-indolacétique au milieu WPM 1/2
 AIA10 : ajout de 10 mg/l d'acide 3-indolacétique au milieu WPM 1/2
 KIN1 : ajout de 1 mg/l de kinétine au milieu WPM 1/2

bourgeons, plantules et cal
 bourgeons et plantules
 cal

FIGURE 3.5 – Schéma des repiquages de *T. x media* var. *Hicksii*



FIGURE 3.6 – Séparation de la plantule de *T. x media* var. *Hicksii* et de son socle de cal

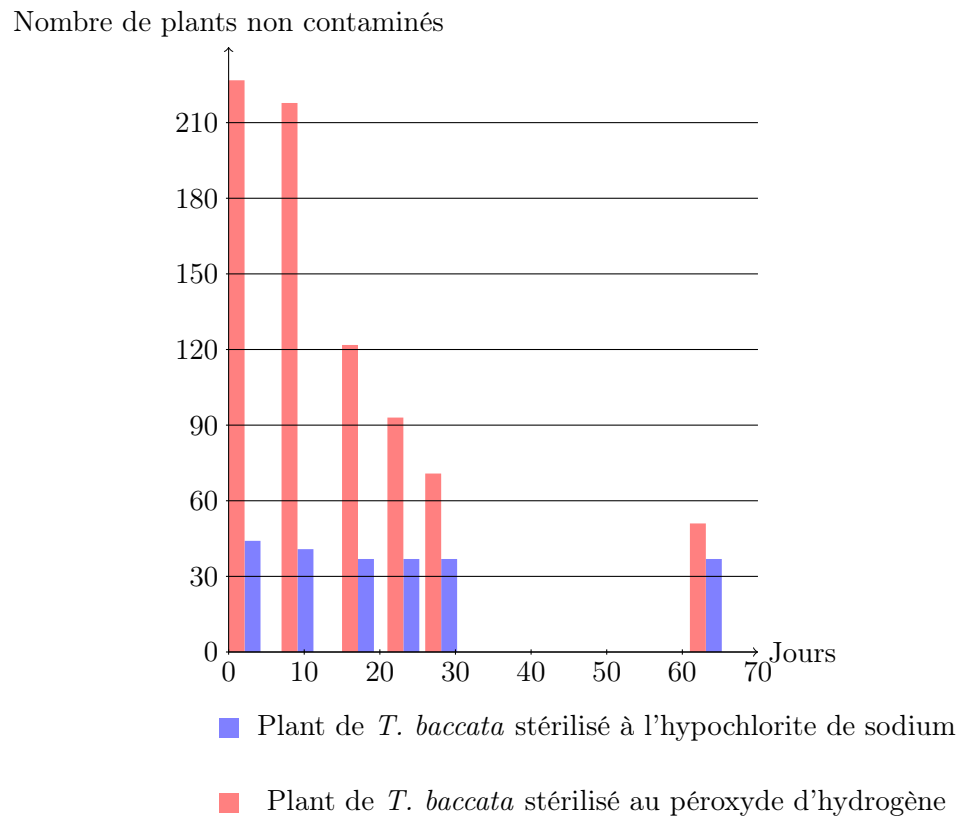


FIGURE 3.7 – Nombre de plants de *T. baccata* non contaminés en culture *in vitro* en fonction du temps



(a) Stérilisation à H_2O_2



(b) Stérilisation à $NaClO$

FIGURE 3.8 – Comparaison des effets de la stérilisation par $NaClO$ et H_2O_2 sur le végétal



FIGURE 3.9 – Effets de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse *in vitro* de *T. baccata*

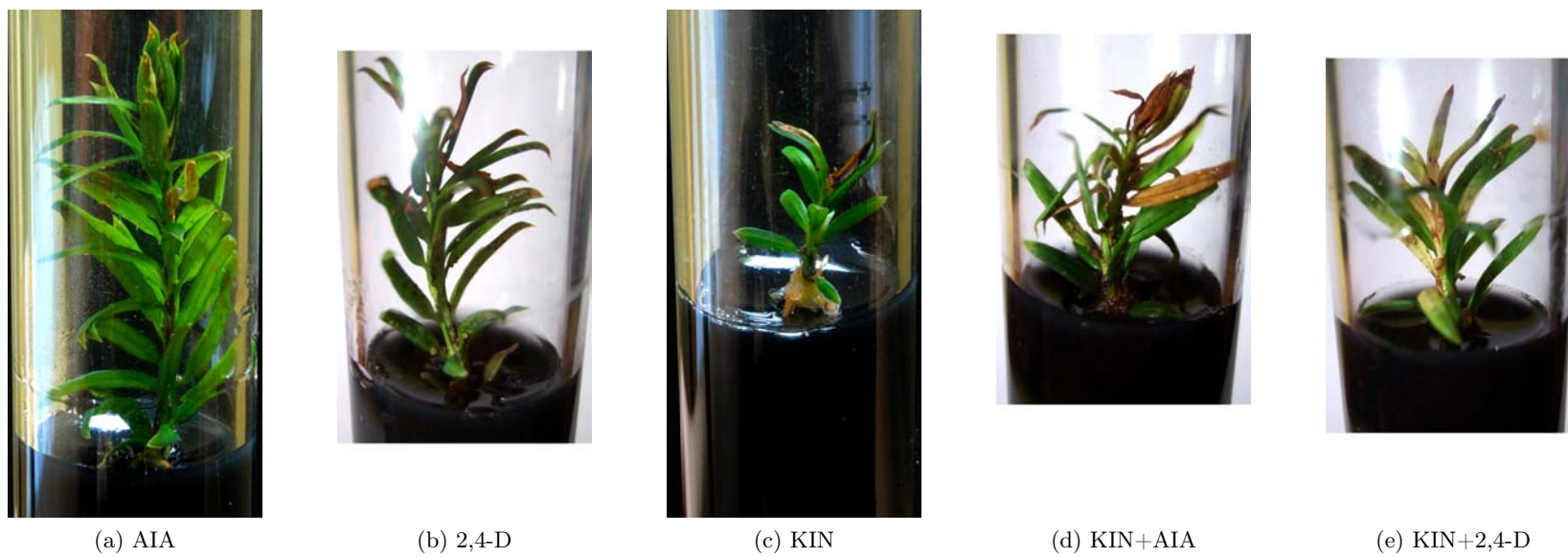


FIGURE 3.10 – Évolution de la croissance de *T. baccata* en fonction de l'ajout de différentes hormones de croissance au milieu WPM 1/2



FIGURE 3.11 – Radicelle de *T. x media* var. *Hicksii*

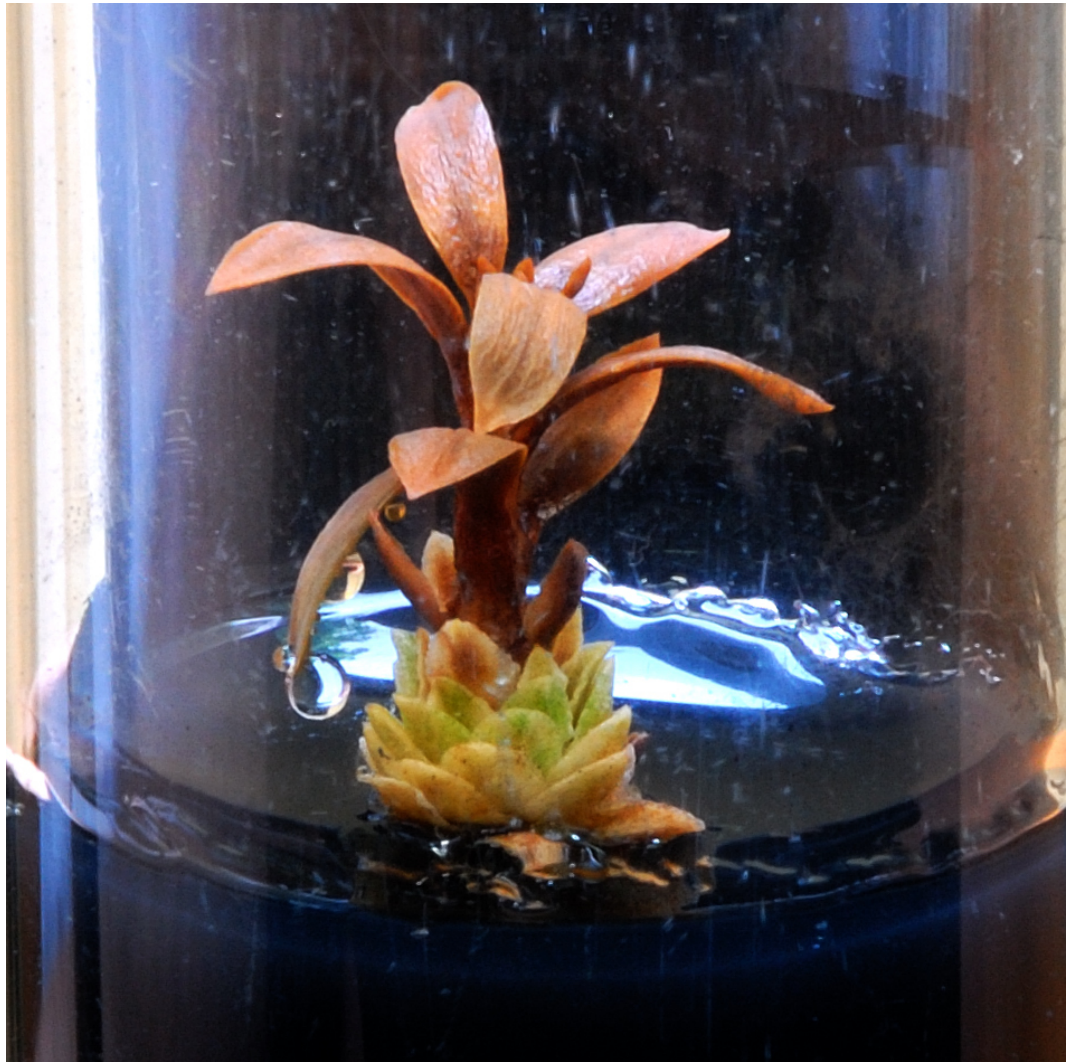


FIGURE 3.12 – Brunissement de *T. x media* var. *Hicksii*

Chapitre 4

Dosage des Taxanes

4.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse le genre *Taxus* renferme des taxanes à l'état naturel dans ses tissus. La première source de paclitaxel reposait d'ailleurs en son extraction direct à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia*. Dans ce chapitre nous allons donc, dans un premier temps, extraire des taxanes à partir de matériel végétal. Et, dans un deuxième temps, nous déterminerons la teneur en taxanes de ce matériel végétal par dosage. Les taxanes que nous allons extraire et doser sont le paclitaxel et la 10-déacétylbaccatine III. Du fait de la très faible quantité de *T. x media* var. *Hicksii* disponible, l'extraction et le dosage des taxanes sont réalisées à partir de branchages de *Taxus baccata* collectés dans la nature. Toutes ces manipulations ont été réalisées par l'auteur sous la direction du Professeur Max HENRY et avec l'aide du Professeur au Laboratoire de Botanique et Mycologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy d'avril à juin 2007

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Extraction des taxanes à partir des tissus végétaux (écorces, aiguilles et tiges)

L'extraction des taxanes a été menée, à quelques détails près, selon la méthode de Vidensek et al. [71]. Le mode opératoire est le suivant :

- Une quantité suffisante de *T. baccata* est récoltée. Les aiguilles, les tiges et les écorces sont séparées et sont conservées séparément dans des paquets de papier filtre.
- Ces trois parties de la plante sont séchées dans une étuve à 60°C jusqu'à obtention d'une masse constante. Un suivi de la masse des aiguilles, des tiges et de l'écorce est assuré par pesée.
- Les tissus secs obtenus en sortie de l'étuve sont broyés séparément à l'aide d'un broyeur électrique à hélices (voir figure 4.1). Le broyage est effectué jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.
- Les poudres d'aiguilles, de tiges et d'écorces obtenues sont conservées séparément dans des paquets de papier filtre.

