



**HAL**  
open science

## Le taxol et ses nouvelles sources d'approvisionnement

Sophie Mahier

► **To cite this version:**

Sophie Mahier. Le taxol et ses nouvelles sources d'approvisionnement. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01561173

**HAL Id: dumas-01561173**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01561173>**

Submitted on 12 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## 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 n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.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/juridique/droit-auteur>

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

2e exemplaire



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 1999

N° D'ORDRE : 7044

**LE TAXOL  
ET SES NOUVELLES SOURCES  
D'APPROVISIONNEMENT.**

THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

MAHIER Sophie

*[Données à caractère personnel]*

**THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 15 OCTOBRE 1999 A 17 H**

**DEVANT LE JURY COMPOSE DE :**

Madame le Professeur **SEIGLE-MURANDI Françoise**, Président du jury

Monsieur le Docteur **KRIVOBOK Serge**

Monsieur **CHAMPON Bernard**

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 1999

N° D'ORDRE :

**LE TAXOL  
ET SES NOUVELLES SOURCES  
D'APPROVISIONNEMENT.**

THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

MAHIER Sophie

*[Données à caractère personnel]*

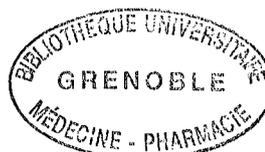
**THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 15 OCTOBRE 1999 A 17 H**

**DEVANT LE JURY COMPOSE DE :**

Madame le Professeur **SEIGLE-MURANDI Françoise**, Président du jury

Monsieur le Docteur **KRIVOBOK Serge**

Monsieur **CHAMPON Bernard**



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 1999

N° D'ORDRE :

**LE TAXOL  
ET SES NOUVELLES SOURCES  
D'APPROVISIONNEMENT.**

**ERRATUM**

Page 5, table des matières repère 8.3.5.

Lire « *Pestalotiopsis microspora* », en italiques.

Page 19, ligne 5.

Lire « protéines associées aux microtubules » au lieu de *Microtubules Associated Proteins*.

Page 19, ligne 11.

Lire « mmole/l » au lieu de *mmol/l*.

Page 20, avant dernière ligne.

Lire « (facteur de nécrose tumorale » au lieu de *Tumor Necrosis Factor*.

Page 22, paragraphe 3.3.1, dernière ligne.

Lire «  $\mu$ mole/l » au lieu de  *$\mu$ mol/l*.

Page 23, première ligne.

Lire « liquide ascitique » au lieu de *liquide ascite*.

Page 25, tableau 1, septième colonne, ligne de titre.

Lire «  $\mu$ mol/l » au lieu de  *$\mu$ mol/l*.

Page 27, dernier paragraphe, ligne 3.

Après *cancer du testicule*, remplacer le point par une virgule et ajouter « l'arthrite, la maladie d'Alzheimer et comme agent tumoral ».

Page 28, dernière ligne.  
Lire « (51) » au lieu (48).

Page 29, paragraphe 5.2.1, dernière ligne.  
Lire « dans les **membres** supérieurs et inférieurs ».

Page 31, paragraphe 5.2.4, ligne 6.  
Lire « les muscles longs » au lieu de *les muscles long*.

Page 32, paragraphe 5.2.5, ligne 6.  
Lire « hémato-encéphalique » au lieu de *hématoe encéphalique*.

Page 35, paragraphe 5.4, ligne 3.  
Lire « battements par minute » au lieu de *battements par minutes*.

Page 47, paragraphe 7.1, ligne 16.  
Lire « tableau 2 » au lieu de *tableau 1*.

Page 48, tableau.  
Remplacer le titre du tableau pour lire « tableau 2 » au lieu de *tableau 1*.

Page 52, paragraphe 7.3.1, ligne 14.  
Lire « avant qu'elles » au lieu de *avant qu'ils*.

Page 52, paragraphe 7.3.1, ligne 15.  
Lire « *in vivo* », en italiques.

Page 54, ligne 13.  
Lire « lysozomes », au lieu de *lisozomes*.

Page 54, ligne 19.  
Lire « phospholipides », au lieu de *phospholypides*.

Page 54, ligne 27.  
Lire «constitue » au lieu de *constiture*.

Page 65, paragraphe 8.2.3, ligne 4.  
Lire « à condition », au lieu de *à conditions*.

Page 71, paragraphe 8.3.3, ligne 7.  
Lire « C'est », avec une majuscule en début de phrase.

Page 74, paragraphe 8.3.5, ligne de titre.  
Lire « *Pestalotiopsis microspora* », en italiques.

Je remercie Madame le Professeur Seigle-Murandi pour m'avoir encadrée dans ce travail, ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils.

Merci au Dr Serge Krivobok et à M Bernard Champon d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie Andrew Greene pour son accueil et son aide.

Je remercie Martine Fabre, Emmanuel Colle et Alain Parolo pour leur soutien linguistique.

Merci à mes parents pour leur présence, leur assistance et leurs encouragements.

Merci à ma sœur Marie pour sa présence et son entrain.

Et grand merci à Yves pour m'avoir porté secours en informatique, ainsi que pour m'avoir soutenue et accompagnée jusqu'au bout de ce long chemin.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galènique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galènique

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	7
1 HISTORIQUE.....	8
1.1 Découverte.....	8
1.2 L'if.....	8
1.3 Développement et problème d'approvisionnement .....	10
2 CHIMIE DU TAXOL.....	12
2.1 Structure et caractéristiques chimiques .....	12
2.2 Relation structure-activité .....	13
2.2.1 «Secteur nord» .....	13
2.2.2 «Secteur sud» .....	14
2.2.3 Le diterpénoïde (A et B).....	15
2.2.4 La chaîne latérale en C13 .....	16
2.2.5 Conclusion .....	17
3 PROPRIETES DU TAXOL.....	18
3.1 Mécanisme d'action.....	18
3.2 Mécanismes de résistance .....	21
3.3 Propriétés pharmacocinétiques.....	22
3.3.1 Absorption.....	22
3.3.2 Distribution .....	22
3.3.3 Métabolisme.....	23
4 INDICATIONS .....	26
4.1 Indications faisant l'objet d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) 26	
4.1.1 Cancer de l'ovaire .....	26
4.1.2 Cancer du sein métastatique .....	26
4.2 Autres investigations.....	27
4.2.1 Cancer du poumon .....	27
4.2.2 Cancer de la vessie .....	27
5 TOXICITES .....	28
5.1 La myélosuppression (5,27) .....	28
5.2 Neurotoxicité .....	29
5.2.1 Neuropathie sensitive .....	29
5.2.2 Neuropathie motrice .....	30
5.2.3 Troubles du SNA.....	31
5.2.4 Myopathies.....	31

5.2.5	Toxicité au niveau du SNC.....	32
5.3	Réactions d'hypersensibilité .....	32
5.4	Cardiotoxicité .....	35
5.5	Toxicité digestive.....	36
5.6	Toxicité cutanée.....	36
5.7	Toxicité locale .....	37
5.8	Autres effets indésirables .....	37
5.9	Conclusion.....	38
6	SOURCES CHIMIQUES D'APPROVISIONNEMENT EN TAXOL.....	39
6.1	Synthèse totale.....	39
6.2	Hémi-synthèse .....	40
7	FORMULATION DU TAXOL .....	47
7.1	Problème de solubilité.....	47
7.2	Le Crémophor EL ® .....	49
7.3	Autres solutions de formulation du paclitaxel .....	51
7.3.1	Les LCM.....	52
7.3.2	Les co-solvants.....	53
7.3.3	Les émulsions.....	53
7.3.4	Complexation avec des cyclodextrines .....	53
7.3.5	Les prodrogues .....	55
7.3.6	Conclusion .....	55
8	PRODUCTION DE TAXOL PAR DES CHAMPIGNONS .....	56
8.1	Description de <i>Taxomyces andreanae</i> .....	58
8.1.1	Méthodes d'analyses .....	59
8.1.2	Observations .....	60
8.2	Culture de <i>Taxomyces andreanae</i> et production de taxol .....	61
8.2.1	Méthodes de production et d'extraction de taxol .....	61
8.2.2	Identification du taxol .....	62
8.2.3	Quantités de taxol produites et stimulation.....	65
8.3	<i>Pestalotiopsis microspora</i> issu de <i>Taxus wallachiana</i> .....	68
8.3.1	Isolement et identification de <i>Pestalotiopsis microspora</i> .....	68
8.3.2	Identification du taxol produit par <i>Pestalotiopsis microspora</i> .....	70
8.3.3	Production de taxol par <i>Pestalotiopsis microspora</i> .....	71
8.3.4	<i>Pestalotiopsis microspora</i> issu de <i>Taxodium distichum</i> .....	72
8.3.5	Le taxol de <i>Pestalotiopsis microspora</i> .....	74
8.3.6	Stimulation de la production de taxol par <i>Pestalotiopsis microspora</i> .....	75
9	PRODUCTION DE TAXOL PAR CULTURES CELLULAIRES .....	77
9.1	Culture cellulaire de <i>Taxus cuspidata</i> et <i>Taxus canadensis</i> .....	77
9.1.1	Différentes sources d'explants.....	77
9.1.2	Devenir du noircissement en présence de différents agents dans le milieu	

9.1.3 Immobilisation des suspensions cellulaires.....	80
9.1.4 Production de taxol.....	80
9.2 Amélioration des cultures cellulaires et de la production de taxol.....	82
9.2.1 Influence des sucres du milieu de culture sur la production de taxol.....	82
9.2.2 Effets de la lumière sur l'accumulation de taxol et de baccatine III dans les cultures cellulaires de <i>Taxus cuspidata</i> .....	84
9.2.3 Rôle de la composition en gaz sur des cultures cellulaires de <i>Taxus cuspidata</i> .....	85
9.2.4 Action du jasmonate de méthyl sur la production de taxol.....	86
9.2.5 Rôle de la taxadiène synthétase .....	88
CONCLUSION.....	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	94

# INTRODUCTION

La découverte d'un nouveau médicament représente toujours un progrès considérable pour la médecine. Quand de surcroît, il s'agit d'un nouvel anticancéreux doté d'un mode d'action unique, il prend d'autant plus d'importance.

C'est ainsi que fût perçue l'apparition du taxol. Cette substance d'origine naturelle, extraite de l'écorce de l'if, semblait avoir un avenir très prometteur. Malheureusement, les quantités produites étaient beaucoup trop faibles pour faire face au nombre élevé de demandes.

De plus, sa faible solubilité a posé, et pose encore, de gros problèmes de formulation galénique.

Les chercheurs se sont tournés vers de nouvelles voies de production, telle que la synthèse chimique.

A l'heure actuelle, ce sont les cultures de microorganismes et de cellules qui sont à l'étude, dans le but d'améliorer la production de taxol.

Ce sont ces différentes voies de production qui seront traitées ici, ainsi que les différentes solutions alternatives à la formulation galénique du taxol.

# 1 HISTORIQUE

## 1.1 Découverte

La découverte du paclitaxel dans l'écorce de l'if remonte aux années 60. A l'époque, le National Cancer Institute (NCI) venait de lancer un vaste programme de recherche de nouveaux anticancéreux. En 1962, le botaniste Arthur Barclay collecte l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) pour des études biologiques et chimiques. Cet extrait montre une activité cytotoxique sur la lignée cellulaire KB. En 1966, Wall, Wani et leurs collaborateurs (Research Triangle Institute, North Carolina) isolent la substance active pure de l'écorce séchée, avec un rendement de 0,02%. Mais c'est seulement en 1969 que des quantités suffisantes de produit sont préparées, afin d'identifier la structure du paclitaxel qui sera décrite et publiée en 1971, par la même équipe, qui l'appellera «taxol» (DCI = Dénomination Commune Internationale). Ce nom chimique sera utilisé jusqu'en 1993. (2,25,26,31,56,50,64)

## 1.2 L'if

L'if tient une place importante dans l'histoire. Du fait de sa croissance très lente et de sa durée de vie de plusieurs centaines d'années, il fut longtemps considéré dans d'anciennes religions européennes comme le symbole de la longévité.

Son origine remonte à plus de 50 000 ans. Il a été très utilisé pour l'art et pour la fabrication des instruments de musique jusqu'au XVI<sup>ème</sup> siècle, entraînant une destruction massive des espèces. En revanche, son usage médicinal fut beaucoup plus tardif. C'est en sa qualité de poison qu'il était connu depuis l'Antiquité.

«*Taxus*» est un mot d'origine grecque, qui signifie : poison. Jules César en parle dans son sixième livre de «*bellos gallico*», au sujet de la mort de Cativolcus, chef de tribu gaélique, qui a préféré se suicider en buvant un thé préparé à partir d'écorce

d'if, plutôt que de se rendre aux légions romaines. Virgile le cite aussi dans «Les Bucoliques» et dans «Les Géorgiques». Sa renommée s'étend même aux œuvres de Shakespeare et d'Agatha Christie.

Les tribus indiennes du Nord-Ouest des Etats-Unis utilisaient l'écorce de l'if du Pacifique comme désinfectant, comme substance abortive, et comme traitement du cancer de la peau.

Ces cent dernières années, l'arbre fut négligé. Dans le Nord-Ouest des Etats-Unis, par exemple, les sociétés d'exploitation du bois brûlaient les ifs qui les gênaient quand ils abattaient les pins et les sapins dont ils faisaient commerce. (2,41)

L'if est un ligneux persistant, dioïque, à aiguilles aciculaires, souvent étalées sur deux rangs. Il fait partie de la famille des Taxacées, et du genre *Taxus*. Les petites fleurs mâles ont des étamines peltées supportant 3 à 8 sacs polliniques. Chaque inflorescence femelle est réduite à un seul ovule devenant une graine nue, seulement entourée par un arille rouge orangé. L'if commun (*Taxus baccata*) peut atteindre une hauteur de 15 à 25 mètres, et sa longévité est prodigieuse (10 à 15 siècles).

L'arille est la seule partie non toxique de l'if. Cet arbre est l'un des plus dangereux de la flore pour l'espèce animale et humaine. Pour un homme adulte, 4 à 5 poignées de feuilles ingérées sont mortelles. A l'heure actuelle, les centres spécialisés connaissent surtout des intoxications liées à l'ingestion de ses pseudo fruits par les jeunes enfants. Très fréquemment, la graine (qui contient les principes toxiques) est ingérée non mâchée ou recrachée (son contenu est très amer), ce qui explique la rareté des cas graves. L'intoxication, annoncée par des signes digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées...) et neurologiques (tremblements, vertiges...), est caractérisée par de l'hypotension et des troubles du rythme cardiaque. En cas d'ingestion massive, l'évolution peut être très rapide (coma, crise convulsive, collapsus cardiovasculaire). Il n'existe pas de traitement spécifique, ni d'antidote. Evacuation du toxique, administration de charbon activé et traitement symptomatique constituent l'essentiel des mesures à prendre dans la majorité des

cas. Les intoxications massives imposent une admission en service de réanimation.  
(8)

La toxicité de l'if est due à onze alcaloïdes au moins, dont deux sont identifiés à l'heure actuelle: la taxine A (30%) et la taxine B (2%). Les taxines ont des effets chronotropes et inotropes négatifs et interfèrent avec la conduction cardiaque. Le mécanisme d'action suspecté est l'altération des échanges d'ions au niveau des canaux calciques cardiaques. (2,6)

### 1.3 Développement et problème d'approvisionnement

L'équipe de Wall et Wani ne met en évidence, *in vitro*, qu'une modeste activité cytotoxique du paclitaxel sur des cultures de cellules leucémiques murins L1210 et P388. Par contre, la cytotoxicité est excellente sur la lignée cellulaire KB. (25) Il sera ensuite testé sur de nombreux modèles tumoraux murins au cours des années 70. Ainsi, la molécule s'avère hautement active, *in vivo*, dans le mélanome B16, la leucémie P1534 et sur la tumeur mammaire xénogreffe MX-1. (25)

L'action au niveau des microtubules ne sera découverte qu'au milieu des années 70, par Horwitz et coll. (50) Cependant, les chercheurs pensent que le paclitaxel agit par désassemblage des microtubules cellulaires, comme les alcaloïdes de la pervenche. Mais en 1979, cette même équipe montre qu'il agit sur la tubuline en favorisant sa polymérisation en microtubules, et en inhibant le désassemblage. (25,26,27)

Cette nouvelle découverte pousse le NCI, en collaboration avec les laboratoires Bristol-Myers Squibb (BMS), à persévérer dans les études de formulation et la mise en place d'études précliniques et cliniques. (25,26,27) Mais une difficulté va alors apparaître, retardant le développement du paclitaxel. L'extraction du taxol de l'écorce entraîne inévitablement la mort de l'arbre. 1 kg de taxol est isolé à partir de 10 000 kg d'écorce, ce qui représente environ 3000 arbres. Sachant que 2 g de taxol sont généralement nécessaires pour traiter un patient, cette quantité ne sera utilisée

que par 500 patients. (43) On comprend donc qu'un véritable problème d'approvisionnement va rapidement se poser. D'autant plus que seuls les ifs adultes possèdent la précieuse substance, et qu'il faut plusieurs dizaines d'années avant que l'arbre atteigne une taille convenable.

L'alerte est donnée aux Etats-Unis, par des groupes environnementalistes, qui jugent important de mettre l'if sur la liste des espèces végétales protégées. (62)

Il devient donc capital de trouver d'autres méthodes de production du taxol. C'est dans ce contexte que les laboratoires BMS ont signé avec le NCI un CRADA (Cooperative Research and Development Agreement) leur permettant de développer la production de paclitaxel, et de le commercialiser. Les chercheurs se sont penchés sur de nouvelles sources : au niveau de *Taxus brevifolia* lui-même (le tronc, les feuilles), au niveau de l'ensemble des espèces d'if, par la culture de tissus végétaux, de champignons saprophytes de l'if et par le développement de synthèses totales et partielles.

A l'heure actuelle, la principale source de paclitaxel est la synthèse partielle développée en premier par Holton et coll. (25,27)

## 2 CHIMIE DU TAXOL

### 2.1 Structure et caractéristiques chimiques

La formule chimique du taxol est : 5 bêta, 20-époxy-1,2 alpha, 4,7 bêta, 13 alpha-hexahydroxytax-11-ene-9-one 4,10-diacétate benzoate de (2R, 3S)-N-benzoyl-3-phénylisosérine. Ce composé diterpène, appartenant à la classe des taxanes, comporte 11 centres asymétriques. Sa formule brute est  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , et sa formule développée est illustrée par la figure 1.

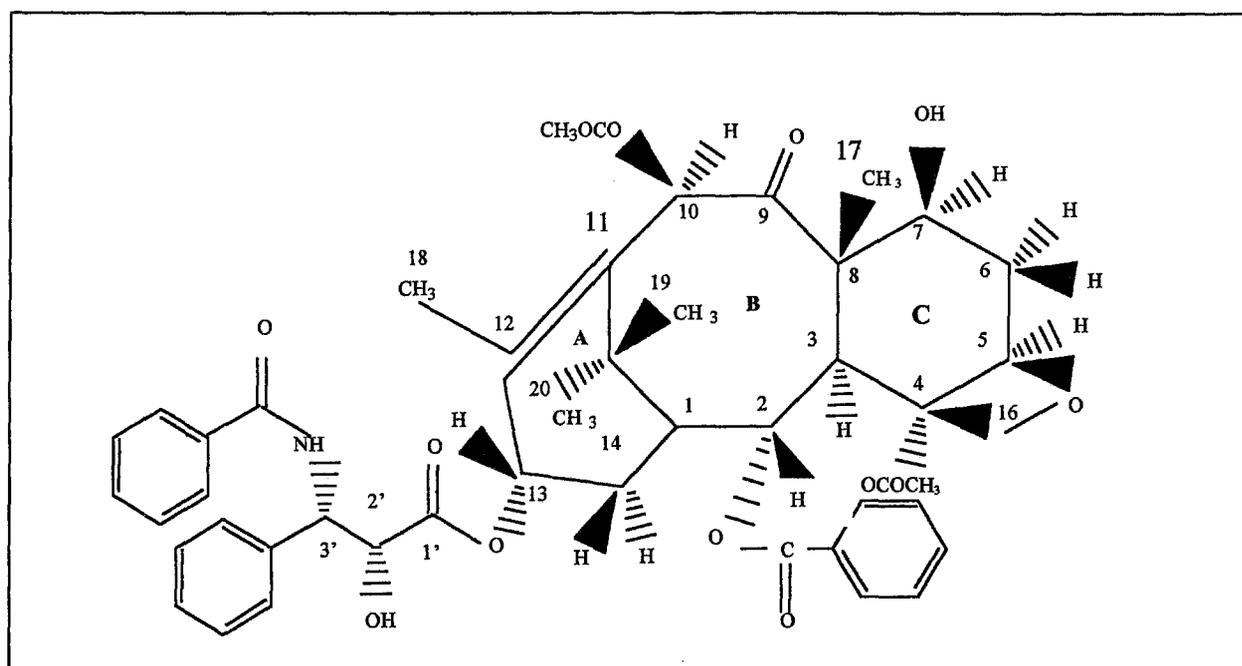


Figure 1 : Structure chimique du paclitaxel. (64)

La structure du paclitaxel repose sur la liaison d'un anneau complexe taxane à un anneau oxétanne en C-4 et C-5, estérifié en C-13.

La masse moléculaire relative est de 853,9 daltons.

Après isolement et purification, le paclitaxel est une poudre blanche à blanc-crème, peu hygroscopique. Insoluble en milieu aqueux, le paclitaxel est soluble dans certains solvants organiques comme le méthanol, l'éthylacétate, l'acétonitrile.

Il n'est pas ionisable et ne possède donc pas de pKa ni de capacité tampon. En raison de son insolubilité en milieu aqueux, le pH n'a pu être déterminé. En revanche, le coefficient de partage n-octanol/tampon pH 4, réalisé à 24°C, donne une valeur au Log de P de 3,7, confirmant la très grande lipophilie de cette molécule. (7)

## 2.2 Relation structure-activité

La structure du taxol peut être divisée en 4 secteurs :

- le «secteur nord» : implique les carbones 6 à 12,
- le «secteur sud» : comprend le carbone 14 et les carbones 1 à 5, incluant le cycle oxétanne,
- le diterpène (A et B),
- la chaîne latérale en C13 (25).

### 2.2.1 «Secteur nord»

- L'acétylation du groupe hydroxyle en position 7 conduit à un dérivé dont l'activité dans le test d'assemblage de la tubuline n'est pas significativement réduite par rapport à celle du paclitaxel. (25,28)

L'épimérisation du groupe hydroxyle conduit à un dérivé du paclitaxel de même bioactivité.

L'oxydation du groupe hydroxyle en cétone produit un dérivé instable et nettement moins actif que le paclitaxel. (28)

De plus, la désoxygénation à ce niveau, conduisant au désoxy-paclitaxel, entraîne une augmentation de la cytotoxicité. (25)

- Le dérivé 9-dihydropaclitaxel est un peu plus actif dans le test d'assemblage de la tubuline et aussi cytotoxique que le paclitaxel. (25,28)
- Le dérivé 10-désacétopaclitaxel est un peu moins actif que le paclitaxel dans 2 tests différents de cytotoxicité. (25)

Le «secteur nord» ne semble pas étroitement impliqué dans la relation structure-activité.

Ainsi la solubilité du paclitaxel en milieu aqueux pourrait être améliorée par des modifications en C7 et/ou en C10 tout en conservant son activité.

