

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR FRANCE-IDA JEAN

B. SC. CHIMIE

ANALYSE DE PRODUITS NATURELS DE *TAXUS CANADENSIS*

1992



### **Mise en garde/Advice**

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

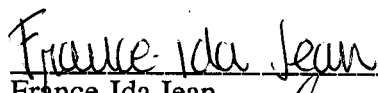
## RÉSUMÉ

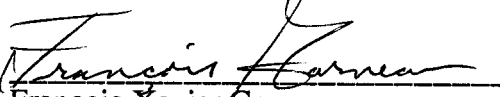
Dans le but de mieux connaître les produits naturels de *Taxus canadensis*, nous avons étudié la composition chimique de cet arbuste du Saguenay--Lac-St-Jean, sous trois aspects: son huile essentielle, ses glycosides et ses taxanes (plus spécifiquement le taxol).

L'extraction de l'huile essentielle des branches d'ifs par entraînement à la vapeur d'eau et son analyse par chromatographie en phase gazeuse capillaire et par spectrométrie de masse ont permis de séparer plusieurs produits volatils et d'en identifier 31, dont l'oct-1-én-3-ol qui est le produit majeur à 40%. La quantité d'huile extraite est faible, 0,03% de rendement variant légèrement selon la saison, et cette huile, contrairement aux autres conifères, contient peu de monoterpènes.

L'extraction et l'hydrolyse enzymatique des glycosides des aiguilles d'ifs suivies d'analyses par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse nous a permis de séparer 34 aglycones dont 19 se retrouvent aussi dans l'huile essentielle. Les aglycones majeurs sont l'oct-1-én-3-ol à 40% et le 3,5-diméthoxyphénol à 26%. Le rendement en aglycones de 0,09% est trois fois plus élevé que celui en huile essentielle et l'enzyme cellulase permet d'hydrolyser un peu plus d'aglycones que la  $\beta$ -glucosidase.

Nous avons extrait le taxol et d'autres taxanes à partir des aiguilles et des tiges d'ifs et nous avons dosé le contenu en taxol par chromatographie liquide à haute performance. Le contenu en taxol des aiguilles est de l'ordre de 0,01%, ce rendement est plus élevé que celui des tiges et il décroît du printemps à l'automne. L'isolation du taxol en quatre étapes, à partir des aiguilles, a permis de récupérer 0,003% de taxol. L'identification du taxol a été confirmée par diverses analyses dont la résonance magnétique nucléaire du proton. Nous avons aussi isolé un taxane inconnu pour lequel nous proposons une structure. Des essais sur la réactivité de la molécule du taxol ont confirmé les sites préférentiels d'acétylation soit 2' et, en second lieu, 7.

  
France-Ida Jean

  
François-Xavier Garneau

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, que ce soit professionnellement, moralement ou financièrement.

Un merci particulier à M. François-Xavier Garneau qui, par son enthousiasme et sa grande disponibilité, m'a aidée et encouragée sans relâche.

Merci à M. Guy Collin pour son soutien et ses conseils judicieux.

J'offre aussi mes remerciements à M. Michel Gagnon pour son aide lors des analyses en spectrométrie de masse ainsi qu'à Mme Lolita Zamir qui m'a accueillie généreusement lors d'un stage à son laboratoire et qui m'a permis de réaliser les analyses en résonance magnétique nucléaire.

Merci enfin à mes compagnes et compagnons de travail qui, par leur amitié, m'ont épaulée tout au long de ces deux années.

Le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR), ainsi que le Programme d'aide institutionnelle à la recherche (PAIR) de l'UQAC ont contribué à la réalisation de cette maîtrise en m'octroyant des bourses en 1991-92.

## AVANT-PROPOS

Une partie de ce travail a été présentée au 60<sup>e</sup> congrès  
de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (ACFAS),  
Montréal, 11 au 15 mai 1992.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
AVANT-PROPOS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
 CHAPITRE 1      INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	 1
 CHAPITRE 2      MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 5
2.1 Description de <i>Taxus canadensis</i> .....	6
2.2 Échantillonnage.....	8
2.3 Matériel général.....	8
2.4 Analyse de l'huile essentielle.....	8
2.4.1 Extractions par entraînement à la vapeur .....	8
2.4.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG).....	12
2.4.3 Analyse semi-quantitative (CG).....	14
2.4.4 Analyse par spectrométrie de masse (CG/SM) .....	15
2.5 Analyse des glycosides .....	15
2.5.1 Extraction et hydrolyse enzymatique.....	15
2.5.2 Analyse par CG et CG/SM.....	17
2.6 Analyse des taxanes.....	17
2.6.1 Préparation des extraits végétaux.....	17
2.6.2 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	18
2.6.3 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	19
2.6.3.1 Analyse qualitative.....	20
2.6.3.2 Analyse quantitative .....	21
2.7 Taxol .....	22
2.7.1 Purification du taxol .....	22
2.7.2 Isolation du taxol.....	24
2.7.3 Recristallisation du taxol .....	24
2.7.4 Analyses physico-chimiques confirmant l'identification .....	25
2.7.4.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	25