Extraction liquide/solide

L'étape d'extraction liquide/solide consiste à extraire les métabolites contenus dans la poudre du végétal à l'aide d'un solvant. Le solvant utilisé est le méthanol.



FIGURE 4.1 – Broyage des parties de plantes

- 10 g de poudre d'écorces, d'aiguilles et de tiges sont extraits séparément dans 100 ml de méthanol à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 16h. Les phases liquides sont récupérées par filtration sur papier filtre.
- L'étape précédente est répétée deux fois. Les filtrats issus de l'extraction d'une même partie de plante sont rassemblés.
- Les extraits méthanoliques de tiges, d'écorces et d'aiguilles sont évaporés au Rotavapor® à 40°C.

Etape de pré-purification [55]

L'étape de pré-purification a pour but de faire précipiter les tanins et les substances chlorophylliennes. Chaque résidu est dissous dans 100 ml de méthanol. Une solution aqueuse de 200 ml d'acétate de plomb est réalisée à 10% m/v avec de l'eau distillée. On réalise le mélange de :

- 50 ml d'extrait méthanolique.
- 50 ml d'acétate de plomb.
- 50 ml de méthanol.
- 50 ml d'eau distillée.

L'ajout de la solution d'acétate de plomb est réalisé en dernier. Il se forme un précipité dès l'ajout d'acétate de plomb. On réalise la filtration du mélange sur filtre plissé avec une pompe à vide. Le filtrat est récupéré, le précipité est éliminé.

Extraction liquide/liquide

150 ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2) sont ajoutés à chaque filtrat dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité vigoureusement dans l'ampoule à décanter puis il est laissé à décanter. Une fois les phases aqueuse et organique séparées, on recueille la phase organique et on élimine la phase aqueuse. On note que $\rho_{\text{dichlorométhane}} = 1.325 \text{ kg/l}$ alors que

$\rho_{(\text{eau}+\text{éthanol})} < 1 \text{ kg/l}$, la phase organique se situe donc en dessous de la phase aqueuse.

Le dichlorométhane de chaque phase organique est évaporé au Rotavapor® à 35°C sous une hotte d'extraction de chimie, on obtient un résidu sec dans chaque ballon. Chaque résidu est redissout dans 20 ml de méthanol puis le mélange est transvasé dans un plus petit ballon et évaporé au Rotavapor® à 35°C sous une hotte d'extraction de chimie. On obtient, à nouveau, un résidu sec.

Enfin chaque résidu est dissous dans 1 ml de méthanol puis est filtré à l'aide d'un filtre Millipore Millex®-LCR non stérile de 0.45 μm . Finalement nous obtenons trois solutions méthanoliques de 1 ml pouvant être analysées par CLHP :

- 1 ml d'extrait d'aiguilles de *T. baccata*.
- 1 ml d'extrait d'écorces de *T. baccata*.
- 1 ml d'extrait de tiges de *T. baccata*.

10 μl de chaque extrait d'aiguilles, de tiges et d'écorces sont analysés par chromatographie liquide haute performance.

4.2.2 Analyse des extraits par CLHP

Les analyses par CLHP ont été réalisées sur l'appareil SHIMADZU SPD-10A VP UV. La colonne utilisée est une colonne de silice greffée C18. La détection a été réalisée aux longueurs d'ondes de 210 et 225 nm auxquels la 10-déacétylbaccatine III et le paclitaxel présentent des pics d'absorption. Les volumes d'injection des étalons et des échantillons sont de 10 μl . Avant son utilisation l'appareil CLHP équipé de la colonne a été purgé par un mélange de méthanol et d'eau ultrapure.

Les analyses CLHP ont été réalisées selon deux programmes :

- Premier programme : la phase mobile est un mélange fixe (méthanol : eau) (65 : 35). Le « flow » est fixé à 1.0 ml/min et l'analyse dure 30 minutes afin de permettre la détection de tous les taxanes.
- Deuxième programme : le rapport (méthanol : eau) de la phase mobile évolue selon un gradient pendant l'analyse : évolution d'un rapport méthanol : eau (50 : 50) à un rapport (100 : 0). Le « flow » est fixé à 1.0 ml/min et l'analyse dure 30 minutes afin de permettre la détection de tous les taxanes.

Les composés de référence ont été commandés auprès de la société *Sigma-Aldrich* dans les quantités suivantes : 1 mg de paclitaxel et 1 mg de 10-déacétylbaccatine III. Le paclitaxel et la 10-déacétylbaccatine III sont mis en solution directement dans leur contenant avec 2 ml de méthanol. Les solutions étalons sont donc des solutions méthanoliques de paclitaxel et de 10-déacétylbaccatine III à 0.5 mg/ml.

Les volumes d'injection sont de 10 μl .

4.3 Résultats et discussions

L'analyse des échantillons via le premier programme n'a pas donné de résultats satisfaisants. C'est pourquoi on s'appuie sur les chromatogrammes issus de l'analyse CLHP via le deuxième programme avec une détection à 225 nm. Les chromatogrammes obtenus sont représentés dans les figures 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 et 4.6.

Les chromatogrammes des trois extraits réalisés (extraits d'aiguilles, de tiges et d'écorces) présentent des pics qui correspondent aux pics des chromatogrammes des solutions témoins. Ces pics sont encadrés en vert et sont surlignés en jaune. Le calcul des teneurs des aiguilles, des tiges et des écorces en paclitaxel et en 10-déacétylbaccatine III a été effectué. Les résultats sont représentés dans le tableau 4.1 (les résultats sont donnés en pourcentage du poids sec).

Dans ce tableau nous constatons que les teneurs les plus importantes sont celles en 10-déacétylbaccatine III ce qui est cohérent avec la littérature. Les teneurs en paclitaxel sont

| | 10-déacétylbaccatine III | paclitaxel |
|----------|--------------------------|------------|
| Aiguille | 0.016 | 0.009 |
| Tige | 0.012 | 0.006 |
| Écorce | 0.008 | 0.005 |

TABLE 4.1 – Teneur de *T. baccata* en paclitaxel et en 10-déacétylbaccatine III (en % massique du poids sec)

relativement élevées par rapport à celles de la littérature [71] mais restent d'un ordre de grandeur cohérent. Nous remarquons également que les aiguilles présentent les plus fortes teneurs en taxanes ce qui est inattendu par rapport à la littérature. Si nous extrapolons ces résultats nous pouvons déterminer qu'à partir de 10 kg d'aiguilles sèches nous obtenons 0.9 g de paclitaxel. Ce résultat est cohérent en terme d'ordre de grandeur avec celui énoncé pour l'if du pacifique dans la première partie de cette thèse. L'if du pacifique dont il faut 10 kg d'écorce sèche pour produire 1 g de paclitaxel.