### 2.2.2 «Secteur sud»

- L'ouverture du cycle oxétanne, soit par oxydation, soit par des réactifs électrophiles, donne des dérivés inactifs dans les tests de cytotoxicité. (25)
- Le dérivé 4-désacétylpaclitaxel a une activité largement modifiée, que ce soit dans le test d'assemblage de la tubuline ou dans les tests de cytotoxicité. (25)
- Le dérivé 2-débenzoyloxy-paclitaxel, ainsi que les analogues 2-débenzoyl-2-acylpaclitaxel sont inactifs. Le dérivé 2-débenzoyl-2-(m-azidobenzoyl) paclitaxel est jusqu'à 500 fois plus actif que le paclitaxel dans certains tests d'assemblage de la tubuline et de cytotoxicité. (25)

Contrairement au «secteur nord», le «secteur sud» est nettement impliqué dans la relation structure-activité du paclitaxel. Le cycle oxétanne, le groupe acétyle en C4 et le groupe benzoyle en C2 apparaissent indispensables à l'activité du taxol.

### 2.2.3 Le diterpénoïde (A et B)

- La contraction du cyclohexène A en cyclopentène par méthylation conduit à un dérivé dont l'activité dans le test d'assemblage de la tubuline est comparable à celle du paclitaxel, mais dont la cytotoxicité vis à vis des cellules KB est moindre.
- La contraction du cycle B mène à des dérivés dont la cytotoxicité est proche de celle du paclitaxel. (25)
- L'ouverture du cycle A et un pont oxyde entre C1 et C10 donne un dérivé 20 fois moins actif que le paclitaxel.

Le diterpénoïde est relativement impliqué dans la relation structure-activité. Des modifications de l'un ou l'autre des cycles ne semblent pas jouer un grand rôle. En revanche, lorsqu'elles touchent les 2 cycles à la fois, l'activité est nettement diminuée.

#### 2.2.4 La chaîne latérale en C13

- Une modification de la stéréochimie des groupements hydroxyle et amine de la chaîne latérale, diminue l'activité. (25)
- La perte du groupe 3'-phényle conduit à des dérivés nettement moins actifs. (25)
- De nombreuses modifications du groupe N-benzoyle ont été effectuées et étudiées. L'une d'elle a abouti au docétaxel, dont l'activité cytotoxique sur les cellules J774-2 et P388 est supérieure à celle du paclitaxel. De plus, cette molécule est active sur les cellules résistantes au taxol.  
L'absence du groupe benzoyle conduit à des dérivés biologiquement inactifs. (28)

La chaîne latérale en C13 a un impact important dans la relation structure-activité. Son absence conduit à une perte d'activité.

La présence du groupe phényle en C3' sans substituant autre que les hydrogènes, est nécessaire, ainsi que le groupe hydroxyle en C2', tandis que les autres substituants de la chaîne sont moins impliqués dans cette relation structure-activité.

## 2.2.5 Conclusion

Tous ces points sont résumés sur la Figure 2 .

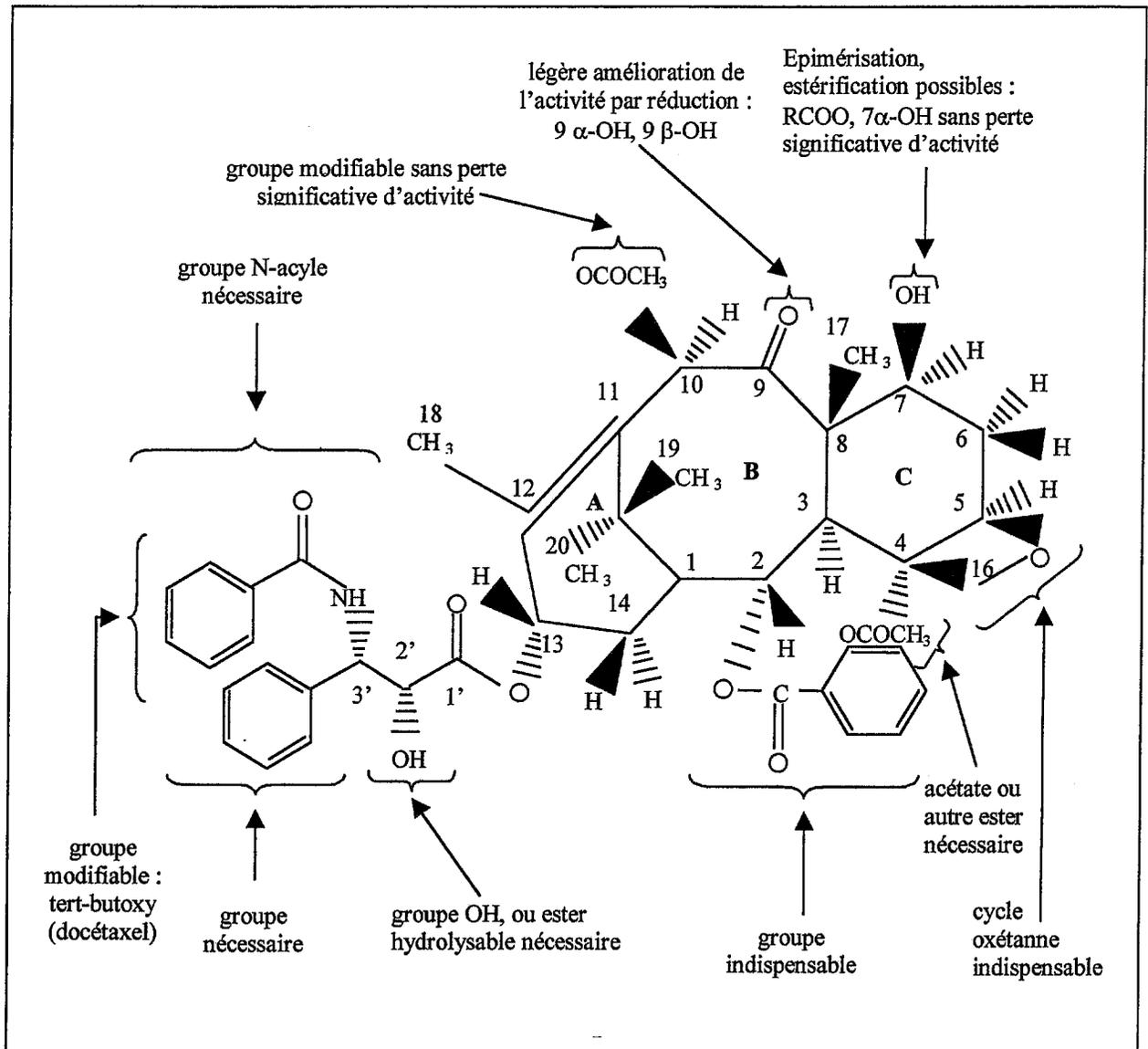


Figure 2 : Relation structure-activité du paclitaxel. (25)

### 3 PROPRIETES DU TAXOL

#### 3.1 Mécanisme d'action

C'est en 1979 que Susan B. Horwitz a décrit le mécanisme d'action du paclitaxel : celui-ci est unique car, à l'inverse d'autres agents antimitotiques tels que la vincristine ou la colchicine qui induisent le désassemblage des microtubules, le paclitaxel favorise l'assemblage des dimères de tubuline et la polymérisation des microtubules. (27,52,47,57,23,67) Il inhibe la réplication des cellules eucaryotes en les bloquant en phase G2 ou M du cycle mitotique. (27,22) L'index mitotique des cellules leucémiques P388 traitées par le paclitaxel est plus élevé que celui des cellules non traitées. (67)

En présence de paclitaxel, le cytosquelette cellulaire est altéré, et les microtubules sont anormaux en ce qui concerne leur nombre et leur aspect. Ceci entraîne une perte de la polarité du fuseau mitotique, une rupture chromosomique, et la mort de la cellule. (27)

La tubuline est une protéine omniprésente dans les cellules eucaryotes. Elle est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires importants tels que la constitution du fuseau mitotique, le transport axonal, la régulation de la forme cellulaire, la sécrétion cellulaire et la constitution des cils et flagelles. (39,55,21)

Cette protéine est un dimère ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) de poids moléculaire 110 000, en équilibre avec une forme polymérisée appelée microtubule (figure 3).

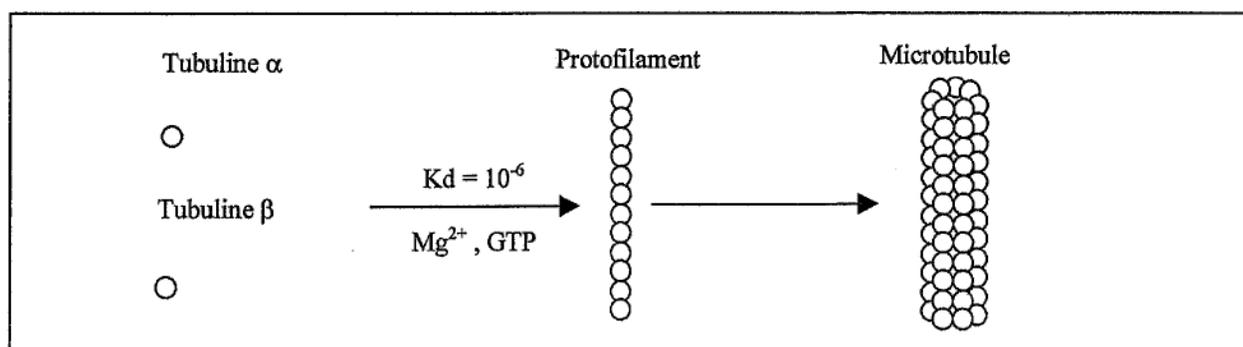
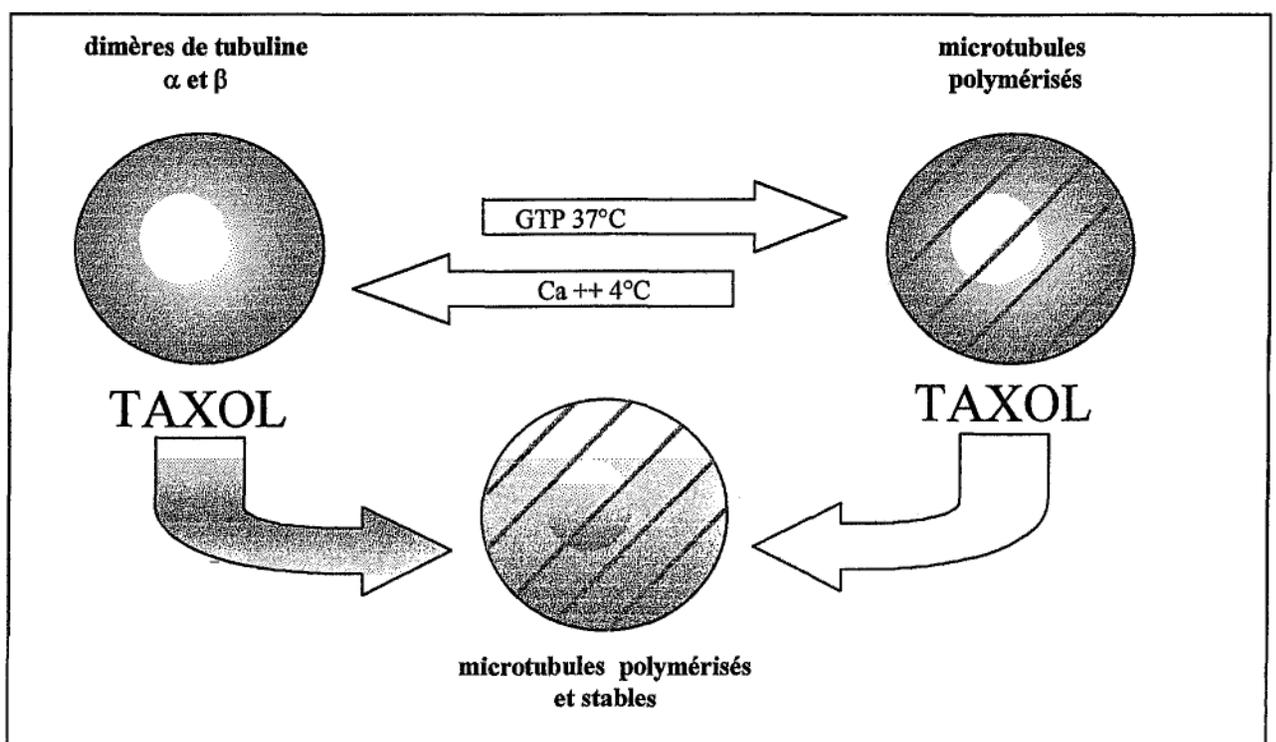


Figure 3 : Polymérisation d'un microtubule. (39)

Le paclitaxel rompt cet équilibre en faveur des microtubules : il diminue la concentration critique de tubuline nécessaire pour induire la polymérisation, et augmente le taux d'assemblage des dimères de tubuline en présence ou non de facteurs habituellement indispensables à cette polymérisation, tels que du GTP exogène, des Microtubules Associated Proteins (MAP), des tampons organiques ou une température élevée. (27,52,47,23,22) Cette rupture d'équilibre laisse supposer l'arrêt de la division cellulaire et des fonctions normales impliquant les microtubules. (47,22)

De plus, les microtubules formés en présence de paclitaxel présentent une plus grande stabilité : ils résistent à la baisse de température (+4°C) et à la présence de calcium (CaCl<sub>2</sub> à 4 mmol/l), conditions qui entraînent habituellement leur dépolymérisation (figure 4). Ce phénomène résulterait de l'inhibition de la réorganisation dynamique normale des microtubules. (27,47,67,22)



**Figure 4 : Mécanisme d'action du taxol. (7)**

*In vitro*, le paclitaxel, introduit dans un milieu de culture de cellules leucémiques à des concentrations qui peuvent être obtenues cliniquement, induit la formation de nombreuses zones de microtubules désorganisés, souvent alignés en amas parallèles reliés entre eux par des ponts. Ces amas se forment quelle que soit la phase du cycle cellulaire. (27,23,46) Ces effets, concentration et temps dépendants, requièrent des cellules intactes avec des taux d'ATP normaux. (47,23,67) En effet, l'observation du cytosquelette cellulaire isolé en présence de paclitaxel ne met pas en évidence d'amas de microtubules. (23) De plus, si le paclitaxel peut se lier à des cellules dont le taux d'ATP est en dessous de la normale, il n'induit pas la formation d'amas de microtubules. Il est donc probable qu'il existe des conditions cellulaires spécifiques pour la réorganisation du cytosquelette en présence de paclitaxel.

Le paclitaxel induit aussi la formation de nombreux asters anormaux durant la mitose. Ils sont réversibles après traitement, quelle que soit la sensibilité de la cellule. (47,46) Ces asters commencent à apparaître au cours des phases G2 et M du cycle cellulaire, et ne sont pas associés à une cytotoxicité significative. (47)

Les cellules leucémiques en culture avec du paclitaxel, relativement insensibles à la formation d'amas stables de microtubules, redémarrent leur mitose après un arrêt du complexe de microtubules en interphase. Ainsi, le paclitaxel, en diminuant la concentration critique de tubuline nécessaire à la polymérisation, pourrait entraîner la promotion de la nucléation aléatoire des microtubules, aboutissant à la formation de multiples asters pendant la mitose. La formation d'asters normaux, bipolaires ou multiples, limités à la mitose, implique que des facteurs soient capables de promouvoir l'élaboration des asters en phase G2/M. (47)

Une étude de Ding et coll. précise que, en plus de stabiliser la polymérisation de la tubuline, le paclitaxel est capable de stimuler la libération de cytokines : TNF (Tumor Necrosis Factor), et interleukines IL-1 et IL-2. Cette étude suggère qu'il pourrait avoir également un effet immunorégulateur. (11,7)

### 3.2 Mécanismes de résistance

Bien que le paclitaxel soit une molécule récente, 2 mécanismes de résistance cellulaire acquise ont été mis en évidence.

Le premier mécanisme concerne certaines lignées cellulaires dont les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de tubuline sont altérées : elles nécessitent la présence continue de taxol pour que l'assemblage des microtubules se produise normalement. Ces mutants compensent la présence constante de taxol en ralentissant leur rythme d'assemblage microtubulaire. Ils sont hautement sensibles aux effets cytotoxiques des autres poisons de fuseau qui déstabilisent les microtubules. (7)

Le second mécanisme de résistance acquise dépend du phénotype de multi-résistance : il implique une surexpression des glycoprotéines P membranaires qui fonctionnent de façon à maintenir une concentration intracellulaire de drogue inférieure au niveau cytotoxique.

Ce génotype peut conférer, à des degrés divers, une résistance croisée à de nombreuses classes d'anticancéreux (taxol, alcaloïdes de la pervenche, colchicine, doxorubicine, étoposide).

Cependant, ce type de résistance peut être réversible en présence d'inhibiteurs calciques, de tamoxifène, de cyclosporine A et de certains antiarythmiques. (7,50)

En ce qui concerne la résistance intrinsèque au taxol, il a été montré que la sensibilité de lignées cellulaires de leucémie humaine au taxol est directement liée à la formulation irréversible de paquets de microtubules pendant l'interphase.

Les cellules résistantes ne sont affectées que pendant la mitose et non pendant l'interphase, à l'inverse des cellules sensibles. (7)

### 3.3 Propriétés pharmacocinétiques

La pharmacocinétique du paclitaxel a été étudiée au cours de plusieurs études de phase I chez des patients atteints de tumeurs solides ou de leucémies.

#### 3.3.1 Absorption

La voie orale n'a pas montré d'absorption significative au cours d'études précliniques. C'est pourquoi aucune étude de cette voie d'administration n'est développée chez l'homme. (57)

Les pics plasmatiques au cours de 4 études de phase I atteignent en moyenne 1,5 à 6  $\mu\text{mol/l}$ . (56)

#### 3.3.2 Distribution

Le paclitaxel est fortement lié aux protéines plasmatiques, surtout à l'albumine (88%). (47)

Les études pharmacocinétiques chez l'homme montrent que le paclitaxel a un volume apparent de distribution relativement élevé, dépassant le volume d'eau totale corporelle. Ceci est révélateur de l'importance de la distribution et de la liaison du paclitaxel aux tissus, aux protéines vasculaires et aux protéines extra vasculaires, dont la tubuline, vraisemblablement. (46,4)

Des études portant sur la distribution du paclitaxel chez des souris atteintes de tumeurs montrent que le produit est très concentré dans le foie et la tumeur 24 heures après son administration. (4)

Chez un patient, les concentrations du paclitaxel dans le liquide d'ascite augmentent durant plusieurs heures après son administration, jusqu'à un maximum d'environ 40% au-dessus de la concentration mesurée dans le plasma. Ce taux se maintient pendant près de 12 heures. (56,46)

Une évaluation du passage du paclitaxel dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) est effectuée chez des patients leucémiques recevant ce produit. Aucune concentration de paclitaxel n'est détectée dans le LCR en fin de perfusion. (56,57,46)

Cependant, les premiers résultats d'études de distribution du paclitaxel radio marqué, chez les rats, montrent que les méthodes sont suffisamment sensibles pour détecter la radioactivité dans le cerveau et le système nerveux périphérique. (46)

### 3.3.3 Métabolisme

Le métabolisme du paclitaxel est hépatique. Il fait intervenir les enzymes du cytochrome P450. Le taux de paclitaxel retrouvé sous forme inchangée dans les urines humaines ne dépasse pas 5 à 10%. En revanche, aucun métabolite n'est détecté dans les urines.

C'est au niveau des excréctions biliaires que peuvent être recueillis les métabolites du paclitaxel. On en détecte cinq par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), dont trois sont identifiés par spectrométrie de masse. Deux métabolites sont mono hydroxylés, l'un en C3, l'autre en C6 du cycle taxane : c'est le 6-alpha-hydroxy-paclitaxel. Le troisième métabolite est dihydroxylé avec un groupe hydroxyle en position para du phényle en C3' de la chaîne latérale en C13, et un groupe hydroxyle en C6 du cycle taxane.

Chez des patients recevant de fortes doses de paclitaxel, le métabolite 6-alpha-hydroxy-paclitaxel est retrouvé dans le plasma. Ce métabolite semble détectable dans le plasma uniquement lorsque les concentrations plasmatiques de paclitaxel sont élevées. L'hypothèse avancée pour expliquer ce fait est que le 6-alpha-

hydroxy-paclitaxel formé, en principe éliminé en majorité directement dans la bile, serait présent dans le plasma par un processus de surplus dû soit à une saturation relative, soit à un blocage de l'élimination biliaire. (37)

Cresteil et coll. ont récemment étudié l'implication des enzymes du cytochrome P450. Ils évaluent *in vitro* la formation de métabolites dans des microsomes hépatiques humaines mis en présence de paclitaxel. Ils retrouvent deux métabolites NADPH-dépendants, identiques à ceux détectés dans l'excrétion biliaire. La différence dans le taux de formation de ces deux métabolites les amène à conclure que différentes isoenzymes du cytochrome P450 interviennent dans le métabolisme du paclitaxel. Ainsi, le 6-alpha-hydroxy-paclitaxel résulterait de l'intervention de l'isoenzyme CYP2C, tandis que l'autre métabolite serait plutôt formé par le CYP3A.

A partir de ces résultats, il serait possible de prédire les interactions pharmacocinétiques avec des médicaments inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques, tels que les anti-H2, les corticostéroïdes et le kétoconazole, coprescrits avec le paclitaxel. Une étude de Klecker et coll. montre que seul le kétoconazole a un effet en diminuant l'élimination biliaire du paclitaxel de 25%. (57)

Les caractéristiques pharmacocinétiques du paclitaxel sont résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Résumé des paramètres pharmacocinétiques du paclitaxel. (46)**

Dose (mg/m <sup>2</sup> )	Perf.	Modèle	Demi-vie (heure)		Clairance systémique (ml/min/m <sup>2</sup> )	Pic plasma. (µmol/l)	VD (l/m <sup>2</sup> )	*Tps moyen de présence dans la circ. sang. (heure)	Urine (% dose)
			Alpha	Bêta					
175-275	6	Biphasique	0,49	4,3	232	2,0-6,7	48,5	11,8	8,2
175-275	6	Biphasique	0,32	8,6	100	3,2-8,1	55	8,6	5,2
200-275	24	Biphasique	0,27	3,9	993	0,6-0,94	182	19,9	1,4
15-40	1-6/j 5j	Biphasique	-	1,3	833	0,06-0,37	81	-	6,6
60-265	1-6	Biphasique	0,27	6,4	253	1,3-13,0	67	5,6	5,9
250-390	24	-	-	-	-	1,6-3,5	-	-	-
120-160	96	-	-	-	478	0,053-0,077	-	-	-
En moyenne		-	0,34	4,9	482	-	87	11,5	5,5

Perf : durée de perfusion ; j=jour

Pic plasma : concentrations au pic plasmatique ; VD : volume de distribution

\* = temps moyen que passe le paclitaxel dans la circulation sanguine

## **4 INDICATIONS**

### **4.1 Indications faisant l'objet d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché)**

#### **4.1.1 Cancer de l'ovaire**

Le taxol est indiqué, seul ou en association avec le cisplatine, dans le traitement des carcinomes avancés de l'ovaire :

- ✓ en traitement de première intention du cancer de l'ovaire chez les patientes présentant une maladie avancée ou résiduelle (>1 cm), après laparotomie initiale, en association avec le cisplatine,
- ✓ en traitement de deuxième intention du cancer de l'ovaire chez les patientes présentant un carcinome métastatique de l'ovaire après échec du traitement classique à base de sels de platine. (7)

#### **4.1.2 Cancer du sein métastatique**

Le taxol est aussi indiqué pour le traitement des carcinomes métastatiques du sein pour les patientes en échec, ou non candidates au traitement classique à base d'anthracycline. (7)

## 4.2 Autres investigations

Le taxol est inclus dans les études concernant d'autres localisations cancéreuses.