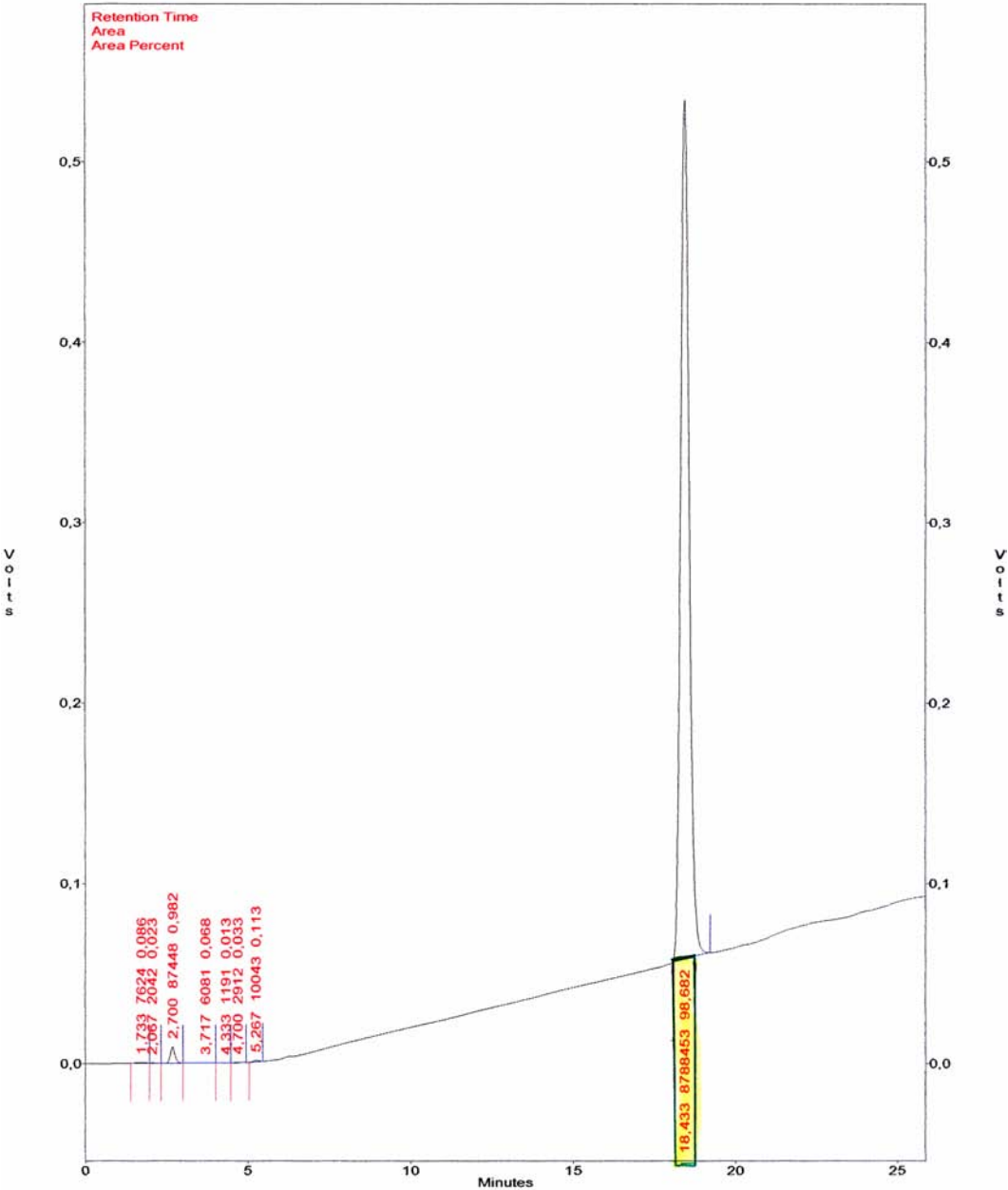


FIGURE 4.2 – Échantillon étalon paclitaxel

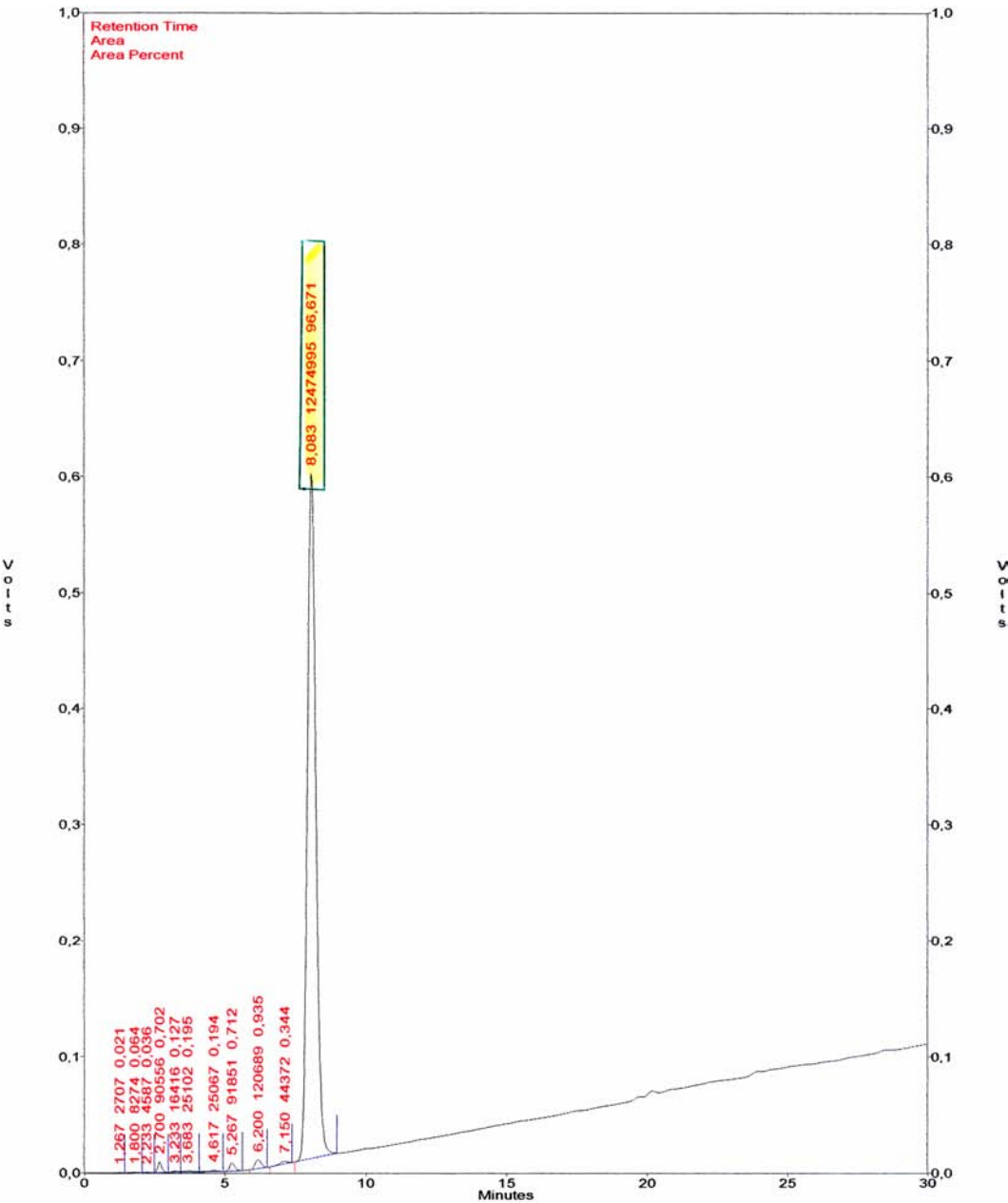


FIGURE 4.3 – Échantillon étalon de 10-déacétylbaccatine III

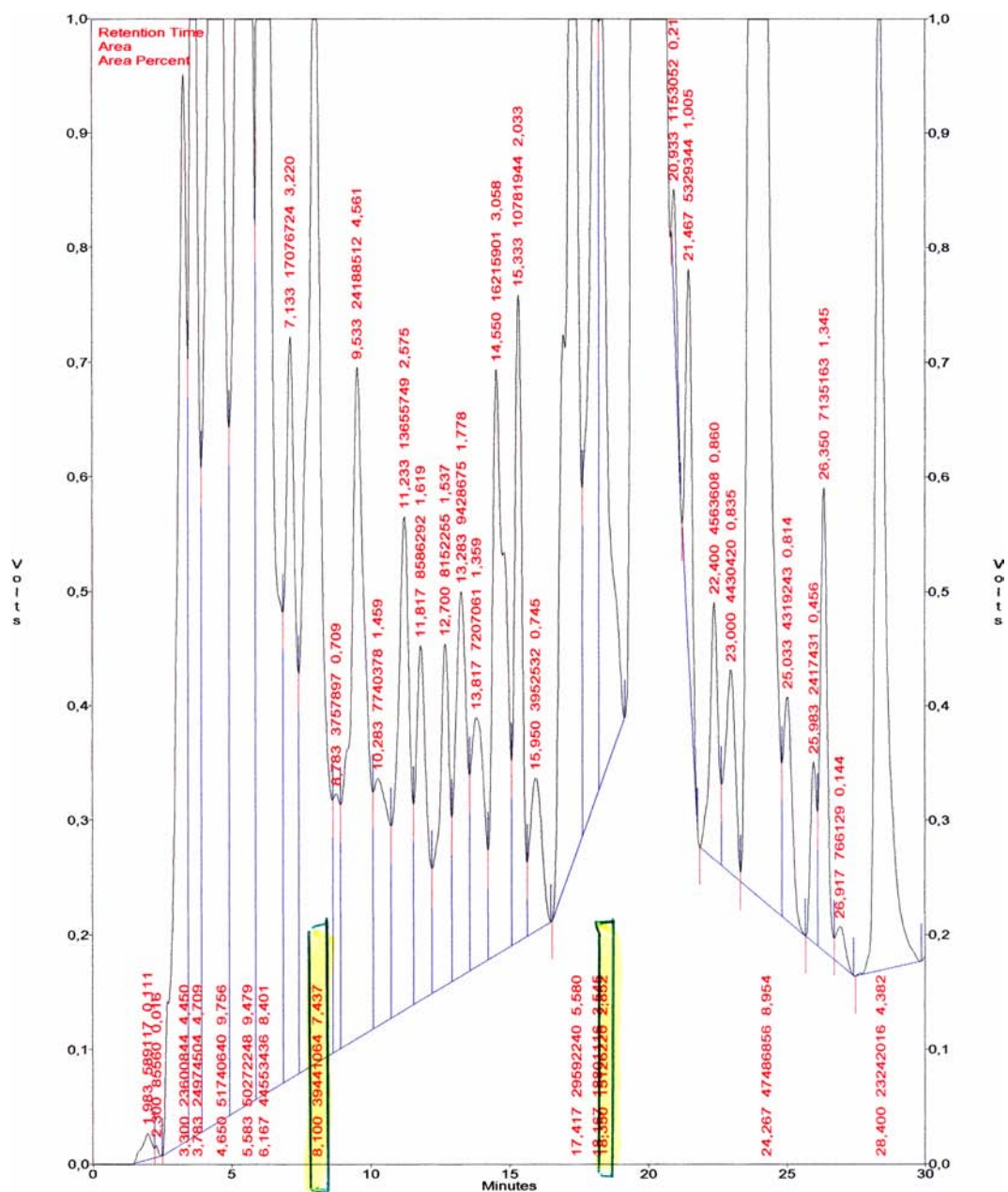


FIGURE 4.4 – Échantillon d'aiguilles

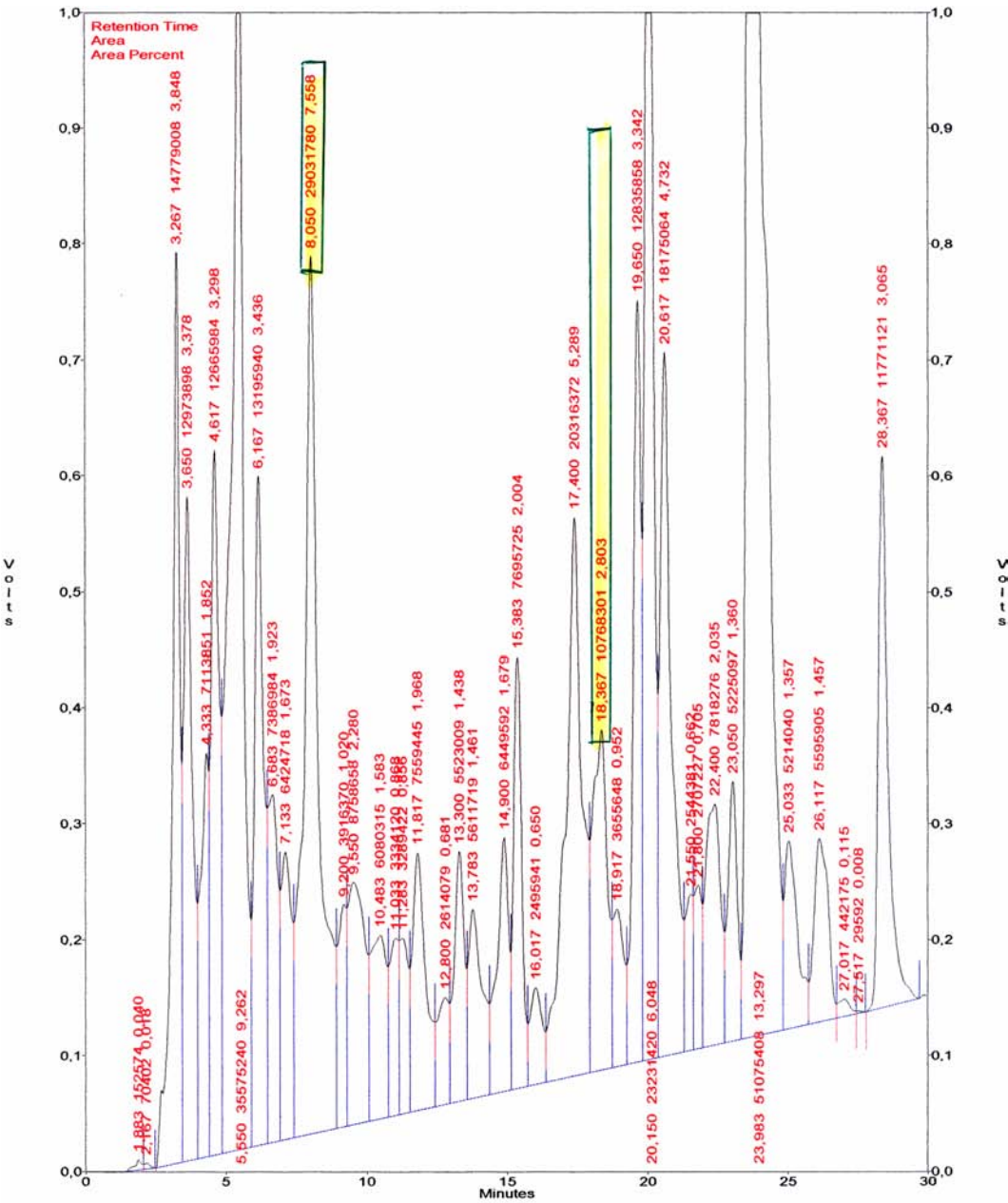


FIGURE 4.5 – Échantillon de tiges

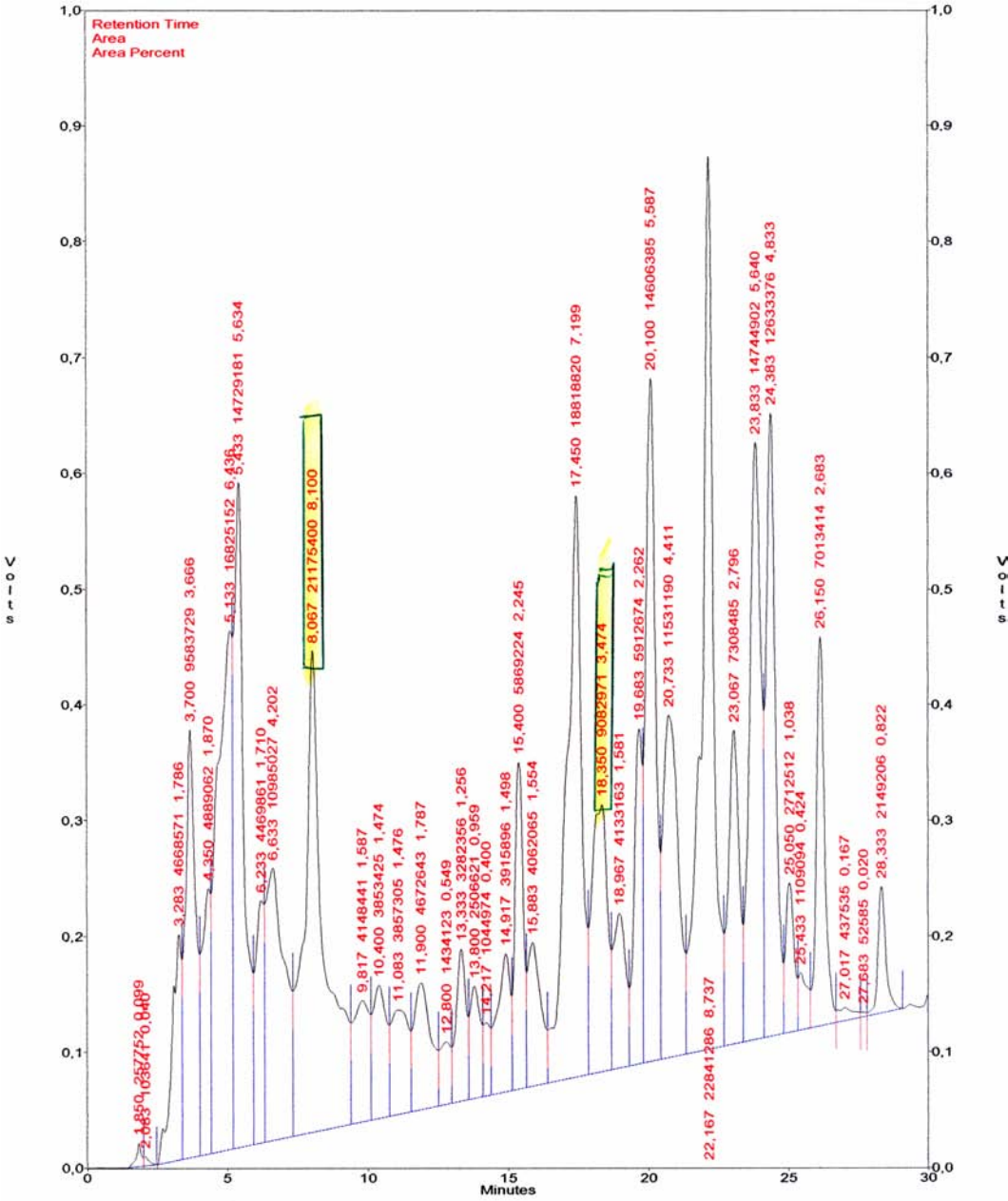


FIGURE 4.6 – Échantillon d'écorces

Conclusion générale

Dans cette thèse, nous avons abordé tour à tour de nombreuses propriétés du genre *Taxus* pour finir par la description de manipulations pratiques : l'extraction et le dosage des taxanes. Ainsi, j'espère vous avoir convaincu de l'intérêt du genre *Taxus* qui est extrêmement représenté dans nos régions par *Taxus baccata*. Dorénavant, vous saurez identifier au premier regard cette espèce. Au printemps vous reconnaîtrez les pieds mâles et leur rameaux portant les strobiles polliniques prêts à libérer le pollen qui se disséminera par le vent pour féconder les ovules et entraîner la formation des arilles. Arilles qui habillent les pieds femelles tout l'automne de leurs touches écarlates.

À partir de *Taxus baccata* nous avons remonté la piste de l'extraction du dosage du paclitaxel qui a été la première source d'obtention de ce composé avec l'écorce de *Taxus brevifolia* allant jusqu'à retrouver des teneurs cohérentes avec les données historiques (10 kg de matière végétale produisent 1 g de paclitaxel). Paclitaxel, qui, comme nous l'avons vu, est à l'origine du Taxol® et forme, avec le Taxotère®, la classe pharmaceutique des taxanes.

Aujourd'hui, la recherche reste très active autour des taxanes : isolement de nouveaux composés chimiques, extraction des taxanes chez différentes espèces, optimisation de la production des taxanes par culture cellulaire, études de l'association du Taxol® ou du Taxotère® avec d'autres anticancéreux dans la lutte contre la maladie... 40 ans après la découverte des propriétés cytotoxiques de l'if du pacifique, le genre *Taxus* n'a pas fini de livrer ses secrets. Il demeure une source d'inspiration pour les chercheurs dans la découverte de nouveaux composés d'origine naturelle ainsi que dans le développement de la production de molécules d'intérêt par culture cellulaire car l'obtention du paclitaxel par les biotechnologies reste une prouesse que les scientifiques cherchent à transposer à d'autres composés.

Bibliographie

- [1] Deux ours empoisonnés à Nancy. *L'Est Républicain*, 2000.
- [2] M. T. Adeline, X. P. Wang, C. Poupat, A. Ahond, and P. Potier. Evaluation of taxoids from *Taxus sp.* crude extracts by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20(19) :3135–3145, 1997.
- [3] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *L'essentiel de la biologie cellulaire*. Flammarion Médecine-Sciences, PARIS, 1^{re} édition, 1999.
- [4] C. L. Alden, C. J. Fosnaugh, J. B. Smith, and R. Mohan. Japanese yew poisoning of large domestic animals in the midwest. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(3) :314–316, 1977.
- [5] G. Alloati, C. Penna, R. C. Levi, M. P. Gallo, G. Appendino, and I. Fenoglio. Effects of yew alkaloids and related compounds on guinea-pig isolated perfused heart and papillary muscle. *Life Sciences*, 58(10) :845–854, 1996.
- [6] E. Anderson and J. N. Owens. Analysing the reproductive biology of *Taxus* : should it be included in Coniferales? *Acta Horticulturae*, 615 :233–234, 2003.
- [7] G. Appendino. The phytochemistry of the yew tree. *Natural Product Reports*, 12(4) :349–360, 1995.
- [8] Giovanni Appendino and S. William Pelletier. Chapter Two Taxine. In *Alkaloids : Chemical and Biological Perspectives*, volume 11, pages 237–268. Pergamon, 1996.
- [9] V. R. Bauereis and W. Steiert. Pharmakologische eigenschaften von taxin A und B. *Arzneimittel forschum*, 9 :77–79, 1959.
- [10] J. N. Baxter, B. Lythgoe, B. Schahes, Trippet S., and B. K. Blount. Taxine I, The major alkaloids of the yew, *Taxus baccata* L. *Proceedings of the Chemical Society*, 1958.
- [11] V. Bernades-Genisson, J. Bernadou, J. Berque-Bestel, J.D. Brion, J. Couquelet, M. Cussac, M. Debaert, O. Duval, S. Giorgi-Renault, J. Huet, R. Lacroix, J. Laronze, J.Y. Laronze, G. Le Baut, P. Loiseau, A. Nuhrich, M. Plat, J. Poisson, S. Robert-Piessard, C. Tournaire-Arellano, P. Uriac, and M. Varache-Lembege. *Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers*. Traité de chimie thérapeutique. Tec & Doc, Paris, 1^{re} édition, 2003.
- [12] M. V. Blagosklonny, T. Schulte, P. Nguyen, J. Trepel, and L. M. Neckers. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Research*, 56(8) :1851–1854, 1996.
- [13] A. W. Blyth. *Poisons : Their Effects and Detection*. C. Griffin, London, 1920.
- [14] Gaston Bonnier and Robert Douin. *La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier*. Belin, Paris, 1990.
- [15] T. Bryan-Brown. The pharmacological actions of taxine. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 :205–219, 1932.

- [16] Pierre Bulliard. *Herbier de la France ou collection complète des plantes indigènes de ce royaume ; avec leurs détails anatomiques, leurs propriétés, et leurs usages en médecine*. Didot le jeune, Debure et Belin, 1780.
- [17] Julius Caesar. *De Bello Gallico*. XXXI.
- [18] A. Y. Chang, K. Kim, J. Glick, T. Anderson, D. Karp, and D. Johnson. Phase II study of taxol, merbarone, and piroxantrone in stage IV non- small-cell lung cancer : The Eastern Cooperative Oncology Group Results. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(5) :388–394, 1993.
- [19] M. W. Chase. Phylogenetics of seed plants, an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri botanical garden*, 80 :528–580, 1993.
- [20] L. K. Fu Cheng and Cheng C. Y. Gymnospermae Sinicae. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 13(4) :56–89, 1994.
- [21] L. K. Fu Cheng, Cheng C. Y., and C. D. Chu. *Gymnospermae*, volume 7 of *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Kexue Chubanshe, Pékin, 1987.
- [22] A. Chistie. *A Pocket Full of Rye*. Collins Crime Club, 1^{re} edition, 1953.
- [23] E. A. Cope. The yew in cultivation. *Bulletin of the American Conifer Society*, 8 :241–250, 1991.
- [24] Edward Cope. Taxaceae : The genera and cultivated species. *The Botanical Review*, 64(4) :291–322, 1998.
- [25] S. J. Danishefsky, J. J. Masters, W. B. Young, J. T. Link, L. B. Snyder, T. V. Magee, D. K. Jung, R. C. A. Isaacs, W. G. Bornmann, C. A. Alaimo, C. A. Coburn, and M. J. Di Grandi. Total synthesis of baccatin III and taxol. *Journal of the American Chemical Society*, 118(12) :2843–2859, 1996.
- [26] A. I. Einzig, H. Hochster, P. H. Wiernik, D. L. Trump, J. P. Dutcher, E. Garowski, J. Sasloff, and T. J. Smith. A phase II study of taxol in patients with malignant melanoma. *Investigational New Drugs*, 9(1) :59–64, 1991.
- [27] L. Ettouati, A. Ahond, C. Poupat, and P. Potier. Révision Structurale de la Taxine B, Alcaloïde Majoritaire des Feuilles de l’If d’Europe, *Taxus baccata*. *Journal of Natural Products*, 54(5) :1173–1465, 1991.
- [28] J. Fisherman, M. McCabe, M. Hillig, B. Goldspiel, K. H. Cowan, and J. A. O’Shaughnessy. Phase I study of taxol and doxorubicin with G-CSF in previously untreated metastatic breast cancer. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 11 :57, 1992.
- [29] S. Foster and J. A. Duke. *A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs : Of Eastern and Central North America*. Houghton Mifflin Harcourt, 1^{re} edition, 1990.
- [30] D. Fröhne and J. Pfänder. *A Colour Atlas of Poisonous Plants*. 2^e edition, 1984.
- [31] E. Graf. Zur chemie des taxins. *Angewandte Chemie*, 68 :249–250, 1956.
- [32] E. Graf and H. Bertholdt. Das amorphe taxin und das kristallisierte taxin A. *Pharmazeutische Zentralhalle*, 96 :385–395, 1957.
- [33] E. Graf, A. Kinkel, G. J. Wolff, and E. Breitmaier. Die Aufklärung von taxin A aus *Taxus baccata* L. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1982(2) :376–381, 1982.
- [34] E. Graf, S. Weinandy, B. Koch, and E. Breitmaier. ¹³C-NMR-Untersuchung von taxin B aus *Taxus baccata* L. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1986(7) :1147–1151, 1986.
- [35] F. Gueritte-Voegelein, B. Senilh, V. and David, D. Guenard, and P. Potier. Chemical studies of 10-deacetyl baccatin III : hemisynthesis of taxol derivatives. *Tetrahedron*, 42(16) :4451–4460, 1986.