### 4.2.1 Cancer du poumon

Le taxol est testé dans le traitement des stades avancés du cancer du poumon non à petites cellules au cours d'essais cliniques de phase II. (7)

### 4.2.2 Cancer de la vessie

Dans ce cas, il est à l'étude, en essais cliniques de phase II, chez des patientes résistant aux autres chimiothérapies. (7)

Le taxol est également à l'étude pour le cancer de l'estomac, le cancer épidermoïde, le cancer du foie, le sarcome de Kaposi, le cancer de l'œsophage, le cancer du testicule.

Les résultats des diverses études cliniques indiquent que le paclitaxel a un avenir très prometteur dans son utilisation en association avec d'autres agents anticancéreux. (7)

## 5 TOXICITES

Le paclitaxel, comme tout agent anticancéreux, présente une certaine toxicité. Dans les premières études cliniques de phase I, les réactions d'hypersensibilité représentent la principale toxicité, que ce soit en fréquence ou en intensité. Celles-ci étaient principalement dues à l'excipient, le Crémophor EL. Des protocoles systématiques de prévention, vis à vis de ces réactions, ont alors été mis en place. C'est donc la myélosuppression qui devient la toxicité la plus rencontrée, suivie de la neuropathie. (38)

### 5.1 La myélosuppression (5,27)

La myélosuppression est l'effet indésirable le plus fréquent du taxol. Elle se manifeste le plus souvent par une neutropénie : elle survient entre le septième et le quinzième jour après administration du taxol, et le retour à la normale s'effectue après 3 à 10 jours. Certaines patientes peuvent déclarer parallèlement un épisode infectieux.

Lors des essais cliniques de phase III, 2 épisodes septiques fatals ont été observés aux posologies et schémas de perfusion recommandés (175mg/m<sup>2</sup> ; perfusion de 3H).

La myélosuppression est moins sévère lorsque la durée de la perfusion est de 3H plutôt que de 24H. Et la brièveté de la neutropénie semble limiter les risques de complications infectieuses.

Sarosy et coll. démontrent l'intérêt de l'utilisation des facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF) à la posologie de 5 à 10 µg/kg/jour en sous-cutané : l'administration doit commencer 24 H après celle du paclitaxel, et se prolonger jusqu'au retour d'un taux acceptable de leucocytes (1000 à 1500/µl). (48)

Les autres toxicités hématologiques (thrombocytopénie et anémie) sont rares. La thrombocytopénie est généralement brève, et ne nécessite pas, en principe, de transfusion de plaquettes. (51)

L'incidence et la sévérité de l'anémie sont fonction du taux d'hémoglobine avant traitement. (5)

## 5.2 Neurotoxicité

C'est la principale toxicité non hématologique. Elle apparaît chez des patients prétraités et recevant de très hautes doses uniques ou cumulées, et chez des patients recevant du paclitaxel en association avec d'autres antinéoplasiques potentiellement neurotoxiques (tel que le cisplatine). Les manifestations sont diverses, avec neuropathie du système nerveux autonome (SNA), myopathie et effets sur le système nerveux central (SNC). (48,45)

### 5.2.1 Neuropathie sensitive

C'est l'effet indésirable le plus commun du paclitaxel : il se manifeste par une paresthésie. (27,45,48)

La neuropathie est systématique dès que l'on dépasse la posologie de 250mg/m<sup>2</sup> (en perfusion de 24H, seul ou associé avec le cisplatine). (27,48)

Les symptômes initiaux les plus rencontrés sont engourdissement, élancements, picotements et sensations de brûlures au niveau des extrémités. Le plus souvent, ils touchent d'abord les membres inférieurs, mais ces sensations peuvent apparaître en même temps dans les supérieurs et inférieurs. Il peut y avoir une

diminution de la sensibilité fine (difficulté à boutonner les vêtements, à mettre les bijoux), et instabilité de la démarche. (27,48,51)

Généralement, les symptômes sont symétriques, mais ils peuvent parfois être asymétriques d'évolution symétrique. (48)

Ils peuvent débiter dans les 24 à 72 heures après une seule administration de paclitaxel de plus de 250mg/m<sup>2</sup>, mais le plus souvent la neurotoxicité est cumulative avec des symptômes qui évoluent après chaque nouvelle cure, que la posologie soit faible ou élevée.

Lorsque les symptômes sont modérés, ils s'améliorent ou disparaissent en quelques mois après l'arrêt du traitement. Cependant, ils peuvent persister plus longtemps dans le cas de neuropathies sévères et durent plus d'un an chez des patients diabétiques (patients à risque). (27,48)

Le traitement symptomatique de la neuropathie peut se faire par l'amitriptyline, qui améliore les symptômes résiduels, ou par un analgésique morphinique.

### 5.2.2 Neuropathie motrice

Elle est rarement symptomatique mais se voit fréquemment à l'examen électroneurophysiologique. Certains patients ont une légère faiblesse des muscles extenseurs des orteils. D'autres subissent une réduction moyenne de l'amplitude du potentiel d'action du nerf péronier d'environ 39%. (48)

### 5.2.3 Troubles du SNA

Ils sont représentés par un iléus paralytique et une hypotension symptomatique chez des patients traités par des posologies élevées de paclitaxel (250 à 275 mg/m<sup>2</sup>).

Ils pourraient être responsables de troubles cardiaques. (48)

### 5.2.4 Myopathies

Elles se manifestent par des myalgies transitoires ou par des arthralgies. Elles apparaissent 2 à 3 jours après la cure de paclitaxel et disparaissent généralement en 5 à 7 jours. (48,32)

Elles débutent d'abord dans les grandes articulations, le dos et les jambes, mais peuvent d'emblée atteindre l'ensemble du corps. (32)

Les muscles long axiaux (essentiellement ceux de l'épaule et para spinaux) sont fréquemment impliqués.

Les examens révèlent des signes d'inflammation et une élévation de la créatine phosphokinase plasmatique (CPK). (48)

Les symptômes des myopathies peuvent être traités ou calmés par du paracétamol et/ou des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans le cas où ils seraient légers à modérés, ou par des analgésiques morphiniques si les troubles sont plus sévères. (32)

### 5.2.5 Toxicité au niveau du SNC

Il a été observé quelques rares cas de crises de grand mal lors des premiers essais.

Cependant une étude menée chez les rongeurs ne met pas en évidence de niveau détectable de paclitaxel dans le cerveau, et montre des concentrations négligeables dans le liquide céphalo-rachidien.

Le passage du paclitaxel au niveau de la barrière hématoe encéphalique peut donc être considéré comme négligeable. (48)

### 5.3 Réactions d'hypersensibilité

Les symptômes apparaissent le plus souvent dans les minutes suivant la perfusion. Les principaux sont : l'hypotension, la détresse respiratoire avec dyspnée et bronchospasme, et l'urticaire. Mais cela peut être aussi : un rash cutané, un flush, des douleurs abdominales, des douleurs au niveau des extrémités (correspondant à une hypoperfusion vasculaire), un angiooedème et une asystole pouvant conduire au décès. (27,48,65)

Ces symptômes suggèrent une réaction d'hypersensibilité de type I, avec intervention des Ig E. Cependant, étant donné qu'environ la moitié de ces réactions peuvent apparaître dès la première cure (absence donc de sensibilisation initiale), il pourrait s'agir d'un processus anaphylactoïde, lié à un relargage direct d'histamine et/ou d'autres substances vaso-actives à partir des mastocytes et des basophiles.

Il est difficile de savoir si la cause de ces réactions est le paclitaxel, le crémophore EL ou l'association des deux, même si le crémophore semble le plus impliqué. En effet, injecté au chien, il est toxique par induction du relargage d'histamine et hypotension conduisant à la mort. (27,48,65)

Il existe deux possibilités pour limiter ces réactions d'hypersensibilité : un schéma de perfusion long (24H), ou une prémédication adaptée (fondée sur celle des produits de contraste iodés). (27)

Le NCI propose un certain nombre de recommandations.

❖ Prémédication :

- dexaméthasone 20 mg intraveineux ou oral, 12H et 6H avant le paclitaxel,
- diphenhydramine (antihistaminique H1) 50 mg intraveineux 30 minutes avant le paclitaxel,
- antihistaminiques H2 intraveineux 30 minutes avant la paclitaxel (par exemple, cimétidine 300mg, ranitidine 50 mg, ou famotidine 20 mg). (48,32)

Toutefois, la prémédication n'est pas totalement protectrice. Il subsiste encore environ 10% de réactions. (27,65)

❖ Traitement des réactions majeures :

- arrêt de la perfusion du taxol,
- diphenhydramine 25-50 mg intraveineux,
- médicaments hypertenseurs, liquide de remplissage, épinéphrine,
- dexaméthasone 20mg intraveineux toutes les 6 heures tant que les symptômes persistent.

❖ Traitement pour les réactions mineures :

- diphenhydramine 50mg intraveineux toutes les 4 à 6 heures,
- traitement symptomatique. (48)

Il est prudent de ne pas réadministrer de taxol s'il y a eu intolérance. (48)  
Cependant, sa réadministration est possible certaines conditions.

❖ Conditions de réadministration :

- dexaméthasone 50mg intraveineux toutes les 6 heures, 4 injections, la dernière 30 minutes avant le paclitaxel,
- cimétidine 300mg intraveineux 30 minutes avant le paclitaxel,
- la solution de paclitaxel doit être administrée à 10% de la vitesse requise pour une perfusion de 24 heures, ceci pendant 2 heures. En l'absence de réaction, la vitesse peut être progressivement augmentée pendant les 6 heures suivantes, jusqu'à la vitesse requise pour une perfusion de 24 heures,
- si la quantité de paclitaxel administrée avant la première réaction d'hypersensibilité est négligeable, il est possible d'administrer à nouveau la totalité de la posologie prévue,
- si cette quantité est élevée, il ne faut réadministrer que l'équivalent de la quantité restante au moment de la réaction. (48).

Ces recommandations permettent de réduire considérablement l'incidence et la sévérité des réactions d'hypersensibilités. (27,48,32)

## 5.4 Cardiotoxicité

Le paclitaxel est responsable de différents troubles cardiaques. (48) Le plus commun est la bradycardie asymptomatique transitoire avec moins de 40 battements par minutes. (48,3)

Il existe aussi des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, des tachycardies ventriculaires, des blocs de branche gauche. La sévérité des troubles est rare et généralement sans conséquence.

Là encore, il est difficile d'attribuer la toxicité à une des molécules impliquées, en particulier. Il n'est pas exclu que le Crémophor EL joue un rôle dans la cardiotoxicité, soit par son importante quantité par unité thérapeutique de paclitaxel, soit en provoquant le relargage d'histamine. L'histamine libérée stimule sélectivement les récepteurs H1 et H2 cardiaques, entraînant une augmentation de la demande en oxygène du myocarde et une vasoconstriction coronarienne (récepteurs H1) associée à un effet chronotrope (récepteur H2). De plus, chez l'animal, la stimulation des récepteurs H1 cardiaques provoque une conduction auriculo-ventriculaire prolongée, une dépression de la conduction au niveau du réseau de Purkinje, des lésions des cellules myocardiques et une arythmie ventriculaire. Ceci pourrait expliquer le large éventail de manifestations cardiaques observées durant l'administration de taxol. (27,48,49)

Enfin, les antihistaminiques H2 administrés pour la prévention des réactions d'hypersensibilité, sont connus pour provoquer des anomalies du rythme cardiaque de type bradycardie, et des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire. (48,49)

Le mécanisme de cardiotoxicité n'est pas encore connu : il peut s'agir d'une altération de la conduction myocardique ou d'un contrôle extra cardiaque du SNA.

## 5.5 Toxicité digestive

Cette toxicité se manifeste le plus fréquemment par une anorexie, des nausées et vomissements, une diarrhée. L'anorexie n'apparaît qu'aux fortes doses, entre deux cures. Elle est généralement brève (environ une semaine) et peu sévère. Quant aux nausées, vomissements et diarrhées, ce sont des effets généralement brefs et peu sévères, touchant 25 à 60% des patients, et nécessitant rarement un traitement symptomatique. L'incidence de ces troubles est inconstante et liée au site du cancer, à ses symptômes et aux antécédents de thérapie émétique. Dans l'ensemble, ces troubles gastro-intestinaux répondent bien à la diététique et/ou aux traitements médicamenteux quand ils sont nécessaires. (32)

Mais l'effet le plus invalidant est la mucite. Elle est liée à la dose de paclitaxel et à l'exposition prolongée. Les symptômes sont précoces avec sécheresse buccale, brûlure et érythème de la muqueuse orale. La mucite peut s'étendre avec des douleurs ulcéreuses de l'oropharynx, de l'œsophage et même de l'intestin dans certains cas. (27,32)

La prévention des mucites passe par des soins dentaires méticuleux, l'utilisation de solutions salines de rinçage. Il faut éviter les produits à base de peroxyde d'hydrogène ou d'alcool.

Si la prévention est insuffisante, il est possible d'utiliser de la lidocaïne visqueuse seule ou associée à la diphenhydramine et/ou des antiacides. Si c'est encore insuffisant, l'utilisation d'analgésiques morphiniques, soit en bolus, soit en perfusion continue, est efficace. (32)

## 5.6 Toxicité cutanée

Elle est essentiellement représentée par l'alopecie et la perte de tout le système pileux. C'est une toxicité réversible, liée à la dose et qui touche la plupart des

patients, avec perte de cheveux soudaine et complète entre le quatorzième et le vingt et unième jour après une perfusion de 24 heures de taxol. (48)

## **5.7 Toxicité locale**

L'administration du taxol peut occasionner des effets indésirables locaux tels qu'érythème, sensibilité, tâche ou induration cutanée au niveau du site d'injection, gêne pendant la perfusion au niveau de la veine où le produit est injecté.

Il existe des effets retard qui apparaissent 1 à 3 semaines après le traitement, et qui peuvent persister indéfiniment. En cas d'extravasation, il peut y avoir des effets à court et à long terme.

A court terme, il s'agit d'une inflammation dans la zone d'extravasation avec douleurs, œdème, érythème, apparence brune et rugueuse de la peau.

A long terme, il est possible d'observer un épaissement cutané permanent au site d'extravasation.

Cependant, pour la plupart des patients, les symptômes se résorbent complètement. (48,32)

## **5.8 Autres effets indésirables**

Il a été noté une fatigue, des maux de tête, une dysgueusie et une augmentation mineure des enzymes hépatiques et/ou des marqueurs de la fonction rénale. Mais ces troubles sont rares. (48)

## 5.9 Conclusion

Le paclitaxel s'avère être une molécule relativement toxique, mais guère plus que d'autres agents anticancéreux. Certaines toxicités peuvent être limitées : c'est le cas des réactions d'hypersensibilité et des neutropénies.

## 6 SOURCES CHIMIQUES D'APPROVISIONNEMENT EN TAXOL

Un problème majeur est rapidement apparu : il s'agit de l'approvisionnement en taxol. L'écorce de *Taxus brevifolia* est, au départ, la seule source de taxol. 1 kg de taxol est obtenu à partir de 10 000kg d'écorce, soient 3 000 arbres. (2) Sachant que 2 g de taxol sont nécessaires pour traiter un patient, on comprend bien que les quantités de taxol produites par les ifs sont trop faibles. Etant donné le nombre d'ifs nécessaires, leur abattage obligatoire, et la lenteur de leur croissance, il a fallu trouver d'autres méthodes de production.

Différentes équipes de chimistes se sont alors penchées sur le problème. Comment synthétiser le taxol ? Deux voies semblent alors possibles : la synthèse totale du taxol, et l'hémi-synthèse à partir de précurseurs du taxol.

### 6.1 Synthèse totale

Du fait de la complexité de la molécule de taxol, sa synthèse totale n'a pas été une tâche facile. (28) Beaucoup de chercheurs ont travaillé sur cette possibilité. A l'heure actuelle, cette synthèse a été réalisée par cinq groupes différents. (39)

Lorsque l'on veut synthétiser une molécule aussi complexe que celle du taxol, deux approches sont envisageables : la synthèse convergente ou la synthèse linéaire. Dans la synthèse convergente, on commence par fabriquer plusieurs petits fragments que l'on associe pour former le produit désiré. Dans la synthèse linéaire, au contraire, on part d'un petit composé que l'on modifie progressivement. (42)

Un autre aspect est aussi à considérer lors de cette synthèse : il s'agit de la chiralité de la molécule. Les molécules d'origine naturelle ne sont pas toujours superposables à leur image dans un miroir. Et souvent, seulement l'un des deux énantiomères est

pharmacologiquement actif. Aussi les chimistes ne cherchent-ils à produire qu'une seule de ces formes. Pour cela il faut, dès le début du travail, sélectionner des éléments chimiques qui ont la configuration appropriée, et maintenir cette orientation tout au long de la synthèse. Cette procédure limite le choix des composés initiaux, ce qui réduit les potentialités de la synthèse. Pour éviter cette contrainte et garder la possibilité de construire les deux énantiomères, on peut utiliser une technique dite de résolution, qui permet de distinguer les deux énantiomères et ne sélectionner la configuration appropriée que vers la fin de la synthèse. (42)

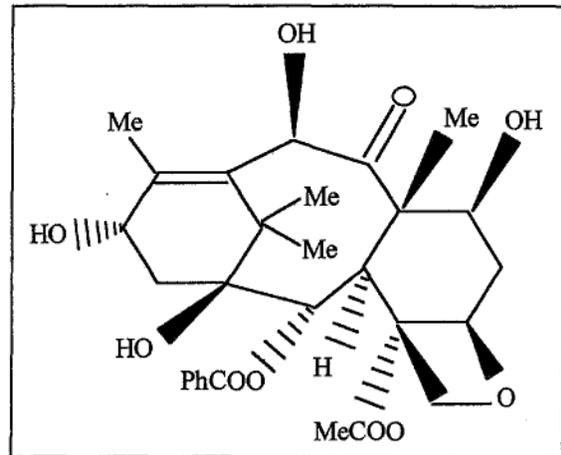
Même si ces différentes voies de synthèse ont abouti, elles n'interviendront vraisemblablement pas comme source de paclitaxel : en effet, leur application sur le plan industriel paraît difficilement réalisable au vu du nombre important d'étapes (minimum 40). Ces synthèses seront plutôt impliquées dans la préparation de dérivés taxanes de plus grande efficacité que celle du paclitaxel, dans une meilleure connaissance de la relation structure-activité et dans une amélioration de la liaison des nouveaux taxoïdes aux microtubules. (25,34)

## **6.2 Hémi-synthèse**

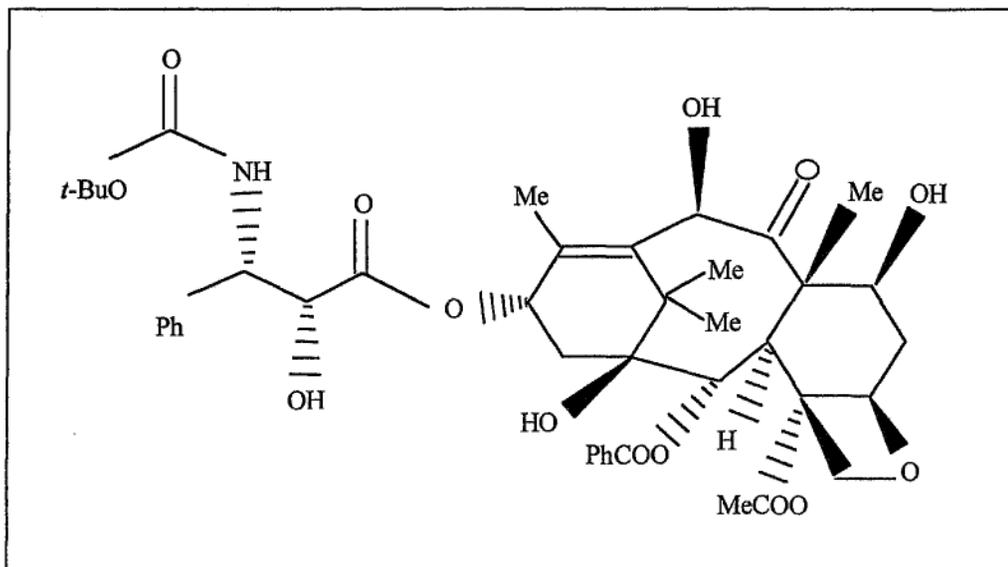
La synthèse totale du taxol se révélant très ardue, de nombreux chimistes se sont penchés sur son hémi-synthèse à partir de ses précurseurs.

L'équipe de Potier, à Gif-sur-Yvette, découvre au début des années 80 un précurseur du taxol, la 10-désacétylbaccatine III (DAB, représentée sur le Figure 5), isolé des aiguilles de l'if européen (*Taxus baccata*). Celles-ci se régénèrent rapidement, leur récolte est donc sans danger pour l'espèce. L'extraction d'1 kg d'aiguilles fraîches conduit à 1 g de DAB. (42)

**Figure 5 :**  
**Formule chimique du 10-**  
**désacétyl baccatine III. (16)**



De plus, c'est au cours de leurs travaux sur l'hémi-synthèse du taxol que Potier et coll. ont découvert en 1986 un analogue du paclitaxel, le docétaxel (Taxotère®), anticancéreux ne présentant que deux différences par rapport au taxol : les groupements acétoxy en C10 et benzamide en C3' sont remplacés respectivement par les fonctions hydroxyle et carbamate de tert-butyle (figure 6).



**Figure 6 : Formule chimique du Taxotère®. (62)**

Une fois la 10-désacétylbaccatine III découverte, deux problèmes restaient à résoudre : synthétiser la chaîne latérale N-benzoyl-3-phénylisosérine et trouver un procédé pour rattacher cette chaîne en C13 de la baccatine. La réactivité du groupe hydroxyle en C13 est faible du fait d'un environnement encombré, et de l'existence d'une liaison hydrogène entre ce groupe hydroxyle et le groupe acétyle en C4. (25,2)

Le premier développement a été conçu par le groupe de Potier à Gif-sur-Yvette, en réalisant une synthèse partielle du taxol à partir des dérivés 13-cinnamoyl. (53,17) La 10-DAB-III est d'abord protégée en C7 et C10 par des groupements trichloroéthoxycarbone, puis estérifié avec l'acide cinnamique. (15) Le cinnamate obtenu est soumis à l'hydroxyamination vicinale de Sharpless, et conduit à la formation de deux paires de régioisomères (figure 7). Mais le manque de régio et stéréosélectivité a rendu cette voie de synthèse peu attractive pour subvenir aux besoins d'approvisionnement. Cependant, elle a tout de même permis la découverte du taxotère.