- [36] Harold. R. Jr. Hartzell. Chapter Two Yew and us : A brief history of the yew tree. In Matthew Suffness, editor, *Taxol : Science and Applications*. CRC-Press, 1^{re} edition, 1995.
- [37] L. He, P. G. Jagtap, D. G. Kingston, H. J. Shen, G. A. Orr, and S. B. Horwitz. A common pharmacophore for Taxol and the epothilones based on the biological activity of a taxane molecule lacking a C-13 side chain. *Biochemistry*, 39(14) :3972–3978, 2000.
- [38] N. A. Heywood, D. H. Burges, S. M. Valentine, and D. A. Webb Walters. *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge, 1964.
- [39] H. Hitokawa and K-H. Lee. *Taxus : The Genus Taxus*. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles. Taylor & Francis, London New York, 1^{re} edition, 2003.
- [40] F. A. Holmes, R. S. Walters, R. L. Theriault, A. D. Forman, L. K. Newton, M. N. Raber, A. U. Buzdar, D. K. Frye, and G. N. Hortobagyi. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(24) :1797–1805, 1991.
- [41] R. A. Holton, H. B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile, and J. H. Liu. First total synthesis of taxol. 2. Complication of the C and D rings. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4) :1599–1600, 1994.
- [42] R. A. Holton, C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile, and J. H. Liu. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4) :1597–1598, 1994.
- [43] Homère. *L'Illiade*. XIII.
- [44] S. Y. Hu. Notes on the flora of China IV. *Taiwania*, 10 :13–62, 1964.
- [45] A. P. Jarvis and E. D. Morgan. Isolation of plant products by supercritical-fluid extraction. *Phytochemical Analysis*, 8(5) :217–222, 1997.
- [46] L. H. D. Jenniskens, E. L. M. van Rozendaal, and T. A. van Beek. Identification of six taxine alkaloids from *Taxus baccata* needles. *Journal of Natural Products*, 59 :117–123, 1996.
- [47] I. Jones and E. V. Lynn. Differences in species of *Taxus*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 22 :528–531, 1933.
- [48] Jin Woong Kim, Young Hae Choi, Ki Pung Yoo, Min Jeong Noh, and Joo Hee Han. Method and apparatus for preparing Taxol using supercritical fluid from source materials, 2001.
- [49] G. Krussman. *Manual of Cultivated Conifers*. Timber Press, Londres, 1^{re} edition, 1985.
- [50] Anjali Abhay Kulkarni. *Micropropagation and secondary metabolite studies in Taxus spp. and Withania somnifera (L.) Dunal*. PhD thesis, University of Pune, 2000.
- [51] Y. Li, B. Poliks, L. Cegelski, M. Poliks, Z. Gryczynski, G. Piszczek, P. G. Jagtap, D. R. Studelska, D. G. I. Kingston, J. Schaefer, and S. Bane. Conformation of microtubule-bound paclitaxel determined by fluorescence spectroscopy and REDOR NMR. *Biochemistry*, 39(2) :281–291, 2000.
- [52] H. Lucas. Ueber ein in den Blätter von *Taxus baccata* L. enthaltenes Alkaloid (das Taxin). *Biochemistry*, (135) :145–149, 1856.
- [53] J. J. Manfredi and S. B. Horwitz. Taxol : An antimitotic agent with a new mechanism of action. *Pharmacology and Therapeutics*, 25(1) :83–125, 1984.

- [54] K. Morihira, R. Hara, S. Kawahara, T. Nishimori, N. Nakamura, H. Kusama, and I. Kuwajima. Enantioselective total synthesis of taxol [13]. *Journal of the American Chemical Society*, 120(49) :12980–12981, 1998.
- [55] T. Mroczek, K. Glowniak, and M. Hajnos. Screening for pharmaceutically important taxoids in *Taxus baccata* var. *Aurea* corr. with CC/SPE/HPLC-PDA procedure. *Bio-medical Chromatography*, 14(8) :516–529, 2000.
- [56] K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, and K. Paulvannan. Total synthesis of taxol. *Nature*, 367(6464) :630–4, 1994.
- [57] R. T. Nicolosi and R. D. Lineberger. Differences of *Taxus* species and selected cultivars based on leaf and pollen surface characters. *HortScience*, 17 :5210, 1982.
- [58] H. Poujol, A. Ahond, A. A. Mourabit, A. Chiaroni, C. Poupat, C. Riche, and P. Potier. Taxoïdes : nouveaux analogues du 7-déshydroxydocétaxel préparés à partir des alcaloïdes de l’if . *Tetrahedron*, 53(14) :5169–5184, 1997.
- [59] C. Poupat, A. Ahond, and P. Potier. Nouveau taxoïde basique isolé des feuilles d’if, *Taxus baccata* : La 2-désacétyltaxine A . *Journal of Natural Products*, 57(10) :1468–1469, 1994.
- [60] R. A. Price. Generic and familial relationships of the Taxaceae from *rbcL* and *matK* sequence comparisons. *Acta Horticulturae*, 615 :235–237, 2004.
- [61] B. S. Reichman, A. D. Seidman, and J. P. Crown. Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 83 :1797–1805, 1993.
- [62] Shakespeare. *Richard II*. 1595.
- [63] I. Shiina, K. Saitoh, I. Fréchar-d-Ortuno, and T. Mukaiyama. Total asymmetric synthesis of taxol by dehydration condensation between 7-TES baccatin III and protected N-benzoylphenylisoserines prepared by enantioselective aldol reaction. *Chemistry Letters*, 27(1) :3–4, 1998.
- [64] L. E. Sinn and J. F. Porterfield. Fatal taxine poisoning from yew leaf ingestion. *Journal of Forensic Sciences*, 36(2) :599–601, 1991.
- [65] J. R. Smythies, F. Benington, R. D. Morin, G. Al-Zahid, and G. Schoepfle. The action of the alkaloids from yew (*Taxus baccata*) on the action potential in the xenopus medullated axon. *Experientia*, 31 :337–338, 1975.
- [66] H. Tabata. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, volume 87, pages 1–23. Springer, Berlin, 2004.
- [67] Y. Tekol and B. Göğüsten. Comparative determination of the cardioselectivity of taxine and verapamil in the isolated aorta, atrium and jejunum preparations of rabbits. *Arzneimittel-Forschung*, 49(8) :673–678, 1999.
- [68] Y. Tekol and M. Kameyama. Elektrophysiologische Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Eibentoxins Taxin auf das Herz = Etudes électrophysiologiques sur le mécanisme d’action de la toxine de la Taxine, sur le coeur=Electrophysiological studies of the mechanism of action of the yew toxin Taxine on the heart. *Arzneimittel-Forschung*, 37(4) :428–431, 1987.
- [69] Otto Wilhelm Thomé. *Flora von Deutschland Österreich, und der Schweiz*. Gera-Untermhaus, 1885.
- [70] G. Utard. L’ours réintroduit à Nancy. *L’Est Républicain*, 2008.
- [71] N. Vidensek, P. Lim, A. Campbell, and C. Carlson. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *Journal of Natural Products*, 53(6) :1609–1610, 1990.

- [72] Virgil. *Bucolica*. -37.
- [73] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9) :2325–7, 1971.
- [74] J. M. Watt and M. G. Breyer-Brandwijk. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. E. & S. Livingstone, Édimbourg, 2^e edition, 1962.
- [75] P. A. Wender, N. F. Badham, S. P. Conway, P. E. Floreancig, T. E. Glass, J. B. Houze, N. E. Krauss, D. Lee, D. G. Marquess, P. L. McGrane, W. Meng, M. G. Natchus, A. J. Shuker, J. C. Sutton, and R. E. Taylor. The pinene path to taxanes. 6. A concise stereocontrolled synthesis of taxol. *Journal of the American Chemical Society*, 119(11) :2757–2758, 1997.
- [76] C. R. Wilson, J. M. Sauer, and S. B. Hooser. Taxines : A review of the mechanism and toxicity of yew (*Taxus spp.*) alkaloids. *Toxicon*, 39(2-3) :175–185, 2000.
- [77] Y. Z. Xi. Studies on pollen morphology of *Taxaceae* of China. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 24(4) :243–252, 1986.
- [78] Tao Yang, Fu-De Cui, Min-Koo Choi, Jei-Won Cho, Suk-Jae Chung, Chang-Koo Shim, and Dae-Duk Kim. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel : *in vitro* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 338(1-2) :317–326, 2007.
- [79] Jean-Pierre Zrýd. *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 1^{re} edition, 1988.

Annexe A

Monroe E. Wall (1916-2002)

Monroe Wall a grandi à Newark, New Jersey et a fait ses études à l'université de Rutgers où il obtient son doctorat. Il rejoint l' *U.S Department of Agriculture (USDA)* en 1941, où il recherche des alternatives naturelles à des produits essentiels à l'effort de guerre comme le rubber. Durant les années 50 ses recherches consistent à recueillir des milliers d'extraits de plantes afin de rechercher des phyto-stéroïdes utilisables comme précurseurs dans l'hémisynthèse de la cortisone. En 1957, la visite à l'USDA de Jonathan Hartwell, docteur en médecine et pionnier du *National Cancer Institute (NCI)*, va bouleverser la carrière de Monroe Wall. Le docteur Hartwell convainc le docteur Wall de lui envoyer 1000 extraits éthanoliques de plantes afin d'en tester l'activité antitumorale. En 1958 un extrait de *Camptotheca acuminata* se révèle être particulièrement prometteur.

Le docteur Wall n'a que peu de temps pour exploiter cette découverte car il est rapidement recruté par le *Research Triangle Institute (RTI)* afin d'y établir un groupe et un programme de recherche sur la chimie des substances naturelles. Dans ce nouvel institut, son laboratoire est à la pointe dans l'isolement des substances naturelles. Dans les années 70 il est l'un des premiers à utiliser la spectrométrie de masse et la RMN pour déterminer les structures des substances qu'il a isolées.

Le programme de recherche du docteur Wall sur les substances naturelles n'est pas en fonctionnement depuis longtemps lorsqu'on lui apporte ses premiers échantillons de feuilles, de tiges et d'écorces de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) en 1964. Lui et le docteur Mansukh Wani ont trouvé et ont isolé une substance active de l'arbre que le docteur Wall appellera *Taxol*. Les deux scientifiques publient la structure chimique du Taxol en 1971 et ils cèdent rapidement tous leurs documents de travail à leur employeur gouvernemental : le NCI.

Durant la même période, le docteur Wall produit un sel de sodium de la *camptothecine*, ce qui améliore sa solubilité et lui permet de passer en essais cliniques de phase I. Cette substance ne passa pas en essai clinique de phase II à cause de sa toxicité et de sa faible solubilité. Cependant ce composé continua à susciter l'intérêt du fait de son activité contre la *topoisomérase I*.

En 2000 les docteurs Wall et Wani remportent le *Prix Charles F. Kettering* qui est la plus grande distinction dans le domaine de la recherche contre le cancer. Parmi les autres distinctions reçues par le docteur Wall on compte : le *Department of Agriculture's Superior Accomplishment Award*, l'*American Pharmaceutical Association's top research prize for natural products chemistry* et l'*American Society of Pharmacognosy's Research Achievement Award*. En 1998, il reçoit l'*American Chemical Society's Alfred Burger Award* qui est la récompense la plus prestigieuse dans le domaine de la chimie appliquée à la médecine.

Pour Victoria F. Haynes présidente du RTI, « Monroe Wall était l'un des employés fondateurs de l'institut et l'un des plus remarquables. À travers les travaux de sa carrière, tels

que ceux réalisés sur le Taxol et sur d'autres molécules, il contribua de manière substantielle à l'amélioration de la condition humaine ».

C. Edgar Cook, qui travailla avec les docteurs Wall et Wani sur la camptothecine et qui dirigea par la suite l'unité de chimie et des sciences de la vie du RTI fondée par le docteur Wall décrit la « Monroe Doctrine » comme la base du succès du docteur Wall : « Réunissez des personnes de qualité, apportez leur des infrastructures de qualité, faites de la recherche de qualité, travaillez dur et continuez ».

La vie du docteur Wall était dédiée à son travail et il était présent chaque jour à son laboratoire jusqu'à deux semaines avant sa mort.

Annexe B

Mansukh C. Wani

Mansukh Wani a grandi à Nandurbar (Maharasta, Inde) et a reçu son master à l'université de Bombay. Il vient aux États Unis en 1958 et obtient un doctorat en chimie à l'université de l'Indiana, où il travaille avec le Professeur Ernest Campaign. Après un post doctorat à l'Université du Wisconsin-Madison il accepte un poste au *Research Triangle Institute (RTI)* (Caroline du Nord) en septembre 1962.

Les premiers travaux du docteur Wani au RTI concernent le domaine de la photochimie organique qu'il effectue dans le récent laboratoire fondé par le docteur Monroe Wall : le laboratoire des produit naturels. À cette époque le docteur Wall cherchait à caractériser la camptothecine mais la détermination de sa structure se révèle être difficile. Vers la fin de l'année 1963 le docteur Wall demande au docteur Wani de rejoindre son équipe de travail sur la camptothecine. Le docteur Wall avait entendu parler des compétences du docteur Wani à travailler avec de faibles quantités de composés sensibles à la lumière. Très rapidement après cela et grâce à l'expertise du docteur Wani l'équipe a été capable de préparer des échantillons de camptothecine pour une analyse cristallographiques au rayons X.

Du fait des accords du docteur Wall avec le NCI, son laboratoire reçoit continuellement des produits naturels à tester et à caractériser. À la fin de l'été 1962 le botaniste Athur Barclay de l'*U.S. Department of Agriculture* récolte des échantillons de *Taxus brevifolia*. Un screening initial a montré qu'un composé issu de ces échantillons à une activité cytotoxique très élevée, si élevée que certains laboratoires ont préféré ne pas travailler dessus. Le docteur Wall dit au docteur Jonathan Hartwell que son laboratoire se chargerait de ces échantillons.

Après le fractionnement, le composé, maintenant appelé Taxol®, est envoyé au docteur Wani afin d'en établir la structure. Lors d'une interview du docteur Wani, celui-ci raconte comment cela s'est passé :

Nous avons travaillé sur la structure durant les année 1965 et 1966, mais il était très difficile de la déterminer et nous n'y parvenions pas. Durant le courant de l'année 1967, Monroe m'appela dans son bureau pour en discuter. Nous décidâmes alors que nous avions tellement de choses à faire que nous devrions peut être laisser tomber le Taxol.

J'avoue que je n'ai pas pu abandonner. J'ai continué à travailler dessus mais il fallait que ce soit vraiment marginal. Je m'y intéressais le week-end ainsi qu'à d'autres moments particuliers. J'ai été très intéressé lorsque j'ai entendu parlé d'une technique consistant à casser les molécules en plusieurs constituants pour en déterminer les structures séparément et ensuite recomposer la molécule de départ. J'en ai discuté avec un collègue et nous avons pris un échantillon de Taxol auquel nous avons ajouté de l'éthanol et du sodium. Puis j'ai mis l'erlenmeyer au réfrigérateur et je l'ai oublié. Ce n'est que 10 jours après que

je m'en suis souvenu et lorsque je l'ai examiné je me suis aperçu que le Taxol avait été cassé en deux composés majeurs. À ce moment j'ai pu déterminer leur structure séparément et reconstituer la molécule de Taxol. En 1971 nous publions et nous envoyons le Taxol au NCI pour son développement.

Nous pouvons dire que sans un peu d'un heureux hasard et beaucoup de persévérance le Taxol® aurait pu ne jamais voir le jour. La recherche contre le cancer doit beaucoup à la ténacité du docteur Wani : pour son travail sur la camptothécine et sur le Taxol® il partagea en 2000 avec Monroe Wall le Prix *Charles F. Kettering*. Parmi ses nombreuses autres distinctions le docteur Wani se vit recevoir : le *Bruce F. Cain Memorial Award of the American Association for Cancer Research* en 1994 et la même année le *City of Medicine Award*. En 1996, il reçoit le *NCI Award of Recognition* et en 2003 l'université de l'Indiana lui accorde son *Alumni Award*.

Le docteur Wani travaille toujours au RTI, mais aujourd'hui son rôle principal est d'assurer la supervision et l'encadrement des jeunes chercheurs. Afin d'assurer que le genre de dévouement et de persévérance dont a fait preuve le docteur Wani soit transmis aux générations suivantes le RTI a annoncé la mise en place du programme Monroe E. Wall et Mansukh C. Wani dans la recherche sur les produits naturels. Leurs années de dur travail et de détermination ont payé, non seulement par les nombreuses vies sauvées aujourd'hui mais également dans la vision qu'ils ont inspiré à la communauté scientifique.

Annexe C

Rédiger un document sous L^AT_EX

Arrivé ici vous vous demandez sûrement ce qu'est L^AT_EX et ce que vient faire une telle annexe dans ma thèse. La réponse est bien entendu très simple et en répondant à la première interrogation, la deuxième s'en trouvera également éclairée. L^AT_EX est le programme avec lequel j'ai rédigé cette thèse car il est une alternative aux logiciels de traitement de texte comme *Word*.

Ici, tout a été fait sous L^AT_EX. Mais pourquoi ? Et bien tout simplement, et j'espère que vous l'aurez remarqué, pour que ce document soit bien présenté, agréable à lire et surtout pour me faciliter la vie : avec L^AT_EX pas de titres qui disparaissent, pas de texte ou d'images qui se perdent sans raison apparente dans un recoin de votre document. Avec L^AT_EX tout est clair, sûr et une fois une partie de votre travail rédigée vous pouvez passer sereinement à la prochaine sans craindre une quelconque catastrophe typographique d'origine inconnue. Car L^AT_EX s'occupe de tout pour vous : avec lui vous pouvez vous focaliser sur le contenu de votre travail. L^AT_EX s'occupera, pour vous, de la mise en forme de votre document : table des matières, légendes, liste des tableaux, références, gestion de la bibliographie et j'en passe...

Or j'ai remarqué que L^AT_EX est (presque) inconnu parmi les étudiants de pharmacie et de médecine alors qu'il leur rendrait d'immenses services dans la rédaction de leur thèse. En effet la rédaction d'une thèse est considérée par beaucoup comme un exercice informatique difficile du fait de la taille du document et de la rigueur qu'il est nécessaire d'y apporter, sans parler de la difficulté à gérer la bibliographie.

C.1 L^AT_EX c'est quoi ?

Je pense que vous l'aurez remarqué, L^AT_EX est un logiciel de création de document tout comme *Word*. La différence principale entre *Word* et L^AT_EX c'est qu'avec ce dernier le texte n'apparaît pas à l'écran lorsque vous le tapez tel qu'il sera dans le document final. Pour exemple voici ce paragraphe tel que je le tape actuellement :

```
\section{\LaTeX{}} c'est quoi?
```

Je pense que vous l'aurez remarqué, \LaTeX{} est un logiciel de création de document tout comme *Word*. La différence principale entre *Word* et \LaTeX{} c'est qu'avec ce dernier le texte n'apparaît pas à l'écran lorsque vous le tapez tel qu'il sera dans le document final. Pour exemple voici ce paragraphe tel que je le tape actuellement :

C.2 \LaTeX est ce que c'est simple ?

Oui \LaTeX est simple si tant est que votre but est de rédiger un document à base de texte, d'images et de tableaux standards. Par contre, si votre but est de faire des tableaux alambiqués, de dessiner ou de réaliser des schémas intriqués avec \LaTeX ¹, sachez que rien n'est impossible mais que ces tâches varient de difficiles à presque impossibles voire irréalisables du fait de leur complexité.

Cela vous demandera un peu d'effort et de temps pour assimiler les fonctions de base mais vous fera par la suite économiser de l'énergie et du temps dans des proportions incomparables : avec \LaTeX on s'arrache un peu les cheveux au début mais jamais à la fin. À moins, bien sûr, que vous ne gardiez les difficultés pour la fin.

C.3 Où trouver \LaTeX , comment l'installer et comment débiter ?

\LaTeX est libre, gratuit et est très utilisé par les amateurs d'informatiques et de mathématiques. Les guides de qualité gratuits font légions sur internet. Voici le lien qui me semble le plus pérenne dans le temps pour avoir les réponses à (presque) toutes les questions que vous pourriez vous poser, il s'agit du wikibook dédié à \LaTeX : http://fr.wikibooks.org/wiki/Programmation_LaTeX. Dans tous les cas, au prix de 5 minutes de recherche sur votre moteur de recherche préféré vous trouverez tous les renseignements souhaités.

Je connais certaines personnes n'ayant jamais éprouvé le besoin d'acheter un livre sur \LaTeX du fait de l'abondance de la documentation gratuite présente sur internet, ce n'est pas mon cas. J'ai acheté le livre *\LaTeX pour l' impatient* qui à l'avantage d'être léger et très bien écrit. Je recommande ce livre à tous.

C.4 Les solutions que j'ai utilisés

Si vous êtes parvenu jusqu'ici c'est que \LaTeX vous intéresse (au moins un peu), vous allez sûrement l'essayer si ce n'est déjà fait. Dans ce cas vous remarquerez que \LaTeX ne fonctionne pas comme un logiciel traditionnel car il nécessite deux éléments pour être utilisé (Le coeur de \LaTeX , qui travaille en coulisse, et l'interface graphique via laquelle vous demandez à \LaTeX de travailler pour vous) avec de nombreuses possibilités de choix pour chaque élément.

Pour ma part j'utilise les éléments suivants qui sont extrêmement populaires :

1. Le coeur de \LaTeX : utilisation de MikTeX disponible sur <http://miktex.org/>.
2. L'interface graphique ou plutôt l'éditeur de texte : utilisation de T_EXnicCenter. Ce programme est disponible à <http://www.texniccenter.org/>.

Enfin, une information qui peut être utile et qui n'est pas forcément facile à trouver : la police utilisée par \LaTeX . La police utilisée par défaut par \LaTeX est la *computer modern unicode serif* appelée aussi *CMU Serif*. Vous trouverez facilement cette police sur internet.