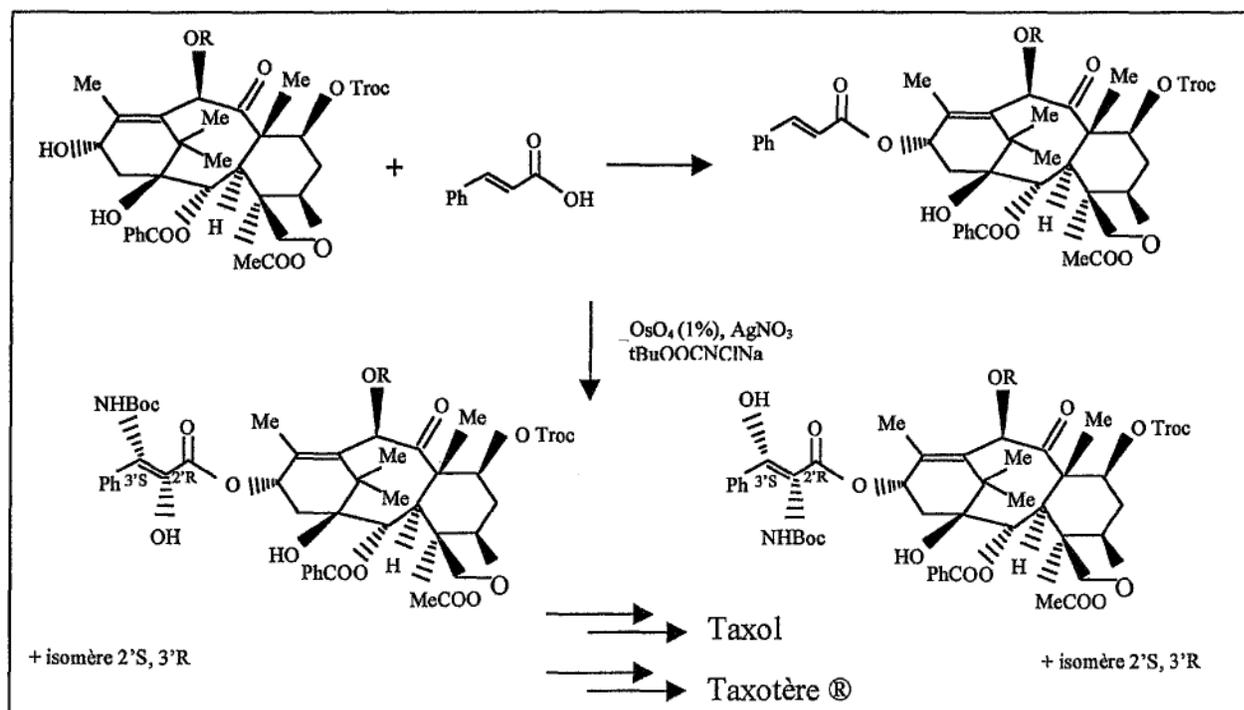


Figure 7 : Héli-synthèse du taxol et du Taxotère ® selon Potier. (9)

Ce n'est qu'en 1986 que Potier et Greene mettent au point l'hémi-synthèse du taxol à partir de la 10-DAB-III, grâce à la triéthylsilylation hautement régiosélective de la fonction OH en C7 de la 10-DAB-III. (47) Le traitement acide final fournira le taxol (figure 8). Cette hémi-synthèse servira de protocole standard pour d'autres procédés développés plus tard. (39)

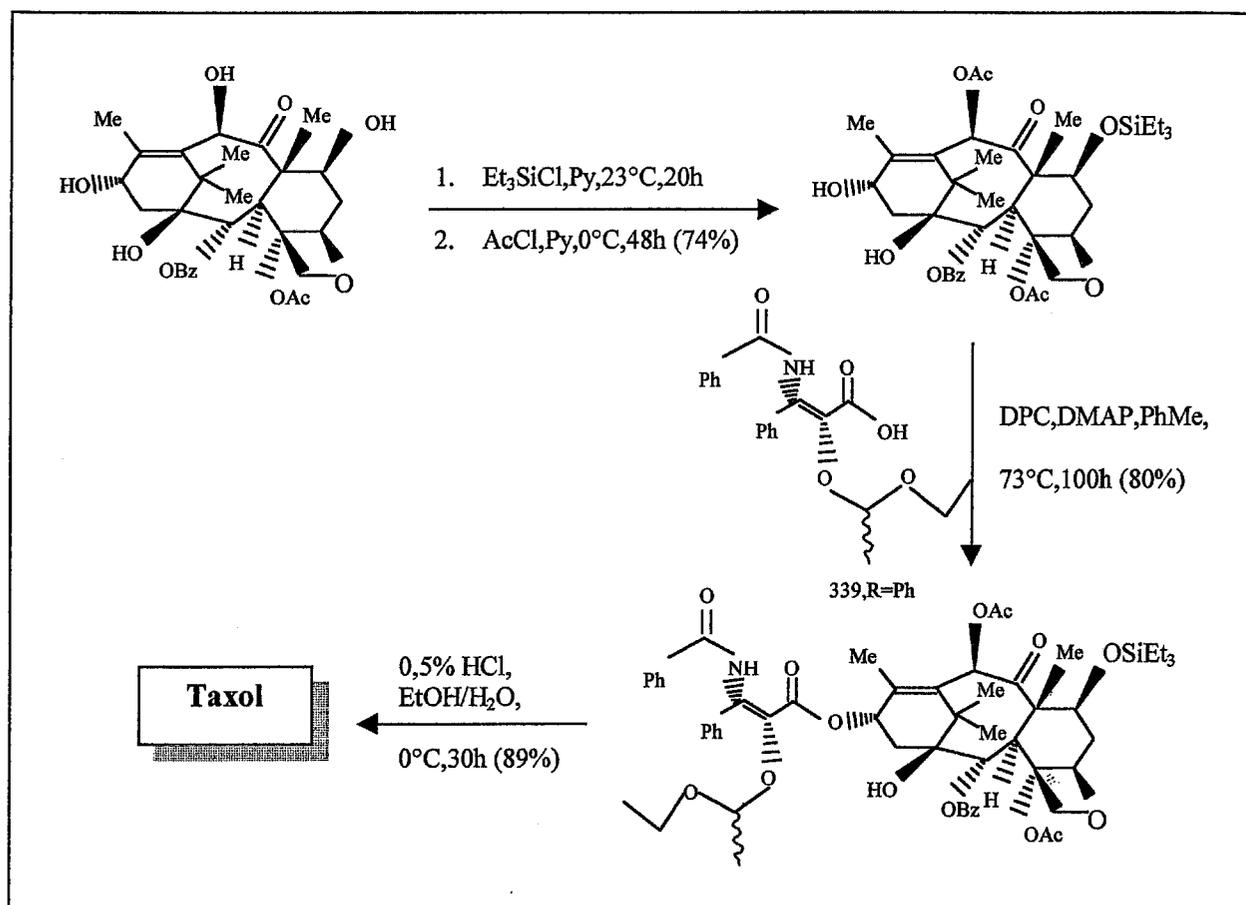
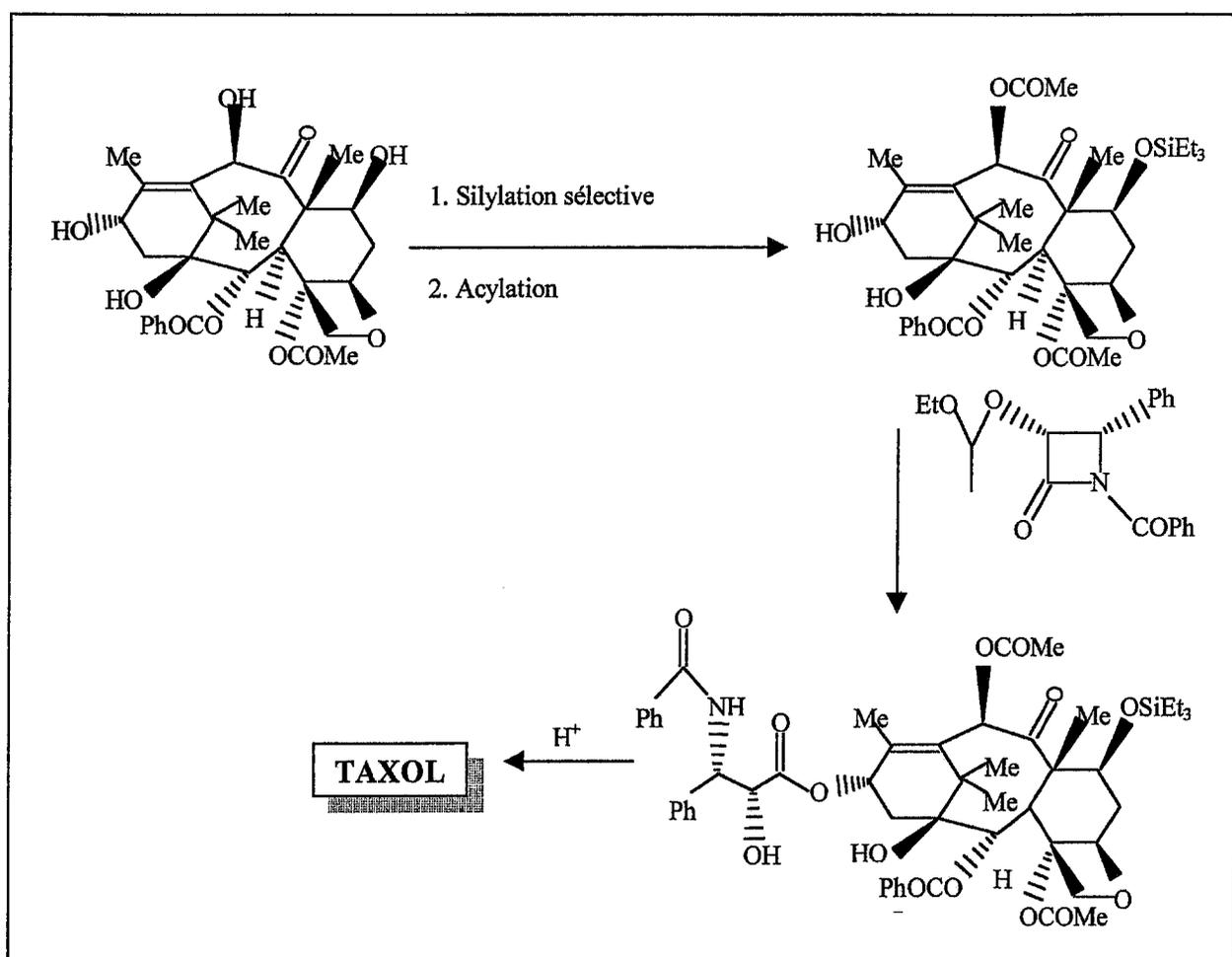


Figure 8 : Hémi-synthèse du taxol par Potier et Greene. (39)

En 1990, Holton et coll. utilisent des  $\beta$ -lactames N-acylées comme réactifs clés. Le groupe hydroxyle en C7 est protégé par silylation. Puis le DAB est mis en présence d'un  $\beta$ -lactame qui réagit avec le groupe hydroxyle en C13, avec ouverture du cycle  $\beta$ -lactame. Le produit obtenu est ensuite déprotégé au niveau du C7 (figure 9). Cette héli-synthèse atteint un haut rendement et les laboratoires Bristol-Myers Squibb l'utilisent afin de produire du paclitaxel en quantité significative, à partir de la fin de l'année 1993. (25)



**Figure 9 : Héli-synthèse du taxol selon la méthode de Holton et coll. (25)**

Chez Rhône Poulenc Rorer, Commerçon et coll. synthétisent le Taxol® et le Taxotere® grâce à des oxazolidines, issues de la N-benzoyl-3-phénylisosérine, et rattachées à la 10-désacétylbaccatine III. Taxol® et Taxotere® seront obtenus après N-acylation et O-déprotection (figure 10). (16)

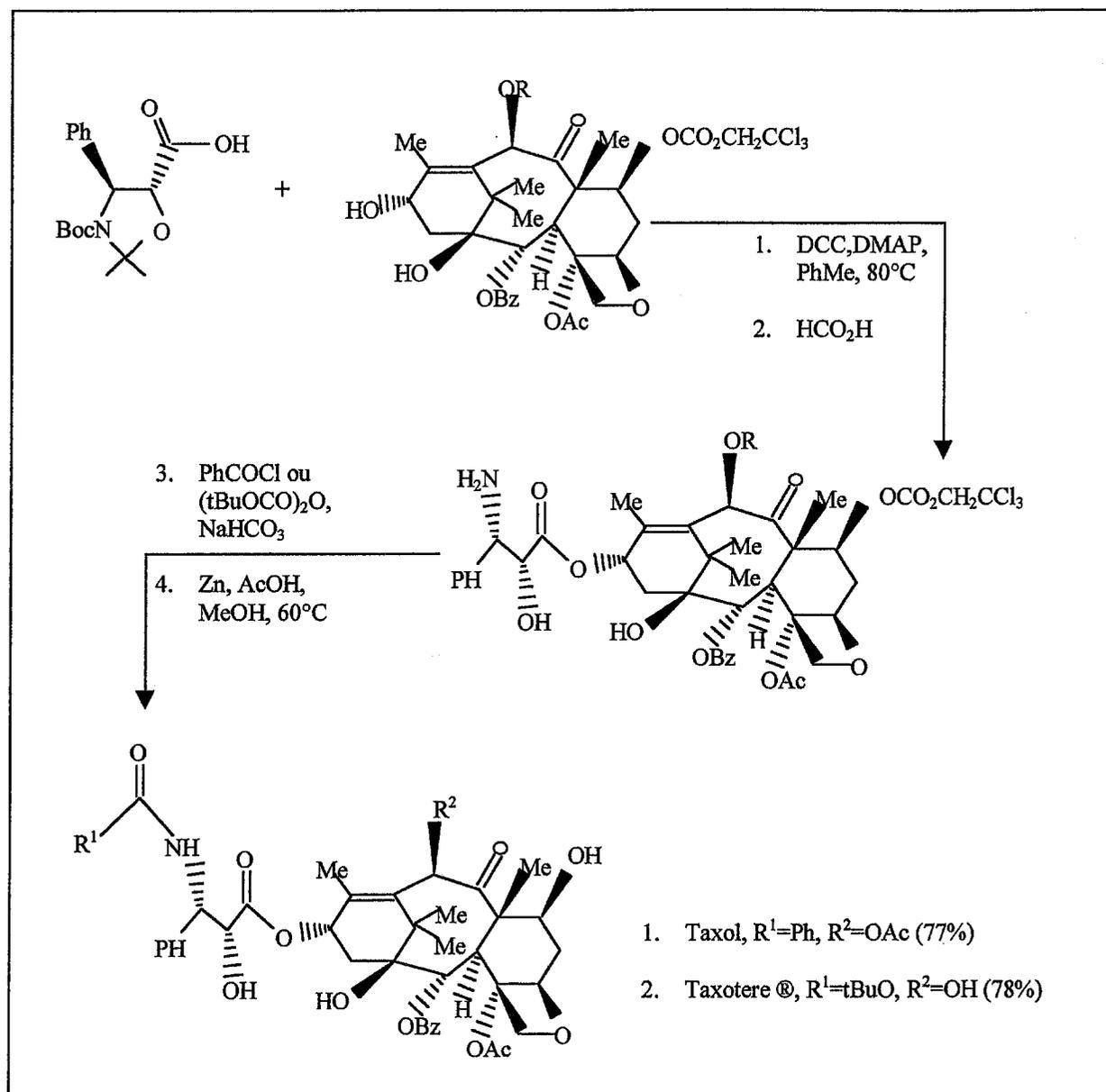


Figure 10 : Héli-synthèse du taxol et du Taxotere® par Commerçon. (39)

Récemment, Gennari et coll. (université de Milan) ont mis au point une nouvelle méthode d'estérification très efficace, utilisant les thioesters. (15) Ceux-ci sont beaucoup plus réactifs que leurs analogues oxygénés, et sont synthétisés stéréosélectivement par couplage entre un énolate de bore de thioester, et une imine (figure 11).

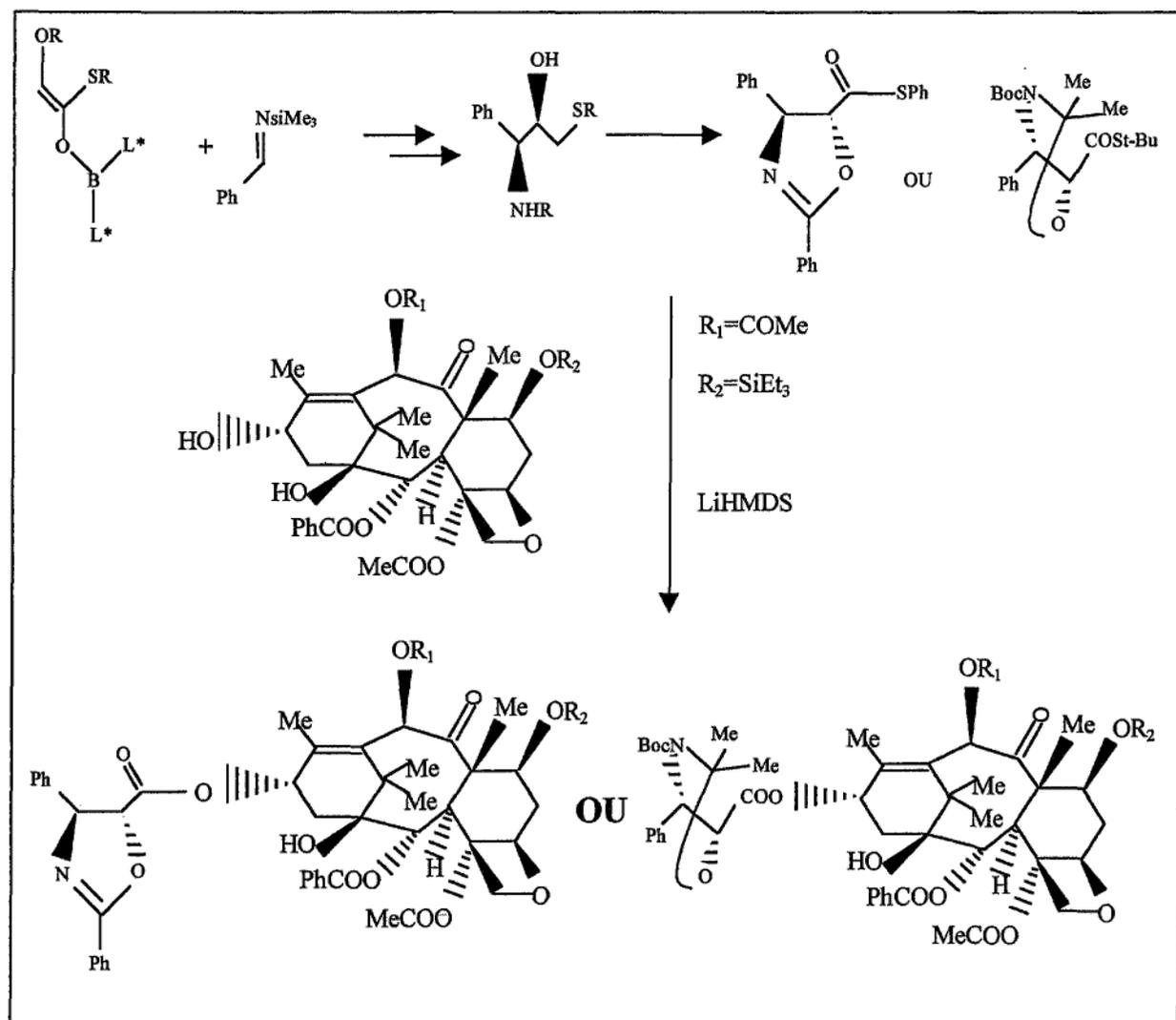


Figure 11 : Héli-synthèse du taxol par Gennari. (15)

La synthèse de la chaîne latérale a, quant à elle, été réalisée par de très nombreuses équipes (environ une douzaine de méthodes existent).

## 7 FORMULATION DU TAXOL

### 7.1 Problème de solubilité

Lorsque l'activité du paclitaxel contre certaines cellules tumorales a été démontrée, les travaux concernant le développement de la formulation ont alors débuté. Etant donné que le paclitaxel n'est pas actif par voie orale, les chercheurs se sont directement orientés vers une formulation compatible avec une administration intraveineuse.

Le taxol est très peu soluble dans l'eau (moins de 0,01 mg/ml) et dans d'autres excipients, généralement utilisés pour l'administration parentérale de substances médicamenteuses. (1) Ces problèmes de solubilité peuvent être en partie expliqués par la chimie du paclitaxel. C'est un complexe diterpénoïde comportant de nombreux substituants hydrophobes. Il ne comporte aucun groupe fonctionnel ionisable et, de ce fait, un changement de pH ne modifiera pas sa solubilité. Pour la même raison, les essais habituels en vue d'augmenter la solubilité dans l'eau, par formation de sels ou par addition d'agents complexant, ne sont pas utilisables dans le cas du paclitaxel. (35)

La solubilité du taxol dans différents excipients et solvants organiques a été testée. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

La plupart de ces valeurs ont été déterminées après mélange du produit avec le solvant pendant 1 à 2 heures. Ces valeurs représentent des approximations plutôt que des solubilités équilibrées.

Le taxol est fortement soluble dans différents solvants organiques. Cependant, quand un solvant organique, miscible à l'eau, contient du taxol en quantité proche de la saturation de la solubilité, le produit précipite. La solubilité d'un soluté insoluble dans l'eau, par rapport à une échelle de concentrations donnée, augmente de manière très importante avec la fraction de co-solvant ajouté. Néanmoins, une

dilution par l'eau d'un solvant organique saturé avec une substance faiblement soluble dans l'eau comme le taxol, entraîne généralement une précipitation de la substance.

**Tableau 1 : Solubilité approximative du taxol dans différents solvants à 25°C.**

(1)

Solvant	Solubilité (mg/ml)
Chlorure de méthylène	≥ 19
Acétonitrile	≥ 22
n-Heptane	<< 1
Ethanol	~ 39
Isopropanol	~ 12
75% Isopropanol/eau	~ 0,2
75% Propylène glycol	< 1,4
30% Polyvinylpyrrolidone dans l'eau	≤ 0,3
75% PEG 400	31
65% PEG 400	3,8
55% PEG 400	0,9
50% PEG 400	0,2
45% PEG 400	0,14
35% PEG 400	0,03
Huile de soja	0,3
Triacétine	75

PEG 400 : Polyéthylène Glycol 400

Une association taxol-PEG 400 a été étudiée comme formulation potentielle. Une solution à 75% de PEG 400 dans de l'eau contenant 16 mg/ml de taxol s'est révélée stable par analyse par CLHP et sans aucune particule apparente après 14 jours à 25°C. Hélas, précipitation et turbidité sont apparues quand ces solutions de taxol ont été introduites dans des systèmes d'administration de perfusion intraveineuse en Y.

Cette précipitation du taxol peut être minimisée, voire éliminée, en ajustant le taux d'excipient ajouté, ou en diminuant la concentration en taxol dans l'excipient.

Cette méthode d'administration du taxol présente de nombreuses possibilités d'erreurs et d'effets contraires. De plus, le taxol administré de cette manière est moins actif contre les cellules du mélanome B16, que le taxol administré en suspension aqueuse, ou en solution avec un surfactant non ionique : le Crémophor EL ®.

La solubilisation de composés avec des surfactants permet d'obtenir des dilutions de solutions saturées ou pratiquement saturées.