1. Il est possible de réaliser de superbes schémas, dessins ou graphiques avec \LaTeX via, par exemple, le package PGF-TikZ. La figure 3.5 (qui est relativement simple) a été réalisée avec ce package. Le site <http://www.texample.net/tikz/examples/> présente de superbes créations réalisées à l'aide de PGF-TikZ (un très (très) haut niveau de programmation est parfois nécessaire pour obtenir ces résultats).

Glossaire

10-DAB
2,4-D

Abaxiale
ACS
actine (filament d')

agar-agar

AMM
anaphylaxie

arille

10-déacétylbaccatine III, 7
acide-2,4-dichlorophénoxyacétique, 7

La face dorsale des feuilles est abaxiale, 16
American Chemical Society, 34
Filament protéique épais d'environ 7 nm, formé à partir d'une chaîne de molécules d'actine globulaire. Constituant majeur du cytosquelette de toutes les cellules eucaryotes, particulièrement abondant dans les cellules musculaires., 46
L'agar-agar est un produit gélifiant obtenu à partir d'algues rouges (entre autre floridées comme le *Gracilaria*). C'est un polymère de galactose (galactane) contenu dans la paroi cellulaire de certaines espèces d'algues rouges (rhodophycées). Cet extrait serait riche en fer. L'agar-agar purifié, débarrassé de tous ses éléments minéraux s'appelle l'agarose, utilisable selon son niveau de pureté dans diverses applications de biologie moléculaire, 58
autorisation de mise sur le marché, 31
C'est une réaction allergique sévère et rapide, qui suit l'introduction d'une substance étrangère : l'agent allergène. L'allergène peut-être ingéré, inhalé, injecté ou mis en contact avec la peau une première fois sans aucune réaction. L'organisme va toutefois être sensibilisé à ce composé, et va réagir violemment après la seconde introduction., 33
Un arille est une enveloppe charnue plus ou moins développée autour d'une graine. Un cas représentatif d'arille est celui de la « baie » d'if pour laquelle l'enveloppe charnue est incomplète (la « baie » d'if constitue en fait un « faux fruit » . C'est la seule partie non toxique de l'if, elle est sucrée et mucilagineuse). Chez des espèces telles que le fruit de la passion et certaines espèces appartenant à la famille des Sapindacées, comme le litchi, la chair que l'on déguste n'est pas un fruit mais est en fait l'arille, 21

| | |
|---------------------------|---|
| ataxie | En médecine, l'ataxie (du grec ataxia-, signifiant « désordre ») est une pathologie neuromusculaire qui consiste en un manque de coordination fine des mouvements volontaires. Elle n'est pas liée à une déficience physique des muscles mais plutôt à une atteinte du système nerveux. Le trouble de la coordination est partiellement corrigé par le contrôle visuel., 29 |
| bradycardie | La bradycardie (du grec bradus = lent et kardia = coeur) se caractérise par un rythme cardiaque trop bas par rapport à la normale, 29 |
| Bulliard Pierre | Jean Baptiste François Pierre Bulliard est un botaniste français, né vers 1742 à Aubepierre-en-Barrois (dans la Haute-Marne) et mort le 26 septembre 1793 à Paris., 24 |
| cal | Un cal est une structure de prolifération cellulaire obtenue notamment en culture in vitro par l'ajout d'hormones végétales, 56 |
| camptothecine | Alcaloïde anticancéreux, extrait de l'arbre chinois <i>Camptotheca acuminata</i> . Prototype des inhibiteurs de la topoisomérase 1. Ses dérivés utilisés en cancérologie sont l'irinotécan (Campto®) et le topotécan (Hycamtin®), 89 |
| cardiosélectif | Se dit d'une substance agissant uniquement sur le coeur, 29 |
| <i>Catharantus roseus</i> | La pervenche de Madagascar(<i>Catharantus roseus</i>) est une plante herbacée pérenne originaire et endémique de Madagascar appartenant à la famille des <i>Apocynacées</i> , 51 |
| Célèbes | Sulawesi (aussi connu sous le nom de Célèbes) est une île d'Asie du Sud-Est appartenant à l'Indonésie., 16 |
| cellules KB | Lignée cellulaire provenant d'un carcinome oral humain, 33 |
| centriole | Arrangement cylindrique court de microtubules, habituellement (dans les cellules animales) en paire au centre d'un centrosome. Des structures semblables sont présentes à la base des cils et des flagelles, où elles sont appelées corpuscules basaux., 95 |
| centromère | Région resserrée d'un chromosome en mitose qui maintient ensemble les chromatides soeurs ; c'est également le site de l'ADN où le kinétochore se constitue en tant que site d'attache des microtubules du fuseau mitotique., 96 |

| | |
|--------------------------------------|--|
| centrosome | Organite localisé au centre des cellules animales, qui est le principal centre organisateur des microtubules, et qui est dupliqué pour former les pôles du fuseau durant la mitose. Dans la plupart des cellules animales, il contient une paire de centrioles. , 46 |
| Charles F. Kettering | Ingénieur américain, fondateur de la <i>Dayton Engineering Laboratories Company (Delco)</i> , 89 |
| Chemotherapy National Service Center | service national de chimiothérapie des États Unis, 32 |
| cils | Expansion en forme de cheveu à la surface d'une cellule, ayant un faisceau central de microtubules et capable de mouvements de battement répétés. Des cils en grand nombre déterminent le mouvement des fluides sur les surfaces épithéliales, comme c'est le cas dans les poumons., 48 |
| CLHP | Chromatographie liquide haute performance, 76 |
| CRADA | Cooperative Research & Development Agreement. Un CRADA est un accord écrit entre une organisation de recherche fédérale (ici le NCI) et un (ou plusieurs) partenaire fédéral ou non fédéral pour travailler ensemble sur un sujet d'intérêt mutuel (ici le Taxol)., 34 |
| Cremophor® EL | Le Crémophor® EL ou <i>huile de ricin</i> polyoxyéthylénée est un surfactant non ionique obtenu par la polyéthoxylation de l'huile de ricin. Il consiste en un mélange complexe d'huile de ricin non modifiée avec une variété de polyéthylènes glycol, glycérol polyéthoxylé, diesters et triesters de glycérol qui sont polyéthoxylés à des degrés différents, 33 |
| dichlorométhane | Formule brute : CH_2Cl_2 , $\rho_{\text{dichlorométhane}} = 1.325 \text{ kg/l}$, 75 |
| dyspnée | La dyspnée (en latin dyspnoea, en grec dyspnoia de dyspnoos - court d'haleine) est une difficulté respiratoire. On distingue deux types de dyspnées, la difficulté à inspirer de l'air (ou faire entrer de l'air dans ses poumons) ou dyspnée inspiratoire et, la difficulté à expirer de l'air (ou faire sortir de l'air de ses poumons) ou dyspnée expiratoire. Cette difficulté à respirer comporte une composante subjective, représentée par la gêne éprouvée par le patient, et d'autre part une composante objective., 29 |
| décoctions | La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante., 21 |

| | |
|-----------------------|---|
| eau ultra-pure | L'eau ultra-pure est utilisée principalement dans les domaines du semi-conducteur et dans les industries pharmaceutiques. L'eau ultra-pure ne contient par définition que des molécules H_2O , et des ions H^+ et OH^- en équilibre. De ce fait, la conductivité de l'eau ultra-pure est d'environ 0.054 mS/cm à 25°C, équivalente à une résistivité de 18.3 MW, 58 |
| Éburons | Les Éburons étaient un peuple belge, établie au nord-est de la (grande) Gaule au I ^{er} siècle avant Jésus Christ. Jules César les décrit comme étant d'origine germanique, 21 |
| emménagogue | On appelle emménagogues des plantes médicinales qui stimulent le flux sanguin dans la région pelvienne et l'utérus. Des plantes telles l'absinthe l'armoise commune (<i>Artemisia vulgaris</i>), le persil (<i>Petroselinum crispum</i>), l'angélique (<i>Angelica archangelica</i>), la muscade (<i>Myristica fragrans</i> Houtt) et le gingembre (<i>Zingiber</i>) ont été utilisées par des femmes pour stimuler l'apparition des règles., 21 |
| encombrement stérique | Il y a encombrement stérique lorsque le volume occupé par une partie d'une molécule gêne l'approche d'un réactif ou d'une autre partie de la molécule. Les groupes d'atomes occupent un certain volume dans l'espace et lorsque deux groupes s'entrechoquent, ils se repoussent (principe de Pauli). La forme de la molécule dans l'espace peut alors empêcher un réactif d'accéder à certains groupes fonctionnels trop encombrés. Dans d'autres circonstances, l'encombrement stérique n'est pas suffisant pour empêcher totalement une réaction mais peut la ralentir ou orienter l'approche du réactif., 37 |

| | |
|------------------------------|--|
| ENSIC | L'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC) est une école d'ingénieurs généralistes en génie chimique à Nancy, France. Elle accueille aujourd'hui plus de 400 élèves ingénieurs. Elle fait partie de la Fédération Gay-Lussac et de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL) qui regroupe les sept écoles d'ingénieurs de Nancy. Elle est reconnue comme l'une des meilleures écoles de génie chimique de France mais aussi d'Europe. L'ENSIC fut fondée sous le nom d'Institut Chimique de Nancy en 1887, pour fournir des ingénieurs à l'industrie chimique en expansion rapide. Son fondateur Albin Haller, un Alsacien qui s'installa à Nancy après l'annexion de l'Alsace et de la Moselle par l'Allemagne était pharmacien. L'un de ses premiers professeurs, Victor Grignard, reçut le prix Nobel de chimie en 1912 pour son invention des composés organométalliques connus sous le nom de « réactifs de Grignard »., 41 |
| erlenmeyer | La fiole Erlenmeyer, couramment appelée erlenmeyer (sans majuscule) ou plus familièrement erlen, est un récipient largement utilisé en verrerie de laboratoire. Il est constitué d'une base conique et d'un col cylindrique ; il existe différents types d'erlenmeyers selon la forme de ce col, la plus courante étant l'erlenmeyer à col étroit. L'erlenmeyer doit son nom à Emil Erlenmeyer, chimiste allemand (1825-1909) qui l'a inventé en 1861., 58 |
| eucaryote | Le domaine des Eukaryota ou eucaryotes, (du grec eu, bien et karuon, noyau) regroupe tous les organismes compris dans quatre grands règnes du monde vivant : les animaux, les champignons, les plantes et les protistes. Ils sont caractérisés principalement par des cellules qui possèdent un noyau. Ils constituent donc un très large groupe d'organismes, uni- ou pluricellulaires, définis par leur structure cellulaire, 43 |
| fibroblaste | Un fibroblaste est une cellule présente dans le tissu conjonctif, elle est parfois appelée cellule de soutien., 51 |
| flagelle | Long prolongement en forme de fouet qui, par son battement, permet à une cellule de se déplacer dans un milieu liquide. Les flagelles des eucaryotes sont la version longue des cils ; les flagelles des bactéries sont très différents, étant plus petits et de structure plus simple., 48 |
| Food and Drug Administration | agence américaine du médicament, 33 |