En général, il existe une relation linéaire entre la solubilité du soluté, et la fraction de surfactant ajouté. Ainsi, une dilution de solution de taxol dans du Crémophor EL ® avec des diluants aqueux pourrait donner des solutions dans un large éventail de dilutions. (1)

## **7.2 Le Crémophor EL ®**

C'est un dérivé polyoxyéthylénique de l'huile de ricin. Il est constitué à 83% par des composants hydrophobes (le principal étant le ricinoléate de glycérol de polyéthylène glycol) et de 17% de composés hydrophiles (des polyéthylènes glycol et des éthoxylates de glycérol).

Le Crémophor EL ® est principalement utilisé comme agent émulsifiant et solubilisant, et il est particulièrement bien adapté à la production de préparations de

liquides aqueux contenant des huiles volatiles, des vitamines liposolubles et d'autres substances hydrophobes.

Pour solubiliser les vitamines liposolubles, ces produits doivent être d'abord dissouts dans le Crémophor EL®. L'eau sera ajoutée très doucement tout en agitant vigoureusement. Au fur et à mesure que l'eau est additionnée, la viscosité augmente, atteignant un maximum pour 40% d'eau. La solubilisation peut être facilitée en chauffant à 60°C pendant un temps court, et dans certains cas, en ajoutant du polyéthylène glycol et/ou du propylène glycol. Dans les formes orales, le goût du crémophore peut être masqué par un arôme banane.

Le Crémophor EL ® apparaît comme un liquide visqueux, jaune pâle, et clair à des températures supérieures à 26°C. Il a une légère odeur caractéristique. Il est complètement liquéfié par chauffage à 26 °C. (68)

Le paclitaxel est commercialisé à la dose courante de 5 ml, en association avec le Crémophor EL ® (50%) et de l'alcool déshydraté (50%). Chaque millilitre contient 6 mg de paclitaxel, 527 mg de Crémophor EL ® et 49,7% d'alcool. Les fioles non ouvertes doivent être conservées au frais (entre +2 et +8°C). Mais le produit est stable au moins 27 heures à température ambiante (20-25°C) quand il est dilué à la concentration de 0,3 à 1,2 mg/ml dans 5% de dextrose ou 0,9% de chlorure de sodium. Toutes les solutions vont présenter un léger état brumeux directement proportionnel à la concentration du produit et au temps écoulé depuis sa préparation. Le paclitaxel doit être dilué dans des récipients en verre, en polypropylène ou en polyéthylène, et administré dans des systèmes de perfusion composés de matériaux qui ne contiennent pas d'agents plastifiants. Ceci est dû à la tendance du crémophore à filtrer les phtalates plastifiants. (27)

L'inconvénient majeur du Crémophor EL ® est qu'il n'est pas physiologiquement inerte. De nombreux effets toxiques lui ont été attribués, le plus important étant une

réaction anaphylactoïde, avec vasodilatation, dyspnée et hypotension. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la réaction anaphylactique qui peut suivre une administration intraveineuse de Crémophor EL ® :

- réaction d'hypersensibilité de type I, avec exposition préalable à l'antigène et induction des immunoglobulines Ig E (d'où libération d'histamine et autres médiateurs),
- activation du complément C<sub>3</sub>, qui ne requière pas d'exposition préalable, et qui conduit à la libération d'histamine par les cellules mastocytaires,
- le Crémophor EL ® induit la libération d'histamine, sans l'implication d'anticorps ou du complément.

Le Crémophor EL ® peut aussi induire des ulcérations cutanées, apparaissant suite à l'injection intradermique. (12)

On retrouve des réactions d'hypersensibilité chez environ 30% des patients. (54)

Ainsi donc le Crémophor EL ® apparaît comme un excipient doté d'effets indésirables. De plus sa formulation avec le taxol présente un certain nombre de préoccupations, incluant la stabilité, des exigences de filtration, l'utilisation de containers non en plastique pour les systèmes d'administration de solutions, et la compatibilité avec des cathéters implantés. (35)

### **7.3 Autres solutions de formulation du paclitaxel**

Etant donné les effets négatifs du Crémophor EL ®, les recherches se sont dirigées vers une formulation plus sûre, dépourvue de crémophore. (35)

Afin d'éviter les problèmes de toxicité, il faudrait pouvoir délivrer le taxol directement sur les cellules tumorales, et uniquement sur celles-ci. Ainsi, un dosage plus élevé et plus efficace pourrait être utilisé.

### 7.3.1 Les LCM

Une méthode envisagée est l'utilisation de microbulles recouvertes de lipides : les LCM. Ce sont des bulles microscopiques, avec une peau lipidique constituée d'esters de cholestérol et de triglycérides, et renfermant du gaz. Les bulles sont synthétisées avec une échelle de diamètres allant de 0,8 à 5  $\mu\text{m}$ . Elles sont stables *in vitro* durant plusieurs mois et *in vivo* pendant quelques heures. Elles ne sont pas toxiques (leur toxicité a été évaluée sur les rats et les lapins).

Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, les LCM ne fusionnent pas en bulles plus grandes. D'autre part, les LCM se logent au niveau de la tumeur cible où ils restent jusqu'à ce qu'ils soient dégradés dans le cytoplasme de la cellule tumorale.

Grâce à la liposolubilité du taxol et aux propriétés thermodynamiques des LCM, il a été possible de fixer le taxol aux LCM.

Le complexe taxol-LCM est testé sur différentes lignées tumorales. Il en ressort que le taxol-LCM cible la tumeur, sans action apparente sur les autres organes.

Plus de données concernant le sort des LCM *in vivo* sont nécessaires avant qu'ils ne puissent être utilisés en thérapeutique. Les premiers traitements *in vivo* effectués sur les rats indiquent que le taxol-LCM peut être délivré sur le site de la tumeur, et peut exercer non seulement un effet biologique mesurable, mais aussi une activité antitumorale. (20)

### 7.3.2 Les co-solvants

L'addition de co-solvants est probablement la technique de solubilisation la plus utilisée, grâce à sa relativement faible toxicité et à sa capacité à augmenter la solubilité de substances non polaires. Cependant, la possible précipitation dans le sang, ou lors de la dilution nécessaire pour la perfusion, représente un désavantage. (35)

### 7.3.3 Les émulsions

L'utilisation d'émulsions lipidiques peut être une approche favorable pour améliorer la solubilité et la stabilité de certaines substances antinéoplasiques.

Une émulsion est un mélange hétérogène de 2 (ou plus de 2) liquides non miscibles, avec un troisième composant (l'émulsionnant) utilisé pour stabiliser les gouttelettes dispersées. Cependant, beaucoup d'émulsionnants sont toxiques par des réactions hémolytiques. (35)

### 7.3.4 Complexation avec des cyclodextrines

Le principe de complexation est une méthode souvent utilisée pour augmenter la solubilité aqueuse et la stabilité de la substance. En outre, la formation d'un complexe entre un produit cytotoxique et un transporteur spécifique d'un site peut libérer la substance plus précisément sur la tumeur-cible, augmentant de cette façon l'index thérapeutique. Néanmoins, la dissociation du complexe dans le corps peut conduire à la précipitation.

Les cyclodextrines sont des agents complexants qui sont produits par dégradation enzymatique de l'amidon. Leur capacité à favoriser la solubilisation et la stabilisation dérive de la formation de complexes d'inclusion solubles dans l'eau.

Les  $\beta$ -cyclodextrines augmentent considérablement la solubilité du paclitaxel. Mais les solutions formées sont très visqueuses et ce problème reste difficile à éluder.

Concernant la toxicité des cyclodextrines, elles ne sont ni mutagènes ni tératogènes et leur administration par voie orale paraît sans danger. En revanche, la voie parentérale présente un certain nombre de risques. L'administration intraveineuse ou sous-cutanée de la dose létale ( $DL_{50}$ ) à des rats provoque une nécrose au niveau des tubules rénaux proximaux. Et des injections répétées augmentent d'autant plus les dommages. La cause de cette toxicité n'est pas clairement établie. Il semblerait que, 24 heures après une injection sous-cutanée, apparaissent des vacuoles apicales et des lisozomes dans les cellules épithéliales des tubules proximaux. Une augmentation des vacuoles apicales correspondrait à une réponse à l'excrétion de fortes concentrations d'agents osmotiques. Cet effet est réversible dès l'arrêt du traitement avec l'agent osmotique.

Une autre manifestation de la toxicité des cyclodextrines est leur activité hémolytique. Des études suggèrent que les cyclodextrines extrairaient le cholestérol ou les phospholipides de la membrane, créant ainsi de petits pores. Ceci permettrait la fuite du potassium, suivie de la lyse finale et de la libération de l'hème et des autres composants cellulaires. La comparaison du sang dans sa totalité *versus* des érythrocytes isolés montre que la cytotoxicité est diminuée par la présence des composants hydrophobes du sérum.

Des dommages membranaires ont aussi été observés lors de l'administration intramusculaire de fortes concentrations. Cette voie d'administration entraîne une déplétion du tissu musculaire en créatine kinase (CK) au niveau du site d'injection. La baisse de CK constitue un marqueur biochimique de la toxicité locale musculaire.(63)

### 7.3.5 Les prodrogues

Des efforts pour trouver une formulation plus pratique pour l'administration du paclitaxel ont porté sur la synthèse et l'évaluation de prodrogues du paclitaxel, solubles dans l'eau.

Les prodrogues sont des dérivés inactifs du composé. Une fois à l'intérieur du corps, la prodrogue inactive est convertie en forme active par hydrolyse spontanée ou par dégradation enzymatique. Cette transformation peut considérablement améliorer la solubilité de la substance médicamenteuse. Cependant, ce procédé est coûteux, difficile à réaliser et les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du produit peuvent être altérées. De nombreuses études donnent pourtant des résultats intéressants, bien que l'efficacité clinique de l'activité des prodrogues (estérases et phosphatases) n'ait pas encore été établie. (35)

### 7.3.6 Conclusion

La recherche de solutions alternatives à la formulation du paclitaxel est très active. Les avantages et inconvénients de chaque nouvelle possibilité doivent être soigneusement estimés et comparés les uns aux autres avant de passer aux essais cliniques. Alors que certaines approches conduisent à une toxicité supérieure, d'autres réduisent significativement les réactions toxiques (les LCM par exemple). De plus, la précipitation observée aux dilutions nécessaires pendant la préparation et la perfusion, demeure un problème majeur dans la plupart des solutions alternatives. Cependant, avec les LCM et les prodrogues, ce problème n'apparaît pas. Des tests cliniques sont maintenant nécessaires.

## 8 PRODUCTION DE TAXOL PAR DES CHAMPIGNONS

Depuis quelques temps, les écologistes se sont inquiétés du fait que les ifs pouvaient être exterminés au profit de vies humaines. Mais, d'après Bristol Myers Squibb, les laboratoires commercialisant le taxol grâce aux autres sources de taxol telle que la synthèse du produit à partir de précurseur trouvé dans les feuilles de l'if européen, l'arbre ne risque plus d'être exterminé. Pour autant, ces nouvelles sources n'ont pas fait baisser le prix de taxol.

A l'université du Montana, aux Etats-Unis, le pathologiste botaniste Gary Strobel, et la chimiste Andréa Stierle, ont découvert en 1991, niché dans les plis de l'écorce d'un if, un champignon qui produirait du taxol.

Strobel a déjà découvert plusieurs fois des organismes produisant des composés capables de combattre des maladies de végétaux, ou de tuer de mauvaises herbes. Et il sait que la production du taxol par le champignon et la plante (le parasite et l'hôte) a connu des précédents. Pour n'en citer qu'un, dans les années 30, un scientifique japonais découvrit une espèce particulière de champignon qui, comme son hôte le plant de riz, peut produire de la gibbérelline, une hormone diterpénoïde qui régule la croissance des plantes et leur développement. Le taxol, lui aussi, est un diterpénoïde.

Quant à Andréa Stierle, elle a découvert dans les années 80, à 200 mètres de sa porte, un champignon produisant une toxine qui tue spécifiquement une mauvaise herbe rampante du Montana.

Avec son mari le chimiste Donald Stierle du «Montana College of Mineral Science and Technology», elle a donc commencé à arpenter les forêts du Montana, collectant des échantillons de plus de 50 champignons. Avec Strobel, elle a travaillé jour et nuit afin de découvrir le champignon produisant du taxol et de prouver que les traces de taxol présentes dans les cultures du champignon n'étaient pas dues à une contamination par l'arbre.

Le résultat de cette découverte permettrait d'imaginer d'énormes réservoirs de fermentation produisant de vastes quantités d'un taxol à bas prix. Car, à titre d'exemple, le marché du taxol représente environ 50 000 patients américains, et une baisse du coût du traitement se chiffrerait en milliards de dollars. (38)

D'un point de vue pratique, la fermentation microbienne comme voie de production, possède quelques avantages.

- La production industrielle d'une substance bioréactive comme le taxol, nécessite une reproductibilité dont dépend le rendement. Si un microorganisme est l'organisme source, il peut pousser dans des fermenteurs réservoirs, produisant une provision non exhaustive.
- Les microorganismes répondent en général favorablement aux techniques de culture de routine. La culture de macroorganismes (culture de tissus) relève beaucoup plus du défi, requérant des techniques spécifiques, ou bien des mois de croissance, avant que la récolte ne soit possible.
- L'amplification de la production est relativement facile avec les microorganismes. Dans le cas de la pénicilline, l'amélioration des conditions de culture et les manipulations génétiques ont permis d'augmenter les quantités de produit de quelques  $\mu\text{g/ml}$  à des milliers de  $\mu\text{g/ml}$ .
- Avec des macroorganismes, une plus grosse récolte est l'option la plus raisonnable pour accroître la productivité. Dans le cas de la production actuelle de taxol à partir des feuilles de l'if, une récolte plus importante conduirait à l'éradication de l'organisme source, l'if, en quelques années, si toutes les demandes devaient être satisfaites. Différents composés bioactifs peuvent être produits par modifications des conditions de culture : des changements peuvent être expérimentés à l'infini, afin d'optimiser les différentes voies de biosynthèse qui pourraient conduire à des dérivés du taxol plus efficaces.

Ainsi, une source microbienne de taxol pourrait fournir un approvisionnement illimité en taxol, et en nouveaux taxanes.

Quelques mois plus tard, malgré leurs problèmes financiers, Stierle et Strobel développent une nouvelle théorie : comme le taxol possède des propriétés antifongiques, les ifs le produiraient pour éviter d'être parasités par des champignons. Et le champignon aurait, par inadvertance, repris à l'arbre le ou les gènes du taxol.

D'autre part, ils apprennent que leur champignon est une nouvelle espèce à part entière, avec son propre génome. D'où l'appellation *Taxomyces andreanae* (Stierle & Strobel), en hommage au découvreur Andrea Stierle.

Un autre problème se pose alors : le champignon est-il capable de synthétiser du taxol, une fois séparé de son hôte ?

### **8.1 Description de *Taxomyces andreanae***

*Taxomyces andreanae* est un champignon endophyte de la classe des Hyphomycètes. Il est exclusivement isolé à partir de la couche interne de l'écorce de petites branches d'un if particulier (*Taxus brevifolia*) poussant dans une forêt de cèdres, dans le Nord Montana.

### 8.1.1 Méthodes d'analyses

Ces branches sont traitées par de l'éthanol 70%. La couche externe d'écorce est enlevée, et des morceaux de la couche interne (phloème et cambium) sont retirés et placés sur une gélose nutritive.

Des essais pour isoler le champignon à partir d'autres sites dans le Montana, l'Idaho ou l'Oregon sont restés sans succès.

Des essais de croissance du champignon ont été étudiés à partir d'autres espèces. Des échantillons de feuille, tige et écorce de diverses plantes poussant aux alentours de l'arbre où a été recueilli le champignon, sont ramassés. Des petits morceaux de ces échantillons sont placés sur 4 couches de gaze. Les géloses contenant les champignons en croissance sont alors placées sur ce matériel et la croissance est observée et mesurée après une semaine.

La croissance du champignon est ensuite mesurée chaque jour après placement de blocs de gélose de 0,5 x 0,5 cm sur des géloses fraîches de bouillon de dextrose de pomme de terre, de substances nutritives, de farine d'avoine, de farine de blé, de malt.

Les blocs de gélose contenant les mycéliums et les structures identiques aux bulbilles sont fixés et déshydratés en vue de l'observation au microscope électronique. Le procédé de séchage entraîne des rétrécissements des structures biologiques, ce qui signifie qu'à l'état vivant, elles sont un peu plus grandes, et que les amas de cellules sont plus serrés.

Les noyaux sont teintés par un réactif (le 4,6 diamino-2-phénylindole) et l'observation se fait sous UV à 365 nm. (60)

### 8.1.2 Observations

Le mycélium superficiel est composé d'un réseau fortement ramifié d'hyphes septaux, multinucléés, généralement hyalins et lisses. Le diamètre des cellules de ces hyphes varie entre 1,25 et 3,75  $\mu\text{m}$ . Les cellules bourgeonnent à partir de fructifications des hyphes formant des groupes, et dont la forme varie énormément : de sphérique à ovoïde, à longiforme. Quant à la taille, elle est de 5x5  $\mu\text{m}$  de diamètre pour les bulbilles sphériques et les bulbilles allongées ont une longueur variant de 16 à 30  $\mu\text{m}$ . Les cellules des bulbilles restent incolores. Elles sont ovoïdes (1,5 x 2,5  $\mu\text{m}$ ) et ne germent pas.

Dans *Taxomyces andreanae*, les cellules des bulbilles, à la différence de la plupart des autres champignons, apparaissent peu serrées mais, néanmoins, sont reliées par du matériel fibreux. De plus, leur observation au microscope révèle qu'elles sont remplies de structures cytoplasmiques (incluant des corps lipidiques) et chacune d'elles comporte un noyau. Elles possèdent aussi une membrane double. Néanmoins, elles diffèrent par un manque de pigmentation, des caractéristiques proches de la sclérose (cellules externes arrondies et cellules internes gonflées) et dans leur mode de formation.

Quand une partie de la gélose inoculée est placée au centre de boîtes de gélose plus récentes, enrichies en diverses substances nutritives (farine de blé, farine d'avoine, malt, nutriments...), la croissance est si rapide que la culture atteint le rebord de la boîte en 3 jours. Les bulbilles ne se formeront sur ces milieux qu'à partir du sixième jour après inoculation. Certains apparaîtront sur la gélose de farine de blé après 6 jours. D'autres sont relevés sur le rebord de la boîte de gélose de malt 7 jours après inoculation. De nombreux mycéliums duveteux et aériens sont spécifiquement observés sur la gélose de malt. Et après 6 à 7 jours, la gélose prend une coloration brun-rouge, et apparaît un mycélium épais et mat.

Quand on compare les croissances mycéliales du champignon déposé sur des fragments de feuilles ou d'écorces pris sur des arbres localisés aux alentours de site de *Taxus brevifolia*, on constate que la meilleure croissance revient à *Taxus brevifolia*, suivi par *Betula nigra* (le bouleau noir). En revanche, sur certaines espèces rien ne pousse (cas de *Larix occidentalis* : le mélèze).

Ces observations suggèrent qu'il existe une préférence dans la nature pour l'hôte de *Taxomyces andreanae* et qu'il est peu probable de trouver un autre hôte que l'if ou le bouleau.

Cet organisme semble être saprophyte ou endophyte, avec une préférence pour endophyte depuis qu'on l'a découvert en association avec des tissus vivants. Au bout d'un an, il est encore possible de retrouver le champignon dans la couche interne de l'écorce de l'arbre initial et il n'y a aucune pathologie développée au niveau de l'hôte. De plus, des blocs de gélose colonisés par *Taxomyces andreanae* et placés sous l'écorce de l'if ne réussissent à développer aucune manifestation pathologique.

Différentes études comparatives avec d'autres champignons ont permis de démontrer le caractère unique de *Taxomyces andreanae*. (60)

## **8.2 Culture de *Taxomyces andreanae* et production de taxol**

### **8.2.1 Méthodes de production et d'extraction de taxol**

L'équipe de Strobel et Stierle recueille environ 300 champignons issus d'ifs européens provenant d'une vingtaine de sites différents. Sur ces 300 champignons, un seul s'est révélé capable de produire du taxol. Il s'agit de *Taxomyces andreanae*, champignon isolé à partir de l'écorce d'un if poussant dans une forêt de cèdre dans le Nord Montana.

*Taxomyces andreanae* est cultivé par transfert des extrémités d'hyphes d'une gélose aqueuse, sur laquelle les morceaux d'écorces ont été cultivés, à une gélose nutritive. Le mycélium est ensuite plusieurs fois transféré afin d'éliminer toute trace de taxol ou de dérivés taxoïdes qui proviendraient de l'arbre d'origine. Ces transferts de mycélium sur du bouillon de culture se font après 3 à 7 jours de croissance du mycélium. Après cette période, le mycélium semble passer à un stade quiescent. Le champignon est placé dans de l'eau à 4°C, et pousse sur un milieu de culture semi-défini. Les conidies ne germant pas dans ces conditions, de petits morceaux de gélose (0,5 x 0,5 cm) sont transférés sur un milieu S-7 (milieu préalablement défini comprenant, entre autre, un certain nombre de sucres).

Après 21 jours d'incubation, le milieu est filtré sur une gaze. Le résidu est extrait et filtré à nouveau. Les liquides sont extraits par du dichlorométhane. Puis le solvant est séparé de la phase organique par évaporation rotative à 30°C, ne laissant ainsi que l'extrait organique. Une chromatographie sur couche mince révèle la présence d'un composé semblable au taxol. (58,59)

### 8.2.2 Identification du taxol

La similitude entre le taxol de l'if et le taxol du champignon est confirmée par spectroscopie, immunologie et différentes méthodes biologiques.

- ◆ Le spectre de masse du taxol du champignon est identique au spectre publié, avec des pics caractéristiques similaires (figure 12). La présence de baccatine III dans le champignon est aussi détectée.
- ◆ Le taxol et la baccatine III isolés à partir de *Taxomyces andreanae* ont les mêmes valeurs de R<sub>f</sub> que ceux du taxol et de la baccatine III de l'if, et cela sur 5

systèmes différents de chromatographie sur couche mince. Ces composés réagissent positivement avec le réactif (acide vanilline sulfurique) en aérosol : il produit une tache bleue, qui devient marron après 12 à 24 heures d'attente à 25°C.

Le taxol du champignon a le même temps de rétention que celui du taxol de l'if, en CLHP (sur gel de silice, avec un temps de rétention de 5 minutes).

Le spectre ultraviolet du taxol du champignon est aussi identique à celui du taxol de l'if, avec des maximums à 273 nm et 235 nm.

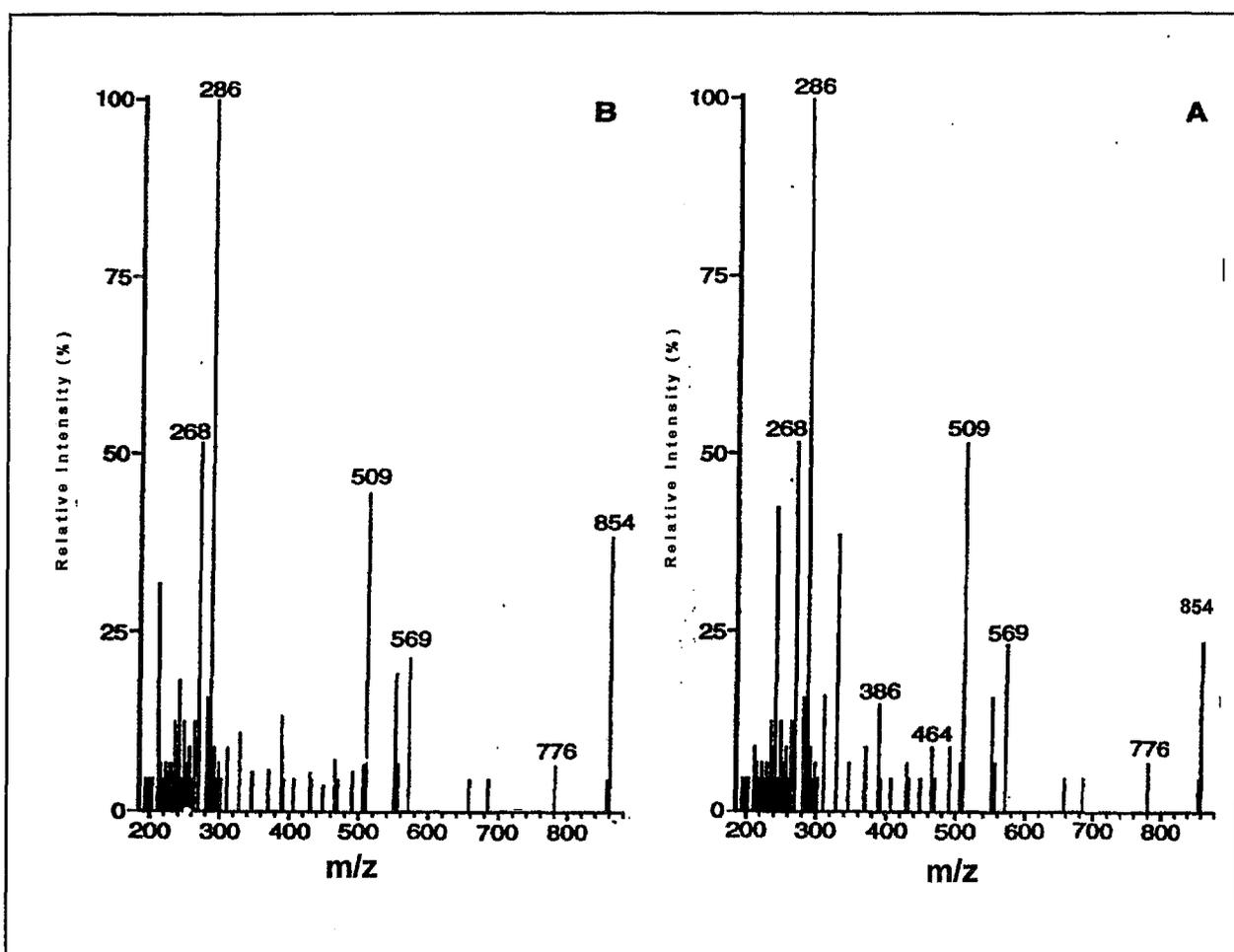


Figure 12 : Spectre de masse du taxol de champignon (A) et du taxol d'if (B)

(58)

- ◆ La confirmation immunologique de la présence de taxol et de ses analogues a pu être obtenue en suivant le développement d'anticorps monoclonaux spécifiques du taxol.

Des analyses immunologiques par inhibition enzymatique compétitive ont déterminé que les 2 taxol (celui du champignon et celui de l'if) étaient identiques. Des analyses répétées utilisant ces anticorps, ont confirmé la présence de taxol dans les préparations partiellement ou totalement purifiées de champignon.

Des extraits d'une vingtaine de fermentations différentes de *Taxomyces andreanae* ont été testés avec une certaine quantité de taxol et taxanes dans chaque test. De plus, cela a permis de déterminer que le taxol représentait entre 15 et 20% des taxanes totaux présents dans l'extrait organique de *Taxomyces andreanae*.

- ◆ L'activité biologique du taxol du champignon est évaluée par un test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire 9 KB. La dose efficace à 50% (ED<sub>50</sub>) est de  $7,8 \pm 1,5 \times 10^{-3}$  mg/ml pour le taxol du champignon, et elle est de  $4,3 \pm 3,2 \times 10^{-3}$  mg/ml pour le taxol de référence. Ces résultats suggèrent que la configuration stéréochimique du taxol du champignon serait suffisamment similaire à celle du taxol de l'if pour avoir les mêmes activités immunologiques et cytotoxiques.

Afin de démontrer que le taxol trouvé dans *Taxomyces andreanae* est vraiment produit par le champignon, des précurseurs radiomarqués sont utilisés. Ces précurseurs sont ajoutés aux cultures de *Taxomyces andreanae* 20 jours après inoculation. Les cultures incubent pendant 4 jours à 25°C. Le meilleur précurseur est la L- phénylalanine marquée au carbone 14 : la portion benzoyle du taxol est dérivée de la phénylalanine. La confirmation de l'identité du taxol marqué au carbone 14 est obtenue par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle.

Différents contrôles sont réalisés afin d'éliminer la possibilité que le taxol détecté provienne soit de l'arbre, soit d'une contamination accidentelle de la culture.

Le milieu de culture et la gélose, seule ou inoculée avec le mycélium du champignon, ne produisent pas de taxol détectable au temps zéro.

L'addition de chlorures de chlorocholine au milieu supprime complètement la production de taxol. Ce composé est un inhibiteur de la production de gibbérelline dans *Gibberella fujikuroi*, alors qu'il stimule la production de petasol dans *Dreschlera gigantea* (Heald & Wolf) Ito. On peut donc en conclure que le taxol isolé à partir de *Taxomyces andreanae* est réellement un produit du métabolisme de l'organisme. (58)

### 8.2.3 Quantités de taxol produites et stimulation

Les quantités de taxol produites par *Taxomyces andreanae* sont malheureusement faibles. Leur quantification par spectrométrie de masse indique 24 à 50 ng de taxol par litre de culture. Des champignons pathogènes de plantes produisent souvent des toxines en grandes quantités à conditions qu'un extrait aqueux de la plante hôte soit inclus dans le milieu. C'est aussi le cas avec la production de taxol : la présence de composés aqueux de feuilles d'ifs favorise la production de taxol par *Taxomyces andreanae*.

Pour vérifier et quantifier cet effet, des expériences répétées ont été effectuées avec des extraits aqueux de feuilles d'if : 5g de feuilles, dans un litre d'eau bouillie pendant 5 minutes, sont ajoutés au bouillon nutritif pour faire une solution à 1%. Il en résulte une production de taxol centuplée. L'analyse de l'anticorps monoclonal de taxol de ce milieu à 1% d'if montre un titre de taxol compris entre 95 et 200 ng/l, et un titre de taxanes entre 800 et 1 000 ng/l.

Si on laisse pousser *Taxomyces andreanae* pendant 21 jours consécutifs sur le milieu, on obtient 2 000 à 3 000 ng de taxol par litre.

L'addition d'un bouillon à 2% d'if va induire des quantités plus importantes.

D'autres modifications apportées au bouillon nutritif ont aussi augmenté les titres de taxol et de taxanes. Ceci inclut divers sucres ajoutés à des stades différents de fermentation.

Quand on compare les cultures immobiles aux cultures agitées, on s'aperçoit qu'une agitation rapide (supérieure à 200 tours par minute) conduit à une croissance pauvre, avec une petite productivité. D'une agitation modérée (100 tours par minute) résulte une augmentation décuplée du mycélium. Le filtrat de ces cultures produit les mêmes titres de taxol que les cultures immobiles de *Taxomyces andreanae*. Mais le mycélium, après broyage et extraction, produit plusieurs centaines de µg/l supplémentaires.

D'autres études ont été conduites, notamment avec le chlorure de chlorocholine (CCC). C'est un agent connu pour le blocage de la biosynthèse de gibbérelline dans *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber. Il est ajouté à *Taxomyces andreanae* en diverses quantités. Plus la quantité de CCC augmente, plus le titre de taxol diminue, jusqu'à un stade d'inhibition totale.

L'addition, à certaines concentrations, d'acide N-diméthylaminosuccinique, un autre régulateur connu de la croissance des plantes, augmente la production de taxol.

D'autres régulateurs de croissance, particulièrement ceux utilisés pour augmenter la production de gibbérelline dans *Gibberella fujikuroi*, sont étudiés pour leurs effets sur la production de taxol. De telles améliorations ne seraient pas différentes de l'évolution prise concernant pratiquement tous les microorganismes qui ont été fermentés dans le but d'une industrialisation microbiologique.

L'amélioration des techniques de culture, l'addition d'activateurs et l'application des méthodes d'ingénierie génétique pourraient finalement permettre la commercialisation de *Taxomyces andreanae* pour la production de taxanes.

Plusieurs autres champignons ont montré des réactions croisées avec les anticorps monoclonaux du taxol et/ou des taxanes.

*Taxomyces andreanae* semble aussi produire de la baccatine III et d'autres taxanes. Cependant, la céphalomannine n'a jamais été détectée dans les extraits de champignons. Pourtant, dans tous les échantillons d'écorce d'if, le taxol et la céphalomannine sont extraits ensemble et sont difficiles à séparer sur gel de silice en CLHP. L'arbre et le champignon doivent avoir des voies de synthèse qui diffèrent légèrement, ce qui justifierait l'absence de céphalomannine. Donc le champignon aurait le potentiel de ne produire que certains taxanes. Les analyses préliminaires des composés qui ont des réactions croisées avec les anticorps de taxanes, suggèrent la présence de plusieurs taxanes connus, comme le 10-désacétyltaxol et la 10-désacétylbaccatine.

La découverte de *Taxomyces andreanae* a été la première démonstration qu'un organisme autre qu'une espèce de *Taxus* était capable de produire du taxol. Cependant les quantités de taxol restent faibles, et le champignon a du mal à pousser sur les milieux de culture. Les chercheurs se sont donc orientés vers d'autres organismes. (58,59)

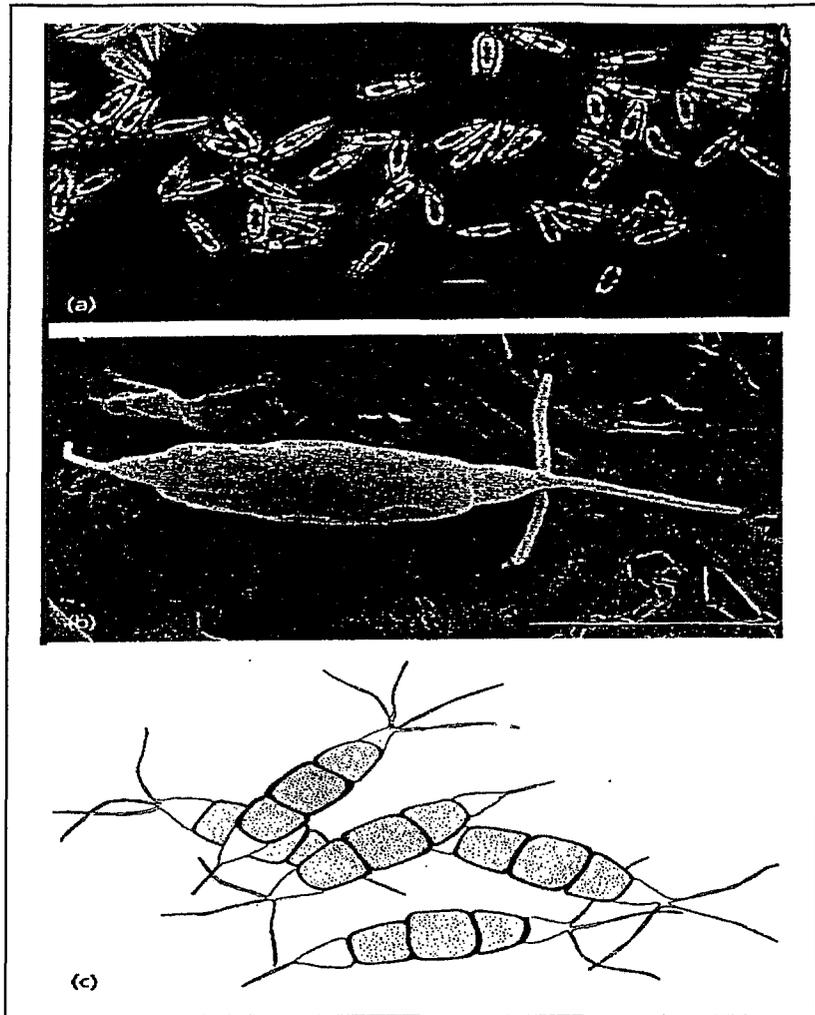
### 8.3 *Pestalotiopsis microspora* issu de *Taxus wallachiana*

L'équipe de Strobel, Yang et coll., orientant toujours ses recherches sur les microorganismes associés aux ifs, s'est retrouvée dans les montagnes de l'Himalaya, où pousse *Taxus wallachiana*, l'if himalayen. On le trouve sur les versants humides des montagnes, à des altitudes comprises entre 1 500 et 3 000 mètres. Ces sites n'ont pas été endommagés par les pratiques agricoles, et les ifs poussant sur ces lieux ont donc toutes les chances de développer une relation hôte-parasite, conduisant à la synthèse du taxol.

#### 8.3.1 Isolement et identification de *Pestalotiopsis microspora*

Plusieurs champignons endophytes sont isolés à partir de petites branches de *Taxus wallachiana*. Ces organismes sont isolés par traitement à l'éthanol à 70%, permettant de retirer la couche externe de l'écorce. De petits morceaux d'écorce interne sont ensuite placés à la surface de géloses nutritives dans des boîtes de Pétri. Après plusieurs jours, on observe une croissance des champignons. Les extrémités d'hyphes de chaque champignon sont alors placées sur gélose de dextrose de pomme de terre (PDA) ou sur milieu MID. L'incubation se fait à température ambiante pendant 10 jours.

Le champignon utilisé dans cette étude est identifié comme étant *Pestalotiopsis microspora* (Spegazzini) Batista & Peres. Il possède un mycélium cloisonné et ramifié, brun à transparent, et une fine membrane. Les conidies sont fusiformes, avec les cellules basales et terminales transparentes, et les cellules centrales brunes. Les appendices de la cellule terminale ne sont pas ramifiés et sont au nombre de 3 ou 4 (figure 13).



**Figure 13 : Conidies de *Pestalotiopsis microspora* (61)**

**(a) : Vue microscopique**

**(b) : Vue au microscope électronique**

**(c) : Vue d'artiste**

La taille des conidies est de 24 à 26  $\mu\text{m}$  par 5,5 à 6  $\mu\text{m}$ , ce qui fait qu'en moyenne, elles sont plus larges que les autres représentants de l'espèce.

L'identité du champignon a été déterminée par le Dr B.C.Sullon de l'International Mycological Institute, Egham, UK. (61)

### 8.3.2 Identification du taxol produit par *Pestalotiopsis microspora*

Un composé ayant des propriétés chromatographiques comparables à celles du taxol, a été isolé à partir de *Pestalotiopsis microspora*. Il n'était pas présent dans l'inoculum, l'extrait et la culture, au temps zéro. Ceci exclut tout transport de taxol depuis la source originelle du champignon (l'if). Ce composé produit un spectre d'absorption UV identique à celui du taxol.

Le taxol du champignon va réagir positivement avec l'anticorps monoclonal spécifique du taxol. Les résultats sont comparables avec ceux produits par le taxol de *Taxomyces andreanae*.

Dans des tests sur 26 lignées cellulaires cancéreuses, le taxol du champignon montre une activité comparable à celle des taxoïdes standards. De plus, la capacité de ce taxol à bloquer des cellules leucémiques humaines CCRF-CEM en phase G2/M de la mitose, est équivalente à celle du taxol original (figure 14).

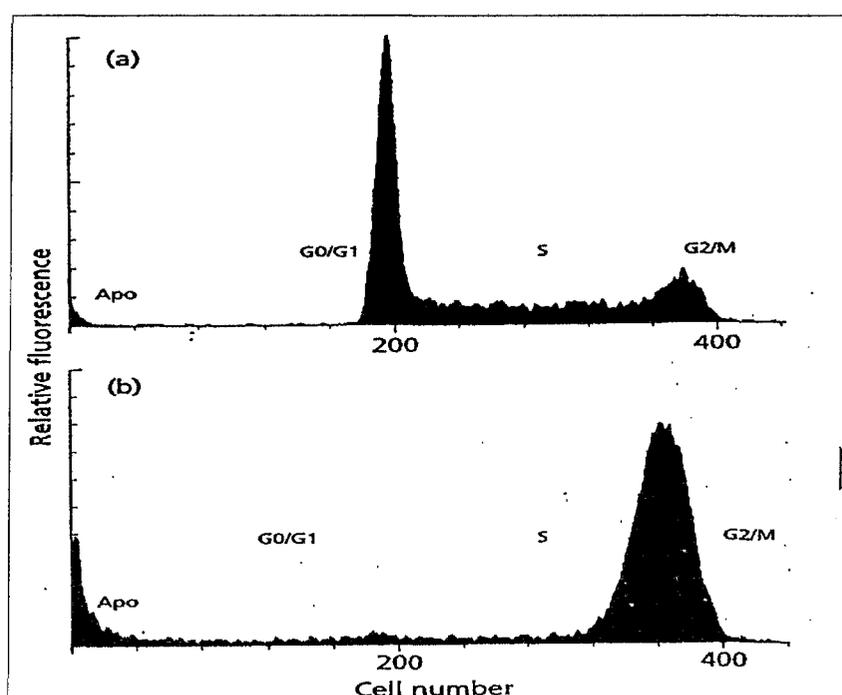
Les deux sortes de taxol induisent un blocage maximum à la concentration de 35 mg/ml. (61)

**Figure 14 :**  
**Répartition des cellules**  
**CCRF-CEM durant la**  
**mitose.**

**(a) : Sans taxol.**

**(b) : Avec taxol.**

**(61)**



### 8.3.3 Production de taxol par *Pestalotiopsis microspora*

La production de taxol est fonction du temps. Elle atteint son maximum après 2 à 3 semaines d'incubation, et décline rapidement après 5 semaines, même si le mycélium continue à pousser. La production maximale de taxol par flacon est de  $55 \pm 10 \mu\text{g}$ .

Le taxol s'est accumulé régulièrement dans le mycélium à un niveau de 20 à 30% de la quantité excrétée dans le milieu de culture.

La quantité totale de taxol produit par litre est de 60 à 70  $\mu\text{g}$ . c'est 3 fois plus que ce qui est produit par *Taxomyces andreanae*, et environ une fois moins que ce qui est trouvé dans la couche interne de l'écorce de *Taxus brevifolia*. Généralement, le taxol représente 0,01% à 0,02 % du poids de l'écorce séchée, et le taxol contenu dans un litre de culture de *Pestalotiopsis microspora* constitue 0,001% du poids sec total du contenu de la culture. (61)

La radioactivité émise par le taxol suite à l'introduction de marqueurs radioactifs dans la culture, est mesurée. Les composés qui se sont le mieux incorporés sont l'acétate de sodium et la phénylalanine. La pureté radiochimique du taxol dérivé de ces 2 composés marqués au carbone 14, est vérifiée par chromatographie bidimensionnelle.

La tâche qui apparaît aux rayons X est identique en taille, forme et localisation à la tâche bleue qui apparaît par chromatographie sur couche mince après pulvérisation d'acide vanilline sulfurique.

Ceci indique clairement que la radioactivité relevée émane bien du taxol, et non d'impuretés radiochimiques. (61)

La découverte d'un champignon autre que *Taxomyces andreanae* pouvant produire du taxol, augmente considérablement la possibilité qu'il y ait un transfert de gènes entre le genre *Taxus* et les organismes endophytes correspondant. Le fait que *Pestalotiopsis microspora* produise lui-même du taxol, conforte l'idée que certains organismes endophytes de *Taxus* fabriqueraient et toléreraient le taxol afin de mieux survivre en association avec les arbres.

Les ifs poussent dans des lieux généralement humides et ombragés, ce que préfèrent aussi certains champignons. Il est rare de trouver des racines pourries à cause de moisissures sur les *Taxus*, car le taxol a le même mode d'action sur ces moisissures que sur les cellules humaines. (61)

#### 8.3.4 *Pestalotiopsis microspora* issu de *Taxodium distichum*

*Pestalotiopsis microspora* a été retrouvé sur un arbre n'étant pas un if : le cyprès chauve, *Taxodium distichum*, un grand conifère, poussant dans des marécages.

L'if (*Taxus*), source originelle de taxol, appartient à la famille des Taxacées. C'est aussi un conifère et il pousse dans les mêmes conditions que le cyprès chauve. Les deux genres sont des arbres à feuilles persistantes, avec des feuilles sur deux rangées linéaires, et les deux ont une préférence pour un environnement humide. Il est possible que le taxol dans le genre *Taxus* serve de protection aux arbres, leur donnant de l'efficacité contre des phycomycètes (*Pythium* et *Phytospora*), qui peuvent causer des problèmes pathologiques aux racines de ces espèces. L'acquisition du mécanisme métabolique de production de taxol par coévolution ou par transfert génétique, par ces endophytes devrait les rendre plus concurrentiels dans l'environnement.

Vu l'énorme potentiel de reproduction de ces champignons par la formation de spores, il est concevable que des productions de taxol par des endophytes puissent

être trouvées dans des plantes ne produisant pas de taxol, mais ayant une écologie similaire à *Taxus*.

Les arbres à feuilles persistantes ressemblant le plus à *Taxus* et ne produisant pas de taxol, sont les cyprès chauves (*Taxodium distichum*).

Sur 7 morceaux de branches de cyprès chauve échantillonnés, 21 endophytes ont été trouvés, 16 sont identifiés comme *Pestalotiopsis microspora*. Chacun produit de nombreuses conidies. Elles sont fusiformes, avec des cellules basales et terminales transparentes et les cellules médianes brunâtres. Elles possèdent 3 ou 4 appendices terminaux. (30)

La culture de ces différentes souches de *Pestalotiopsis microspora* sur des milieux communs a révélé des caractéristiques distinctes pour chacun : des variations sont relevées dans la texture de la surface, la couleur, la forme de la surface du mycélium, les zones striées.

Le comportement des spores de *Pestalotiopsis microspora* sous différentes conditions de développement, a été étudié. Généralement, les conidies qui se forment sont gonflées, mais quand les cultures sont sèches, elles se recroquevillent. Si on les place dans de l'eau distillée, elles se regonflent en quelques secondes.

Cependant, pour les milieux recevant des spores, cela prend 1 à 2 heures pour qu'ils se gonflent. Les spores issues de cultures sèches, éclatent souvent dans l'eau distillée, au bout de 10 à 15 minutes.

Au microscope, les zones à développement de conidies récentes, apparaissent gonflées, alors que sur le même tissu, les vieilles spores sont recroquevillées. (30)

### 8.3.5 Le taxol de *Pestalotiopsis microspora*

Une variation très importante a été découverte au niveau de la production de taxol par *Pestalotiopsis microspora*. Cette différence pourrait offrir un outil important dans le démêlage de la biologie moléculaire de la production de taxol par les champignons, via des techniques d'analyse différentielle par l'ARN<sub>m</sub>. Tous les échantillons de *Pestalotiopsis microspora* ne produisent pas forcément du taxol.

Le composé isolé, dans des quantités de l'ordre du microgramme, possède des propriétés chromatographiques identiques à l'authentique taxol.