| | |
|------------------|---|
| fuseau mitotique | Arrangement de microtubules et de molécules associées qui se forme entre les deux pôles d'une cellule eucaryote durant la mitose, et qui sert à séparer les chromosomes dupliqués., 48 |
| GTP | Guanosine triphosphate, 51 |
| Hauser Inc. | Groupe industriel dont la principale activité est de produire des extraits à partir de ressources naturelles en utilisant l'expertise du groupe en extraction et purification, 34 |
| huile de ricin | L'huile de ricin est une huile végétale obtenue à partir des graines de ricin. Elle est incolore à jaune très clair, bout à 313 °C et présente une masse volumique de 961 kg.m ⁻³ ., 95 |
| hydroxyle | groupement R-OH, qui se rencontre en particulier dans les alcools et les phénols., 37 |
| hémisynthèse | En chimie, une hémisynthèse est la synthèse d'une molécule réalisée à partir de composés naturels possédant déjà une partie de la molécule visée., 37 |
| INDA | Investigational New Drug Application. C'est une demande adressée par une entité développant un médicament à la FDA. Le but est d'avoir l'autorisation de la FDA pour envoyer un nouveau médicament non encore autorisé dans plusieurs états des États-Unis afin de réaliser des essais cliniques. Dans cette demande l'entité développant le médicament fournit les informations nécessaires pour établir que le patient n'est pas exposé à des risques importants lors de l'utilisation du médicament à faible dose pendant les premiers essais cliniques. En général quand cette demande est acceptée le médicament entre en essais cliniques de phase I., 34 |
| KIN | kinétine, 7 |
| kinétochore | Structure multiprotéique complexe d'un chromosome mitotique à laquelle s'attachent les microtubules. Le kinétochore se forme sur la partie du chromosome connue sous le nom de centromère. , 46 |
| LRP | Lung Resistance Protein, 53 |
| MAPS | Microtubule-Associated Proteins, 51 |

| | |
|------------------|--|
| micropropagation | Multiplication rapide et/ou régénération de la matière végétale afin de produire un grand nombre de nouvelles plantes génétiquement identiques au moyen des méthodes des laboratoires modernes, 56 |
| mitose | Division du noyau d'une cellule eucaryote impliquant la condensation de l'ADN en chromosomes visibles. Du grec <i>mitos</i> , fil, en raison de l'aspect filiforme des chromosomes condensés., 43 |
| Monophylétique | La monophylie, du grec <i>monos</i> « seul » et <i>phulon</i> « tribu », est la caractéristique d'un groupe d'espèces, appelé clade, d'être constitué d'un ancêtre et de tous ses descendants. En systématique, un taxon est dit monophylétique quand il définit un tel clade. La présence de caractères dérivés communs à différents taxons (appelés alors caractères dérivés propres ou synapomorphies) permet de regrouper ceux-ci sous un même nom, représentatif du caractère monophylétique du groupe. Par exemple, la présence d'un noyau dans les cellules des eucaryotes., 9 |
| NCI | Institut National du Cancer des États-Unis, 32 |
| Pierre Potier | Pierre Potier, né le 22 août 1934, à Bois-Colombes et mort le 3 février 2006, fut un pharmacien et chimiste, directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, professeur au Muséum national d'histoire naturelle, membre de l'Académie nationale de pharmacie, de l'Académie des sciences, de l'Académie des technologies et de l'Academia Europea., 37 |
| Pinopsida | La classe des Pinopsida est une classe de conifères qui compte 600-650 espèces. Elles sont caractérisées par des feuilles généralement petites et toujours simples et par une croissance secondaire active de la tige et de la racine. Les conifères sont les plus nombreux des gymnospermes vivants et forment de grandes et relativement pures forêts. Les exemples communs des conifères sont les pins, les sapins, les séquoias, les cèdres, les genévriers, les cyprès, et les mélèzes. Le bois des conifères est employé intensivement pour la construction. La plupart des conifères sont monoïques, c'est-à-dire que les cônes mâles et femelles sont produits sur le même arbre, 21 |

| | |
|-------------------|---|
| Pynophyta | La division ou embranchement des pinophytes (ou conifères), anciennement connue sous le nom de coniférophytes (ou Coniferophyta), ne comprend qu'une classe : celle des Pinopsida. Tous les conifères existants sont des plantes ligneuses dont la grande majorité sont des arbres, les autres étant des arbustes. Les conifères les plus répandus sont les cèdres, cyprès, douglas, sapins, genévriers, agathis, mélèzes, pins, séquoias, épicéas et les ifs. Les espèces de conifères peuvent pousser naturellement presque partout dans le monde, et sont fréquemment les plantes dominantes dans leur habitat. Cet embranchement est cependant sur le déclin et seules 650 espèces environ de conifères subsistent à l'heure actuelle. Les conifères ont un important poids économique, principalement pour le bois d'oeuvre et la production de papier, 21 |
| RTI International | Research Triangle Institute International. Centre de recherche basé en Caroline du Nord fondé en 1958, 33 |
| Taxales | L'ordre des Taxales est un ordre de plantes gymnospermes qui ne comprend que la famille des Taxacées (les ifs). Dans les classifications les plus récentes, cet ordre a été fusionné dans celui des Pinales, 21 |
| taxanes | Les taxanes désignent la classe pharmaceutique des taxanes qui compte le paclitaxel et le docétaxel. Cependant les taxanes désignent également plus largement tous les composés diterpéniques du genre du paclitaxel et du docétaxel issus du genre <i>Taxus</i> , 98 |
| taxoïde | Les taxoïdes sont des composés diterpéniques découverts chez le genre <i>Taxus</i> . On compte dans ce groupe tous les <i>taxanes</i> et les taxines. De nombreuses publications font références aux taxanes et aux taxines sous le terme d'alcaloïdes en considérant les composés issus du genre <i>Taxus</i> comme des alcaloïdes terpéniques. Cependant les taxanes et taxines se démarquent des alcaloïdes par le fait que leur atome d'azote n'est pas inclus dans l'hétérocycle mais sur une chaîne latérale. Dans cette thèse nous utilisons le terme taxoïdes pour désigner les terpènes du genre <i>Taxus</i> , 13 |
| TESCI | Réactif chlorure de triéthylsilyle, 38 |

topoisomérase I

Les ADN topoïsomérase (de type I : ADN topoïsomérase et de type II : ADN gyrase) sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires dans celui-ci et en catalysant le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Elles permettent notamment d'ajouter et d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN. Elles jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc.). Ces enzymes sont actuellement l'objet d'une activité de recherche intense, en particulier parce qu'elles sont les cibles pharmacologiques d'importants agents anticancéreux., 89

Tracheonbionta

Sous règne dont les caractères principaux sont l'existence de racines sauf chez les Psilophytes et la présence de vaisseaux (xylème et phloème) assurant la circulation de la sève., 21

United States Department of Agriculture

département d'agriculture des États-Unis, 32

Index

- α -tubuline, 48
- β -tubuline, 48
- Camptotheca acuminata*, 89
- 10-déacétylbaccatine III, 37
- 2,4-D, 58
- 6-(Furfurylamino)-purine, 60

- abaxiale, 16
- acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, 58
- acide indole-acétique, 58
- actine, 46
- acylation, 37
- AIA, 58
- American Chemical Society, 35
- anaphase, 46
- anaphylaxie, 33
- apoptose, 53
- arille, 21
- ataxie, 29
- auxines, 58

- BMS, 33
- bradycardie, 29
- Bristol-Myers Squibb, 33
- Bulliard Pierre, 24

- camptothecine, 89
- cardiosélectif, 29
- Catharantus roseus*, 51
- Célèbes, 16
- cellules KB, 33
- centrosome, 46, 48
- Charles F. Kettering, 89
- Chemotherapy National Service Center, 33
- chlorure de triéthylsilyle, 38
- chromatographie liquide haute performance, 76
- cils, 48
- Clé d'identification, 18
- CLHP, 76
- CMU Serif, 94
- colchicine, 51
- computer modern unicode serif, 94

- CRADA, 36
- Cremophor® EL, 33
- cycle cellulaire, 43
- cytocinèse, 46
- cytodiérèse, 46
- cytokinines, 58

- décoction, 24
- Danishefsky, 41
- dichlorométhane, 75
- docétaxel
 - structure, 34
 - voies d'accès, 34
 - hémisynthèse, 38
- dyspnée, 29

- eau ultra-pure, 58
- Éburons, 24
- emménagogue, 24
- encombrement stérique, 37
- ENSIC, 41
- EPA, 41
- épothilone, 53
- équilibre auxines/cytokinines, 61
- erlenmeyer, 58
- Estry, 20
- études
 - cliniques, 31
 - phase I, 31
 - phase II, 31
 - phase III, 31
 - phase IV, 32
- extrémité moins, 51
- extrémité plus, 51

- fibroblaste, 51
- flagelles, 48
- fuseau mitotique, 46, 48

- gap, 46
- glycoprotéine P, 53

- hémisynthèse, 37

- Hartwell, 89
 Hauser Inc., 36
 Holton, 41
 hydroxyle, 37
 if
 Anglo-Japonais, 11
 commun, 11, 18, 37
 d'Europe, 11
 d'Hunnewell, 11, 20
 de Chine, 11, 19
 de Floride, 11, 19
 de l'Himalaya, 11
 de l'Ouest, 11
 de Yunnan, 11
 des Célèbes, 11
 du Canada, 18
 du Japon, 11
 du Mexique, 11
 du Pacifique, 11, 18, 37
 du Tibet, 11
 hybride, 11, 20
 industrialisation, 41
 Institut de Chimie des Substances Naturelles,
 34, 37
 intoxication, 24
 Journal of the American Chemical Society,
 41
 KIN, 58
 kinétine, 58
 kinétochores, 46
 Kuwajima, 41
 Lande-Patry, 24
 L^AT_EX, 93
 LRP, 53
 Lung Resistance Protein, 53
 métabolisme, 43
 métaphase, 46
 Mansukh C. Wani , 91
 microtubules, 48
 MikT_EX, 94
 mitose, 43
 monophylétique, 9
 Monroe E. Wall, 33, 89
 MRP, 53
 Mukaiyama, 41
 Multidrug Resistance Associated Proteins, 53
 Nancy, 20
 Nature, 41
 NCI, 33
 Nicolaou, 41
 Otto Wilhelm Thomé, 20
 ours, 24
 Pépinière, 20
 paclitaxel, 32
 extraction, 34
 métabolisme, 43
 pharmacocinétique, 43
 structure, 34
 voies d'accès, 34
 biotechnologies, 41
 hémisynthèse, 37
 synthèse totale, 41
 PCF, 41
 PEG, 35
 pharmacocinétique, 43
 pharmacovigilance, 32
 phase M, 46
 phase S, 46
 Plant Cell Fermentation, 41
 poisons du fuseau, 51
 Potier Pierre, 26, 34, 37
 prométaphase, 46
 prophase, 46
 prostaglandines, 53
 protofilaments, 48
 radicelle, 65
 Rhône-Poulenc Rorer, 34
 Sanofi-aventis, 34
 screening, 30
 Sigma-Aldrich, 76
 stabilisateur du fuseau, 51
 synthèse totale, 41
 télophase, 46
 taxanes, 7, 25, 30, 34, 56
 dosage, 74
 extraction, 74
 mécanisme d'action, 51
 structure, 34
 taxines, 25
 A, 26
 B, 27
 pharmacologie, 27
 traitement, 29
 Taxol

- développement, 33
- Taxus*
 - baccata*, 18, 20
 - brevifolia*, 18
 - canadensis*, 18
 - chinensis*, 19
 - cuspidata*, 19
 - floridana*, 19
 - x *hunnewelliana*, 20
 - x *media*, 20
- TESCl, 38
- TeXnicCenter, 94
- topoisomérase I, 89
- totipotence, 65
- Toxicité
 - de l'if, 24
- triéthylsilyloxy, 38
- tubuline, 48
- United States Department of Agriculture, 32
- United States Environmental Protection Agency,
41
- vérapamil, 29
- Wender, 41
- Woody Plant Medium, 58
- WPM 1/2, 58
- WPM major salt half strength, 58