Il n'était pas présent dans les milieux de culture non inoculés, et n'a pu être rapporté de l'arbre d'origine, étant donné que le taxol n'est pas présent dans le cyprès chauve.

Le spectre d'absorption UV est aussi identique à celui du taxol originel. (30)

Ainsi, des végétaux autres que les ifs peuvent être une source de microorganismes produisant du taxol.

Les quantités de taxol produites par *Pestalotiopsis microspora* varient entre 50 et 1487 ng/l.

Le genre *Pestalotiopsis* semble être un groupe génétique flexible, aux vues des variations dans leurs caractéristiques de culture, et leur production de taxol. Cette flexibilité pourrait être reliée à leur morphologie cellulaire particulière, et leur faculté à répondre aux conditions environnementales. De telles réponses représenteraient un échange d'informations génétiques permettant à cet organisme d'imiter l'environnement chimique de son hôte, et finalement gagner un certain nombre d'avantages. (30)

### 8.3.6 Stimulation de la production de taxol par *Pestalotiopsis microspora*

La production de taxol par *Taxomyces andreanae* n'étant pas utilisable (de trop faibles quantités de taxol produites, et de trop grandes difficultés de croissance du champignon en milieu de culture), tous les espoirs reposent sur *Pestalotiopsis microspora*.

Il est donc nécessaire de s'assurer de conditions optimales de culture pour la production de taxol, car la fermentation du champignon est sérieusement considérée comme une source commerciale de l'anticancéreux. Par conséquent, toutes les concentrations des composants du milieu standard sont modifiées, ou ils sont substitués par d'autres. Des inhibiteurs métaboliques spécifiques sont ajoutés afin d'orienter cette culture vers une nouvelle voie d'approvisionnement en carbone. (29)

Le raisonnement suivi par Li, Strobel et coll. pour augmenter la production de taxol par *Pestalotiopsis microspora* Ne32 est basé sur l'observation suivante : la plupart des milieux de culture standards, comme le milieu PDA (Potatoe Dextrose Agar), ou le bouillon nutritif, qui supportent de nombreuses plantes associées à des champignons, ou bien ne sont pas adaptés à la croissance de Ne32, ou bien la production de taxol y est inférieure à celle pratiquée sur un milieu M-1D.

Le phosphate de sodium monobasique, à la concentration de 1 µg/ml (soit 20 fois moins que dans le milieu M-1D), va nettement augmenter la production de taxol, tout en maintenant une croissance mycéliale satisfaisante.

Les sulfates de Mn, Mg et Zn, à des concentrations respectives de 0,1, 0,001 et 1g/l, ont un effet optimum sur la production de taxol.

Le phosphate inorganique aura un effet fortement négatif.

Bien que la source de carbone influence le métabolisme, un taux de saccharose supérieur à 100 g/l n'a pas d'effet significatif sur la production de taxol.

L'inhibition de la ribonucléase du sulfate de vanadyl (à la concentration de 0,1 µg/ml) augmente la production de taxol.

Etant donné que le taxol contient une part de benzoate, le benzoate de sodium a été testé à des concentrations allant de 1 à 500 µg/ml, comme stimulateur de la production de taxol. La stimulation maximale a lieu à la concentration de 10 µg/ml. Cette découverte contraste avec le fait que le benzoate marqué au carbone 14 ne servait pas de précurseur du taxol dans *Taxomyces andreanae* et implique qu'il doit y avoir des différences parmi les champignons dans leur biosynthèse de taxol.

*Pestalotiopsis microspora* Ne32 produit de grandes quantités d'ergostérol, qui cristallise à la surface du milieu de culture. Il devrait donc être possible de bloquer la synthèse du stérol, ce qui dirigerait le géranylgeranyl pyrophosphate directement vers la synthèse du taxol. Deux inhibiteurs ont été trouvés : le tébuconazole et le triadimefon. Cependant, ils vont tous deux réduire la croissance mycéliale. Ils ne seront donc ajoutés à la culture qu'après 8 à 10 jours. Ce qui permet de multiplier la production de taxol par 50.

Des combinaisons de tous ces facteurs ont été testées.

L'effet combiné des inhibiteurs de synthèse du stérol, des inhibiteurs de ribonucléase et du précurseur du taxol, sur la production de taxol est légèrement positif avec le triadimefon, et légèrement négatif avec le terbuconazole.

Sur tous les composés étudiés, c'est le terbuconazole seul qui augmente le plus la production de taxol.

Des progrès ont été faits en vue d'approcher un taux de production de taxol supérieur à 1mg/l, ce qui permettrait d'envisager une exploitation commerciale de ce procédé. Mais pour l'instant, ils ne sont pas encore applicables.

## 9 PRODUCTION DE TAXOL PAR CULTURES CELLULAIRES

Les taux de production de taxol par des champignons restant encore faibles et ne permettant pas une exploitation commercialisable, une autre voie est apparue : la culture de cellules issues du genre *Taxus*. Ces cellules sont capables de produire du taxol. Différentes techniques ont été envisagées afin d'améliorer cette production (pour qu'elle puisse atteindre des quantités commercialisables). (13,44)

### 9.1 Culture cellulaire de *Taxus cuspidata* et *Taxus canadensis*

L'équipe de Fett-Netto a introduit des explants de *Taxus cuspidata* et *Taxus canadensis* sur des milieux de culture définis, afin d'induire des cultures de cales et de cellules. Ils ont ensuite analysé l'aptitude des cellules à produire du taxol. Ces cultures en suspension ont été développées et ont servi à obtenir des cultures de cellules immobilisées.

#### 9.1.1 Différentes sources d'explants

Les meilleures sources d'explants testés pour l'induction de cales sont des sections de jeunes tiges. Les cales commencent à se développer sur la surface coupée non immergée, après environ 2 semaines de culture. Ces cales sont friables et jaune pâle. Ils se développent à partir du cambium et du parenchyme externe des cellules. La première prolifération cellulaire débute sur les couches externes des explants. (13)

Un sectionnement longitudinal des tiges montre une prolifération cellulaire intense, probablement due à une grande surface, fournissant suffisamment de composants du milieu.

Les cales dérivant des tiges poussent plus vite pendant les 30 à 40 premiers jours de culture, puis se stabilisent à une vitesse de croissance assez lente. Si aucune subculture n'est effectuée, les cales noircissent au bout d'environ 50 jours et, éventuellement, meurent. La subculture est nécessaire tous les 15 à 25 jours.

A partir des aiguilles, on obtient une réponse similaire, bien que les cales soient plus petits et que leur croissance ralentisse plus tôt. Ceci est certainement dû à la plus faible quantité de méristème et de parenchyme dans les aiguilles de gymnospermes.

A partir de la graine, la croissance *in vitro* ne débute qu'après un certain laps de temps. Une croissance assez hétérogène est observée, avec une moyenne de 15% de cales formés, contre 85% à partir d'explants de tiges ou d'aiguilles. Les cales se forment généralement à partir d'embryons. Occasionnellement, du tissu mégagamétophyte forme de petites excroissances qui poussent très lentement.

Les arilles montrent un développement affecté. Les arilles matures rouges ne poussent pas en culture, sans doute à cause de la lyse cellulaire qui doit être significative à ce stade.

A partir des arilles verts, la croissance est relativement intense pendant 10 à 15 jours de culture, puis s'arrête complètement. Les cales formés à partir des arilles sont relativement durs, et ne libèrent que quelques cellules.

### 9.1.2 Devenir du noircissement en présence de différents agents dans le milieu

Quelque soit l'origine des explants, on observe fréquemment le noircissement des tissus. Ceci résulte probablement de la production et de l'oxydation de composés phénoliques par les explants. Des subcultures fréquentes réduisent le problème mais ne l'éliminent pas.

Afin de réduire le noircissement du cale de tiges ou d'arilles, tout en améliorant leur survie, des antioxydants et des composés phénoliques ont été testés.

Les agents réducteurs tels que l'acide ascorbique ou la cystéine, à la concentration d'1g/l, sont nuisibles à la croissance, qu'ils soient seuls ou associés au polyvinylpyrrolidone.

Le charbon activé (1g/l) réduit le noircissement mais aussi la croissance des explants, sans doute à cause de l'absorption par le charbon des régulateurs de croissance et/ou de sels autres que les sels phénoliques du milieu.

Il est possible, en combinant des concentrations augmentées en régulateurs de croissance et en sels, avec 1g/l de charbon activé, de retrouver une certaine croissance.

Des expériences avec des tiges de *Taxus cuspidata* indiquent que la réponse *in vitro* peut être influencée par la période de l'année où elles ont été récoltées, autant que par les caractéristiques génétiques de la plante donneuse. Les cales produits par la matière collectée en hiver sont plus susceptibles de noircir et d'être contaminés par des bactéries ou des champignons, du moins quand les plantes donneuses poussent en plein air.

### 9.1.3 Immobilisation des suspensions cellulaires

Les cultures cellulaires de *Taxus cuspidata* sont immobilisées spontanément dans des filtres en fibre de verre, dès le premier jour de contact avec le substrat. Les cellules immobilisées poussent à l'intérieur et au sommet des filtres, formant des couches de cellules après occupation des sites d'adhésion disponibles. Après environ deux mois de culture, des microcales sont libérés des filtres. Quand ils sont retirés des flacons de culture et placés sur un nouveau milieu, ils poussent relativement vite pendant les 4 premières semaines, puis se stabilisent à une vitesse de croissance plus lente. La viabilité cellulaire est vérifiée par l'observation visuelle du taux de croissance des microcales, et par des tests de perméabilité au bleu d'Evans. Les analyses indiquent une moyenne de 90% de cellules viables pendant les 6 premiers mois de culture.

Les lignées cellulaires poussant le plus rapidement sont sélectionnées après analyse visuelle intensive des cultures débutées à partir de différentes plantes donneuses, sur une période d'un an.

Des subcultures de cultures cellulaires immobilisées sont réalisées successivement, en collectant les cellules libérées par agitation, ou en enlevant les couches cellulaires externes des filtres avec une spatule stérile. Une des lignées cellulaires sélectionnées affiche une croissance de  $2,8 \pm 0,53$  fois le poids frais après 25 jours de culture.

### 9.1.4 Production de taxol

Le milieu collecté à partir des suspensions cellulaires immobilisées et extrait par du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  contient du taxol et de la baccatine III (analyse par CLHP). Les taux de taxol avoisinent les  $4\mu\text{g/l}$ . Vu la faible solubilité du taxol dans l'eau, et les faibles

quantités détectées dans le milieu, il semble que le taxol dans le milieu résulte du turnover cellulaire plus que d'une sécrétion active.

On laisse pousser les cultures de cellules immobilisées pendant 6 mois, et on en extrait  $0,012 \pm 0,007\%$  de taxol par rapport à un extrait de poids sec. Cette quantité de taxol est comparable à celle trouvée dans l'écorce d'un arbre intact.

Les lignées cellulaires poussant le plus rapidement produisent 3 fois plus de baccatine que les autres lignées.

Ceci suggère qu'il y aurait un blocage métabolique entre la baccatine III et le taxol de ces cellules.

Taxol et baccatine sont identifiés par CLHP (temps de rétention identiques par rapport aux références).

On a donc la possibilité d'obtenir et de maintenir des cales et des cultures cellulaires immobilisées de *Taxus cuspidata* et *Taxus canadensis* pendant plus d'un an. Les cultures de cales de *Taxus cuspidata*, au moins après les 2 premiers mois, produisent du taxol en quantité équivalente à celles produites à partir des tiges de la plante intacte ou de l'écorce de *Taxus brevifolia*.

Les cultures cellulaires immobilisées produisent autant de taxol que l'écorce d'une plante, après au moins 6 mois.

Différentes approches sont possibles pour augmenter le rendement de production du taxol : optimisation des conditions de culture, alimentation en précurseurs, sélection de lignées cellulaires à haut rendement, perméabilisation des cellules immobilisées par des agents physiques ou chimiques. (13)

## 9.2 Amélioration des cultures cellulaires et de la production de taxol

### 9.2.1 Influence des sucres du milieu de culture sur la production de taxol

Afin d'améliorer le procédé de production de taxol à partir de plants en culture, des études ont été faites sur les facteurs affectant la productivité, à commencer par la source de carbone : on a donc testé différents sucres, à des concentrations variées.

Cette étude a été réalisée par Kim et coll. (24), à partir de suspensions cellulaires de *Taxus brevifolia*.

Le saccharose est en général la source la plus indiquée pour la croissance dans les cultures cellulaires : il est rapidement hydrolysé en glucose et fructose.

Ici sont testés le saccharose, le lactose, le galactose, le glucose, le fructose, le mannitol et le sorbitol.

La meilleure croissance a lieu en présence de galactose, bien qu'il n'y ait que de faibles écarts de croissance entre les différents sucres (à part pour le mannitol et le sorbitol sur lesquels la croissance est très faible).

Les résultats après 21 jours de croissance sur chaque sucre se trouvent dans le tableau 3.

Sur aucun de ces milieux, du taxol n'a pu être détecté. Pour induire une production de taxol, les milieux de culture sont donc modifiés, en particulier leur concentration en sucres. On utilise des solutions à 8% de sucres.

Les résultats de production sont notifiés dans le tableau 4.

La plupart des milieux produisent du taxol (même le mannitol et le sorbitol, sur lesquels pourtant la croissance cellulaire est très difficile).

Le plus haut niveau de taxol est obtenu avec le fructose. La concentration optimale de chaque sucre pour produire du taxol est d'environ 6% dans tous les cas. La concentration maximale de taxol produit est de 1,43 mg/l quand 6% de fructose sont ajoutés, ce qui représente 0,013% du contenu. (24)

D'autres études ont montré que la présence de glucose en plus du fructose ne conduit pas à une synergie ou à une addition des effets : les indices de croissance sont les mêmes que ceux observés dans le cas du fructose seul. (66)

**Tableau 3 :**

**Effets de différents sucres sur la croissance cellulaire de cultures de *T. brevifolia*. (24)**

Sucre	Concentration (g/l)
Sacharose	15,9
Lactose	14,8
Galactose	16,7
Glucose	15,3
Fructose	15,7
Mannitol	7,5
Sorbitol	6,8

**Tableau 4 :**

**Effets de différentes solutions à 8% de sucre sur production de taxol. (24)**

Solution à 8% de sucre	Taxol (mg/l)
Sacharose	0,012
Lactose	0
Maltose	0,01
Fructose	0,172
Galactose	0,123
Glucose	0,061
Mannitol	0,049
Sorbitol	0,135
2% sucre + 6% sorbitol	0,11
2% sucre + 6% sorbitol	0,142

### 9.2.2 Effets de la lumière sur l'accumulation de taxol et de baccatine III dans les cultures cellulaires de *Taxus cuspidata*

La lumière est connue pour affecter le métabolisme de différents produits, tels que les diterpènes et les sesquiterpènes. Ses effets sont testés par l'équipe de Fett-Netto, sur des cultures cellulaires de *Taxus cuspidata*.

Les cales exposés à la lumière apparaissent verdâtres et moins friables que ceux poussant dans l'obscurité. Et ils renferment 3 fois moins de taxol et de baccatine III. Une comparaison entre des ifs (*Taxus brevifolia*) exposés au soleil et d'autres exposés à l'ombre, montre que l'on retrouve moins de taxol et de céphalomannine dans l'écorce des arbres exposés au soleil.

L'exposition à la lumière va aussi réduire la croissance au niveau des suspensions cellulaires. Deux théories sont avancées pour expliquer ce fait.

La première est que la lumière agirait directement sur les cellules, en affectant la taille de la population cellulaire se divisant.

La deuxième possibilité est que la lumière stimulerait la biosynthèse de composés phénoliques. Ces composés peuvent ensuite se lier à des enzymes, et ainsi inhiber leur activité.

L'accumulation de taxol dans les cellules, lors d'exposition à la lumière, se fait d'une manière beaucoup plus régulière qu'en l'absence de lumière, probablement à cause des taux de croissance nettement plus faible : on y trouve 3 fois moins de taxol. Une raison possible de cette réduction de production de taxol serait l'inhibition par la lumière de la HMGR (3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-coenzyme A Reductase) : c'est une enzyme clé dans la synthèse de mévalonate, précurseur éloigné du taxol. L'inhibition de cette enzyme par la lumière contribuerait à réduire le pool de mévalonate utilisable dans la biosynthèse de taxol.

Une autre explication pourrait être la stimulation de la synthèse phénolique : la lumière stimule l'activité de la phénylalanine ammonia lyase, qui contribue à la transformation de phénylalanine en dérivés phénoliques. Cette voie diminue donc la

quantité de phénylalanine disponible pour l'assemblage de la chaîne latérale du taxol. (14)

### 9.2.3 Rôle de la composition en gaz sur des cultures cellulaires de *Taxus cuspidata*

Des relations entre la présence de certains gaz et les performances des cultures, ont été mises en évidence. Trois gaz semblent avoir de l'importance chez les cellules végétales : l'oxygène, le dioxyde de carbone et l'éthylène.

L'oxygène joue un rôle important dans la respiration, ainsi que dans d'autres aspects du métabolisme cellulaire.

Le dioxyde de carbone semble influencer les cultures de suspensions cellulaires poussant de manière hétérotrophique.

L'éthylène a de nombreux effets physiologiques, incluant l'inhibition de la croissance et la stimulation de la production de métabolites secondaires à partir des cultures cellulaires. Le dioxyde de carbone peut retarder ou inhiber certains effets de l'éthylène.

Mirjalili et Linden (36) se sont intéressés aux effets possibles de ces gaz sur la production de taxol.

Dans leurs expériences, les cultures en suspension sont exposées à des concentrations connues et constantes d'oxygène, de dioxyde de carbone et d'éthylène pendant 4 semaines. L'interaction du dioxyde de carbone et de l'éthylène a un effet important sur la production de taxol dans 10% d'oxygène. La combinaison de 10% de dioxyde de carbone avec 2 ppm d'éthylène, inhibe la production de taxol alors qu'une faible quantité de dioxyde de carbone (0,5%), avec toujours 2 ppm d'éthylène, a un effet positif sur la production de taxol.

La composition de la phase influence donc la vitesse et le taux de production de taxol dans les cultures de *Taxus cuspidata*. Des concentrations, inférieures pour l'oxygène et supérieures pour le dioxyde de carbone et l'éthylène à celles de l'air ambiant, sont favorables à la production de taxol. La combinaison de gaz la plus efficace est composée de 10% d'oxygène, 0,5% de dioxyde de carbone et de 5 ppm d'éthylène. Ce qui va produire 6,5 mg/l de taxol en 21 jours. L'addition de 10 g/l de fructose le onzième jour fait passer la concentration à 12,2 mg/l. (36)

#### 9.2.4 Action du jasmonate de méthyl sur la production de taxol

Généralement, quand les cellules végétales perçoivent des changements dans leur environnement par des récepteurs spécifiques ou des mécanismes de perception, elles génèrent des réponses biologiques. L'accumulation de taxol dans les plantes pourrait donc être la réponse à des stimuli externes spécifiques.

L'équipe de Yukimune a donc analysé plusieurs inducteurs de signaux, tels que des hormones, des polyamines, des inhibiteurs chimiques et fongiques, pour leur capacité à induire la biosynthèse de taxanes.

Il est apparu que le jasmonate de méthyl promouvait fortement la synthèse de taxol.

Les jasmonates sont connus pour jouer un rôle important dans l'induction de signaux qui régulent les gènes de défense chez les végétaux. Le jasmonate de méthyl appliqué à la surface de plants de tomates, induit la synthèse de protéinases inhibitrices.

Des cultures de suspension de *Taxus media*, établies à partir de tissus de cales dérivés d'embryons, poussent dans un milieu liquide. L'index de croissance moyenne est d'environ 2,5 après 14 jours de culture.

100  $\mu$ M de jasmonate de méthyl sont ajoutés au milieu de culture juste après l'inoculation des cellules. La formation est analysée après 14 jours, par CLHP. Paclitaxel et baccatine III sont identifiés aux substances de référence. Les quantités sont multipliées par 5,1 pour le taxol, 20,2 pour la baccatine III, et 2,4 pour la céphalomannine, par rapport aux valeurs des cellules de contrôle.

Dans les cellules traitées au jasmonate de méthyl, le contenu en paclitaxel augmente après un délai de 4 jours, et continue à s'accumuler de façon linéaire pendant au moins 14 jours. Dans les cultures de contrôle, la quantité totale de taxanes qui reflète la somme de taxol, baccatine III et céphalomannine est de 844 nmol/flacon. Elle est de 3686 nmol/flacon dans les cultures traitées par jasmonate de méthyl (soit 68% de paclitaxel, 28% de baccatine III et 4% de céphalomannine).

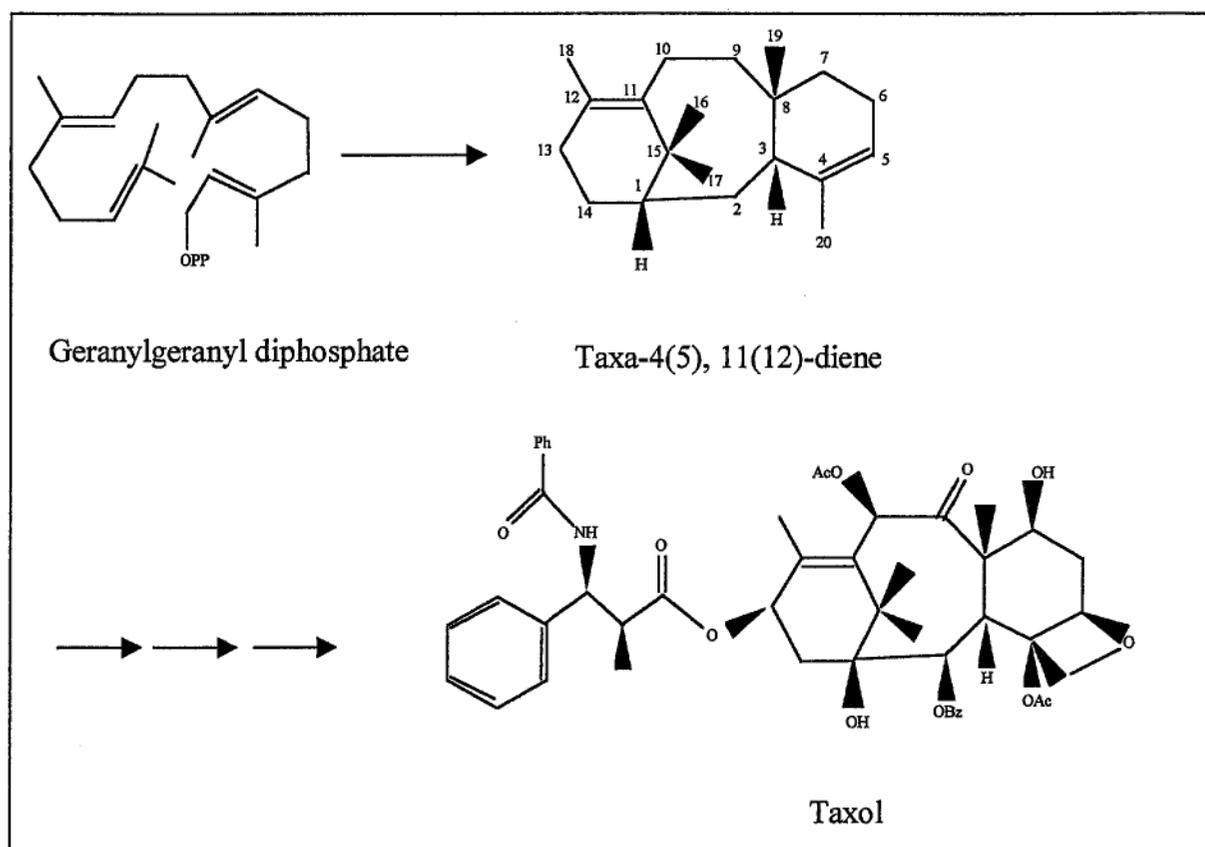
D'un point de vue biosynthétique, le paclitaxel et la céphalomannine sont des dérivés d'un précurseur universel des diterpénoïdes, le géranylgeranyl diphosphate.

Le paclitaxel augmente beaucoup plus que la baccatine III et encore plus que la céphalomannine. Yukimune et coll. ont suggéré que le jasmonate de méthyl contribuait à la production de paclitaxel, pas seulement en activant les étapes de synthèse du géranylgeranyl diphosphate en baccatine III (en ce qui concerne le paclitaxel et la céphalomannine, car celle-ci comporte une partie de baccatine III), mais aussi en activant les étapes de synthèse de paclitaxel à partir de la baccatine III. Les productions de taxanes dans des cultures cellulaires de *Taxus media*, *Taxus baccata* et *Taxus brevifolia* ont été comparées. Dans les cultures de contrôle, c'est *Taxus media* qui montre la plus grande productivité, alors que dans *Taxus baccata* et *Taxus brevifolia*, les productions sont faibles. En présence de méthyl jasmonate, les cultures de *Taxus media* montrent une augmentation du paclitaxel et celles de *Taxus baccata*, une augmentation de la baccatine III. En revanche, au niveau de *Taxus brevifolia*, la production de taxanes reste faible.

Dans *Taxus media*, le paclitaxel continue à s'accumuler de façon linéaire pendant 14 jours, pour atteindre un taux de 110mg/l en 2 semaines. (69)

## 9.2.5 Rôle de la taxadiène synthétase

La première étape engagée dans la biosynthèse du taxol dans le tissu des tiges de *Taxus brevifolia*, implique la cyclisation du géranylgeranyl diphosphate (GGPP) en taxa-4(5),11(12)-diène, afin d'établir le squelette du taxol, qui subira ensuite une modification oxydative extensive, et l'addition de chaînes latérales (figure 15).



**Figure 15 : Cyclisation du géranylgeranyl diphosphate en taxa-4(5), 11(12)-diène. (19)**

L'enzyme responsable, la taxadiène synthétase, est une protéine monomérique de 79 kDa qui, dans ses propriétés générales, ressemble aux autres cyclases de terpénoïdes, en particulier celles de gymnospermes. L'ADN<sub>c</sub> correspondant au

mécanisme de cyclisation a été isolé à partir des tiges de *Taxus brevifolia*. L'ADN<sub>c</sub> de cette cyclase diterpénoïde ressemble à celui des autres cyclases terpénoïdes dans sa structure primaire, et code pour une préprotéine de 98 kDa contenant un gros peptide ayant pour cible le plastide.

Les faibles niveaux d'activité de la taxadiène synthétase dans la tige de *Taxus*, la très faible quantité de taxoïdes dans ce tissu (5 à 10 µg/kg d'écorce sèche), et son adaptation efficace *in vivo*, suggèrent que l'étape de cyclisation est lente.

En considérant la possibilité de manipulations transgéniques pour améliorer les quantités de taxol produites, il est nécessaire d'évaluer le rôle de l'étape de cyclisation dans le contrôle du flux. Des expériences de ce type sur des arbres du genre *Taxus* sont exclues à cause des variations individuelles dans la contenance en taxoïdes et à cause de l'obligation de destruction des échantillons.

Les études de la taxadiène synthétase sont donc faites sur cultures cellulaires.

*In vivo* et *in vitro*, elles suggèrent que la première étape de la voie de synthèse, dans laquelle la taxadiène synthétase catalyse la conversion du précurseur des diterpènes, le GGPP, en squelette carboné de taxanes, est très lente et représente peut-être un facteur limitant. L'approche classique pour évaluer les niveaux de précurseurs *in vivo* et le produit d'une étape limitante est exclue ici car le GGPP est à la fois labile et il possède de nombreux autres rôles métaboliques. La taxadiène synthétase est isolée de cellules cultivées en suspension à partir de plusieurs lignées de *Taxus baccata*, *Taxus cuspidata*, *Taxus canadensis* et *Taxus brevifolia* qui produisent un éventail de niveaux de taxol à J15 du cycle de croissance. La présence de l'activité de la taxadiène synthétase a été retrouvée dans tous les cas. Les niveaux d'activité sont proportionnels aux contenus en taxol. En général, l'apparition de l'activité précède d'au moins 3 jours l'accumulation de taxol, et cette activité persiste dans une phase stationnaire. Mais l'aptitude à produire du taxadiène n'est pas elle-même suffisante à promouvoir la formation de taxol, ceci impliquant des étapes en aval de la cyclisation dans le contrôle du flux.

Les niveaux et temps d'apparition de la taxadiène synthétase, en relation avec l'accumulation du taxol dans les cultures, suggèrent que, bien que l'étape de cyclisation du diterpène soit lente, il est peu probable que cela soit un facteur limitant dans la formation du taxol. (19)

Les propriétés et le mécanisme de la taxadiène synthétase ont été examinés en détails. L'ADN<sub>c</sub> correspondant a été cloné, et plusieurs des hydroxylations catalysées par le cytochrome P450, ainsi que des étapes d'acylation ont été démontrées. Les gènes codant la GGPP synthétase sont intéressants car la prényltransférase fournit le substrat pour la prénylation de protéine, la synthèse des chaînes latérales de quinones et tocophérols prénylés, la production de pigments caroténoïdes, ainsi que pour la biosynthèse de produits naturels diterpénoïdes tels que le taxol.

Une hybridation de la GGPP synthétase de *Taxus canadensis* est obtenue pendant une sélection par la taille sur des produits clonés, initialement amplifiés par PCR dans le but d'accéder aux acyltransférases. Sur 46 clones ainsi acquis, un fragment a été trouvé, ressemblant aux GGPP synthétase d'angiospermes. Par comparaison avec les autres séquences de GGPP synthétases décrites, ce clone paraît coder les 194 premiers acides aminés de la protéine traduite.

Comparée à d'autres GGPP synthétases dérivées de plantes, la séquence d'acides aminés de l'enzyme de gymnospermes montre un niveau élevé de similitudes sur pratiquement toute la région de codage.

Cependant la majorité des clones a été identifiée par comparaison de séquences et non par l'expression fonctionnelle de leur activité. (18)

L'effet du jasmonate de méthyl sur la taxadiène synthétase a été étudié.

Des cultures cellulaires sont traitées par le jasmonate de méthyl. Au bout de 7 jours, la concentration de taxol dans le milieu est passé de 2,5 à 32 mg/l. La régulation de l'expression de gènes pendant le temps d'induction est examinée par analyse de

l'ARN total isolé des cellules utilisées comme détecteur de la GGPP synthétase et de la taxadiène synthétase.

Une augmentation rapide dans les niveaux d'ARN<sub>m</sub> de GGPP synthétase est observée au bout de 8 heures, et ces niveaux restent significativement élevés pendant au moins 48 heures avant de décliner. Cependant, même après 168 heures, les taux sont encore bien supérieurs à ceux de cellules non induites par le jasmonate de méthyl.

L'activité de ces deux enzymes augmente aussi avec le temps, en réponse au jasmonate de méthyl.

L'ADN<sub>c</sub> de la GGPP synthétase de *Taxus canadensis* est cloné et peut être exprimé fonctionnellement chez un hôte eucaryote. Cela permet d'envisager la possibilité d'augmenter les quantités de taxol des cellules de *Taxus* génétiquement modifiées, dans lesquelles les gènes des étapes lentes sont surexprimés et où le maintien d'un haut niveau de GGPP est requis. (18)

THESE SOUTENUE PAR : SOPHIE MAHIER  
TITRE : LE TAXOL ET SES NOUVELLES SOURCES  
D'APPROVISIONNEMENT

## CONCLUSION

En 1971, un nouveau composé isolé à partir de l'écorce de l'if du Pacifique, *Taxus brevifolia*, a été décrit. Ce composé, appelé taxol, a démontré une activité *in vivo* contre des cellules leucémiques murines, le sarcome 180 et d'autres tumeurs. Vingt ans après son isolement, l'élucidation de sa structure et de sa bioactivité, le taxol est devenu un nouvel agent anticancéreux, utilisé dans les cancers du sein et des ovaires.

Une attention particulière s'est portée sur ce médicament, et ceci pour deux raisons. La première est que le taxol représente un nouvel atout contre les cancers réfractaires du sein et des ovaires, qui sont difficiles à traiter et qui sont responsables de la mort de dizaines de milliers de femmes tous les ans.

La seconde est qu'il présente un mode d'action sans précédent dans la classe des agents anticancéreux. La cible du taxol est la formation des microtubules. Mais contrairement aux autres agents qui bloquent leur formation, le taxol promeut la polymérisation de la tubuline, et stabilise les microtubules contre la dépolymérisation.

Cependant, l'utilisation du taxol n'est pas dénuée de problèmes. Il est isolé à partir de l'écorce de l'if du Pacifique. Or, l'if est un arbre poussant relativement lentement. Le taxol en est extrait en très faibles quantités. Ce qui représente, à terme, une source limitée.

Il a donc fallu trouver d'autres moyens d'obtenir du taxol. A l'heure actuelle, le taxol commercialisé est obtenu par hémisynthèse, à partir d'un précurseur dérivé des

feuilles d'if. Mais, là encore, la production est dépendante de l'arbre. Les chercheurs se sont donc tournés vers d'autres voies. Des efforts de recherche ont porté, en particulier, sur la culture cellulaire et la production de taxol par des microorganismes.

Un champignon, ou une bactérie, capable de produire du taxol à un taux de 50 mg/l, représenterait une source inépuisable de produit. *Pestalotiopsis microspora* et *Taxomyces andreanae* sont deux champignons endophytes de l'if, capables de produire du taxol indépendamment de celui-ci. Mais les quantités produites, mêmes si elles sont plus importantes que celles obtenues directement à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia*, restent tout de même trop faibles pour envisager une production industrielle.

Quant à la production de taxol à partir de cultures cellulaires, elle reste également insuffisante. Les différentes combinaisons de stimulation de culture n'ont pas encore abouti à une méthode applicable sur le plan industriel.

Pourtant, si une des sources isolées s'avérait acceptable, davantage de produit serait disponible pour la recherche et les traitements, à moindre coût pour les patients, et sans aucune incidence sur l'environnement. D'un point de vue à la fois écologique et économique, une source alternative libérerait de la dépendance de l'if.

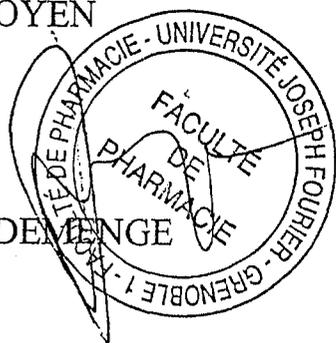
Ces nouvelles voies laissent ainsi entrevoir d'encourageantes perspectives d'amélioration de l'approvisionnement en taxol.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN

Pr P. DEMANGE



LE PRESIDENT DE THESE

Pr F. SEIGLE-MURANDI

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams JD, Flora KP, Goldspiel BR, Wilson JW, Arbuck SG, Finley R. Taxol: A Historical of Pharmaceutical Development and Current Pharmaceutical Concerns. J. Nat. Cancer Inst. Monographs 1993;15:141-147.
2. Appendino G. TAXOL® (paclitaxel) : historical and ecological aspects. Fitoterapia 1993;LXIV(Suppl. al N.1):5-25.
3. Arbuck SG, Adams J, Stauss H et al. A reassessment of cardiac toxicity associated with taxol. Second National Cancer Institute Workshop on Taxol and *Taxus*. 1992.
4. Beijnen JH, Huizing MT, Ten Bokkel Hinink WW, Veenhof CHN, VerMorken JB, Giaccone J, Pinedo HM. Bioanalysis, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel anticancer drug paclitaxel (taxol). Semin. Oncol. 1994;21.Suppl.8:53-62.
5. BIAM : TAXOL 30mg/50ml sol inj pour perfusion (Hôp). 1998.
6. Boullard B. Dictionnaire Plantes et champignons. 1997. Ed ESTEM. 794.
7. Bristol-Myers Squibb Oncologie. TAXOL® (pactitaxel), le 1<sup>er</sup> cytotoxique de la classe des taxanes. 1994.

8. Bruneton J. Pharmacognosie 1999. 3<sup>ème</sup> éd. Tec & Doc.
9. Colin M, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Potier P. Stereoselective Synthesis of the Paclitaxel Side Chain. Chem. Abstr. 1988;**109**:22762-22763.
10. Denis JN, Greene AE, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Mangatal L, Potier P. A Highly Efficient, Practical Approach to Natural Taxol. J. Am. Chem. Soc. 1988;**110**:5917-5919.
11. Ding AH, Porteu F, Sanchez E, Nathan CF. Shared action of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. Science 1990;**22**:613-617.
12. Dorr RT. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. Annals of Pharmacotherapy 1994;**28**:S11-S34.
13. Fett-Netto AG, DiCosmos F, Reynolds WF, Sakata K. Cell culture of *Taxus* as a source of antineoplastic drug taxol and related taxanes. Biotechnology 1992;**10**:1572-1575.
14. Fett-Netto AG, Pennington JJ, DiCosmo F. Effect of White Light on Taxol and Baccati III Accumulation in Cell Cultures of *Taxus cuspidata*. J. Plant. Physiol. 1995;**146**:584-590.
15. Gennari C, Carcano M, Donghi M, Mongelli N, Vanotti E, Vulpetti A. Taxol Semisynthesis : A Highly Enantio- and Diastereoselective Synthesis of the Side Chain and a New Method. J. Org. Chem. 1997;**62**:4746-4755.

16. Georg GI, Ali SM, Zygmund J, Jayasinghe LR. Taxol : a novel antitumor agent. *Exp. Opin. Ther. Patents* 1994;**4**:109-120.
17. Guéritte-Voegelein F, Sénilh V, David B, Guénard D, Potier P. Chemical studies of 10-deacetyl baccatin III. Hemisynthesis of Taxol derivatives. *Chemical Studies Of 10-Deacetyl baccatin III. Hemisynthesis of Taxol Derivatives. Tetrahedron* 1986;**42**:4451-4460.
18. Hefner J, Ketchum REB, Croteau R. Cloning and Functional Expression of a cDNA Encoding Geranylgeranyl Diphosphate Synthetase *from Taxus canadensis* and Assessment of the Role of this Peryltransferase in Cells in Cells Induced for Taxol Production. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;**360**:62-73.
19. Hezari M, Ketchum REB, Gibson DM, Croteau R. Taxol Production and Taxadiene Synthase Activity in *Taxus canadensis* Cell Suspension Cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997;**337**:185-190.
20. Ho SY, Barbarese E, D'Arrigo JS, Smith-Slatas C, Simon RH. Evaluation of Lipid- coated Microbubbles As a Delivery Vehicle for Taxol in Brain Tumor Therapy. *Neurosurgery* 1997;**40**:1260-1267.
21. Horwitz SB. How To Make Taxol From Scratch. *TIPS* 1992;**13**:134-139.
22. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends in Pharmacological Science* 1992;**13**:134-136.

23. Horwitz SB, Lothstein L, Manfredi JJ et al. Taxol mechanisms of action and resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1986;**466**:733-744.
24. Kim JH, Yun JH, Hwang YS, Byun SY, Kim DI. Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures : effect of sugar. *Biotechnology Letters* 1995;**17**:101-106.
25. Kingston DG. History and chemistry, in : McGuire WP, Rowinsky EK, editors. *Paclitaxel in cancer treatment*. Marcel Dekker, Inc. : New York, 1995:1-33.
26. Kingston DGI, Samaranayake G, Ivey CA. The chemistry of TAXOL®, a clinically useful anticancer agent. *J. Nat. Prod.* 1990;**53**:1-12.
27. Kohler DR, Goldspiel B. Evaluation of new drugs : Paclitaxel (Taxol). *Pharmacotherapy* 1994;**14**:1-34.
28. Lavelle F, Combeau C, Commerçon A. Les taxoïdes : propriétés structurales et expérimentales. *Bull. Cancer* 1995;**82**:249-264.
29. Li JY, Sidhu RJ, Bollon A, Strobel G. Stimulation of taxol in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycol. Res.* 1998;**102**:461-464.
30. Li JY, Strobel G, Sidhu R, Hess WM, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology* 1996;**142**:2223-2226.
31. Long HJ. Subspeciality clinics : oncology-Paclitaxel (Taxol) : a novel anticancer chemotherapeutic drug. *Mayo. Clin. Proc.* 1994;**69**:341-345.

32. Lubejko BG, Apfel SC, Dutcher JP et al. Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. *Neurology* 1989;**39**:368-373.
33. Mangatal L, Adeline M-T, Guénard D, Guéritte-Vogelein F, Potier P. Application of the vicinal oxyamination reaction with asymmetric induction to the hemisynthesis of taxol and analogues. *Tetrahedron* 1989;**45**:4177-4190.
34. McNeil, C. Semisynthetic taxol goes on market amid ongoing quest for new versions. *J. Natl Cancer Inst.* 1995;**87**:1106-1108.
35. Meerum Terwogt JM, Nuijen B, Ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH. Alternative formulations of paclitaxel. *Cancer Treat. Rev.* 1997;**23**:87-95.
36. Mirjalili N, Linden JC. Gas Phase Composition Effects on Suspension Cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotech. Bioeng.* 1995;**48**:123-132.
37. Monsarrat B, Alvinerie P, Wright M et al. Hepatic metabolism and biliary excretion of taxol in rats and humans. Workshop on taxol and taxus. *Monogr. Natl. Cancer Inst.* 1993;**15**:39-46.
38. Myers F. Surprise ! A Fungus Factory For Taxol ? *Science* 1993;**260**:154-155.
39. Nicolaou KC, Dai WM, Guy RK. Chemistry and biology of Taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994;**33**:15-44.

40. Nicolaou KC, Guy RK. Taxol : From Discovery to Therapeutic Use. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995;**34**:2079-2083.
41. Nicolaou KC, Guy RK, Potier P. Les taxoïdes : de nouvelles armes contre le cancer. *Pour la Science* 1996;**226**:100-104.
42. Nicolaou KC, Nantermet PG, Ueno H, Guy RK, Couladouros EA, Sorensen EJ. Total Synthesis of Taxol. Retrosynthesis, Degradation and Reconstitution. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;**117**:624-633.
43. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ et al. Biosynthesis of Taxoids. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;**117**:645-648.
44. Pezzuto J. Taxol production in plant cell culture comes of age . *Nature Biotechnology* 1996;**14**:1083.
45. Rowinsky EK, Chaudhry V. The neurotoxicity of taxol. Second National Cancer Institute Workshop on Taxol and Taxus. 1992.
46. Rowinsky EK, Donehower RC. The clinical pharmacology of paclitaxel (TAXOL®). *Semin. Oncol.* 1993;**20**,Suppl.3:16-25.
47. Rowinsky EK, Donehower RC, Jones RJ, Tucker RW. Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res.* 1988;**48**:4093-4100.
48. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chandhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (TAXOL®). *Semin. Oncol.* 1993;**20**.Suppl.3:1-15.

49. Rowinsky EK, McGuire WP, Guarnieri T, Fisherman JS, Christian MC, Donehower RC. Cardiac disturbances during administration of taxol. *J. Clin. Oncol.* 1991;**9**:1704-1712.
50. Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG. Taxol : the first of taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin. Oncol.* 1992;**19**:646-662.
51. Sarosy G, Kohn E, Stone DA et al. Phase I study of taxol and granulocyte colony-stimulating factor in patients with refractory ovarian cancer. *J. Oncol.* 1992;**10**:1165-1170.
52. Sciff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by TAXOL®. *Nature* 1979;**277**:665-667.
53. Sénilh V, Guéritte-Voegelein F, Guénard D, Colin M, Potier P. Mode of Formation of The Taxol Side Chain. *Acad. Sc. Paris* 1984, *série II*, 1039-1042.
54. Sharma A, Mayhew E, Bolcsak L. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian xenografts. *Int. J. Cancer* 1997;**71**:103-107.
55. Shiff PB, Fant J, Horwitz SB. Taxol : A New Anticancer Agent *Nature* 1979;**277**:665-670.
56. Slichenmyer WJ, Von Hoff DD. TAXOL® : a new and effective anticancer drug. *Anticancer Drugs* 1991;**2**:519-530.

57. Sonnichsen DS, Relling MV. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin. Pharmacokinet.* 1994;**27**(4):256-269.
58. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andrenae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science* 1993;**260**:214-216.
59. Stierle A, Strobel G, Stierle D, Grothaus P, Bignami G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 1995;**58**:1315-1324.
60. Strobel G, Stierle A, Stierle D, Hess WH. *Taxomyces andrenae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific Yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon* 1993;**XLVII**:71-80.
61. Strobel G, Yang X, Sears J et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 1996;**142**:435-440.
62. Therre H. Les Taxoïdes en Vedette. *Biofutur.* 1993:22-25.
63. Thompson D.O. Cyclodextrins-Enabling Excipients : Their Present and Future Use in Pharmaceuticals. *Therapeutic Drug Carrier Systems.* 1997;**14**:1-104.
64. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of TAXOL®, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am. Chem. Soc.* 1971;**93**:2325-2327.

65. Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH et al. Hypersensitivity reactions from taxol. *J. Clin. Oncol.* 1990;**8**:1263-1268.
66. Wickremesinhe ERM, Artega RN. *Taxus* Cell Suspension Cultures : Optimizing Growth and Production of Taxol. 1994;**144**:183-188.
67. Wiernik PH, Schwartz EL, Stauman JS, Dutcher JP, Lipton RB, Paietta. Phase I clinical and pharmacokinetic study of TAXOL®. *Cancer. Res.* 1987;**47**:2486-2493.
68. Yu CD. Polyoxyethylene Casror Oil Derivatives. 371-374.
69. Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. Methyl jasmonat-induced overproduction of paclitaxel and baccatine III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology* 1996;**14**:1129-1132.



# 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 ils m'abusent.



**RESUME :**

Le taxol est un agent anticancéreux d’origine naturelle issu de l’écorce de l’if du Pacifique, *Taxus brevifolia*.

Devant les faibles quantités extraites, les chercheurs ont dû se tourner vers d’autres moyens de production.

Cet ouvrage décrit toutes les propriétés du taxol : ses caractéristiques chimiques et pharmacocinétiques, son mode d’action, ses indications.

Il relate ensuite les problèmes de formulation posés par la faible solubilité du taxol.

Il aborde enfin les nouvelles possibilités d’approvisionnement en taxol : champignons endophytes de l’if, et les cultures cellulaires.

Ces différentes voies laissent entrevoir des perspectives encourageantes.

**MOTS CLES :**

Taxol  
Champignons endophytes  
Culture cellulaire  
Stimulation de production

**JURY :**

**PRESIDENT :** Madame le Professeur F. Seigle-Murandi

**MEMBRES :** Monsieur le Docteur S. Krivobok

Monsieur B. Champon

**DATE DE SOUTENANCE :** 15 Octobre 1999