2.7.4.2 Autres analyses.....	25
2.7.5 Réactivité du taxol .....	26
CHAPITRE 3 ANALYSE DE L'HUILE ESSENTIELLE.....	28
3.1 Introduction.....	29
3.2 Résultats et discussion.....	33
3.2.1 Identification des constituants par CG et CG/SM .....	33
3.2.2 Influence de la période de cueillette .....	45
3.2.3 Influence du temps de distillation .....	47
3.2.4 Influence du solvant d'extraction.....	48
CHAPITRE 4 ANALYSE DES GLYCOSIDES .....	50
4.1 Introduction.....	51
4.2 Résultats et discussion .....	53
CHAPITRE 5 ANALYSE DES TAXANES.....	62
5.1 Introduction .....	63
5.2 Résultats et discussion .....	70
5.2.1 Préparation des extraits végétaux.....	70
5.2.2 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	70
5.2.3 Évaluation de la performance du système HPLC.....	73
5.2.4 Analyse qualitative par HPLC.....	74
5.2.5 Analyse quantitative par HPLC.....	74
5.2.6 Dosage du taxol .....	77
5.2.7 Isolation du taxol.....	81
5.2.8 Confirmations de l'identification du taxol.....	83
5.2.8.1 Point de fusion .....	83
5.2.8.2 Spectre infrarouge .....	84
5.2.8.3 Spectre u.v.-visible.....	84
5.2.8.4 RMN-H.....	84
5.2.9 Identification d'un taxane inconnu .....	91
5.2.10 Réactivité du taxol .....	92
CHAPITRE 6 CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE .....	99

## LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Photos de <i>Taxus canadensis</i> .....	7
Figure 2:	Localisation du site d'échantillonnage de <i>T. canadensis</i> .....	9
Figure 3:	Schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau .....	11
Figure 4:	Schéma de la procédure d'extraction des glycosides.....	16
Figure 5:	Schéma de la procédure de purification du taxol.....	23
Figure 6:	Schéma de la biosynthèse des terpènes .....	31
Figure 7:	Chromatogramme par CG de l'huile essentielle .....	34
Figure 8:	Structures de quelques constituants de l'huile essentielle.....	41
Figure 9:	Schéma de la formation d'oct-1-én-3-ol .....	42
Figure 10:	Structures de quelques aglycones .....	60
Figure 11:	Structures du squelette "taxane" .....	64
Figure 12:	Schéma de la biosynthèse des squelettes "taxane".....	65
Figure 13:	Structures de quelques taxanes .....	67
Figure 14:	Chromatogrammes par CCM .....	71
Figure 15:	Chromatogrammes par HPLC .....	75
Figure 16:	Courbe standard du taxol.....	76
Figure 17:	Courbe d'ajout standard du taxol.....	78
Figure 18:	Spectre infrarouge du taxol.....	85
Figure 19:	Spectre u.v.-visible du taxol.....	87
Figure 20:	Spectre RMN-H du taxol.....	88
Figure 21:	Structure proposée pour le taxane inconnu.....	92



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Conditions d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse.....	13
Tableau 2:	Composition qualitative de l'huile essentielle .....	35
Tableau 3:	Composition quantitative de l'huile essentielle.....	38
Tableau 4:	Constituants majeurs des huiles essentielles de quelques conifères .....	44
Tableau 5:	Pourcentages de rendement en huile essentielle.....	46
Tableau 6:	Identification des aglycones.....	54
Tableau 7:	Quantification des aglycones.....	57
Tableau 8:	Pourcentages de rendement en aglycones .....	61
Tableau 9:	Calcul du nombre de plateaux théoriques en HPLC.....	73
Tableau 10:	Contenu en taxol des extraits végétaux .....	79
Tableau 11:	Pourcentage de rendement en taxol.....	82
Tableau 12:	Analyse du spectre infrarouge du taxol .....	86
Tableau 13:	Analyse du spectre RMN-H du taxol et d'un taxane inconnu.....	89
Tableau 14:	Analyse du spectre RMN-H du 2',7-diacétyltaxol .....	93

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis le début des temps, l'être humain s'est servi des plantes pour soulager, et même guérir certains problèmes de santé. Dans nos sociétés occidentales actuelles, cette médecine par les plantes, dite traditionnelle, connaît un regain de popularité en s'alliant à une nouvelle conscience "écologique". L'Organisation mondiale de la santé estime que 80 % des cinq milliards d'habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles (Fleurentin et Pelt, 1990).

Cette médecine végétale repose sur deux approches: les plantes "douces" et les plantes "dures" (Fleurentin et Pelt, 1990). Les plantes douces qui sont dépourvues de toxicité et qui, prises sous forme d'extraits ou d'infusions, vont soulager certains maux grâce à l'ensemble de leurs composantes. Et les plantes dures qui contiennent un principe chimique actif que l'on peut isoler et, si possible, synthétiser. C'est le cas de toutes les plantes à alcaloïdes, généralement toxiques, comme par exemple, la pervenche de Madagascar (Fleurentin et Pelt, 1990) et les végétaux du genre *Taxus*.

Ces derniers, communément appelés "ifs", sont des arbres ou arbustes à croissance très lente et de grande longévité; ils peuvent vivre jusqu'à 1500 ans (Rossion, 1991). Ils sont reconnus depuis longtemps pour leur toxicité; en fait, seul l'arille rouge entourant la graine de l'if n'est pas toxique. Ils sont aussi reconnus pour le pouvoir curatif de leurs infusions, entre autres comme anticoagulant, cardiotonique etc...( Guénard *et al*, 1990)

Au début du siècle, la toxicité a été reliée à la présence, dans la plante, d'alcaloïdes que l'on a nommés "taxines". Plus récemment, dans les années 60, le gouvernement américain chargea le "National Cancer Institute" (NCI) de Bethesda de mettre sur pied un programme de recherche de nouveaux produits anticancérigènes tirés de substances naturelles (Borman,

1991). Parmi les nombreuses plantes étudiées il y avait l'if, et en 1971, Wani et son équipe du NCI ont isolé de l'écorce de *Taxus brevifolia* un alcaloïde diterpénique, le taxol, qui s'est avéré posséder des propriétés cytotoxiques bien spécifiques.

Ce produit très recherché est actuellement au stade II des essais cliniques aux États-Unis et des résultats intéressants ont été obtenus dans le traitement de certains types de cancer des ovaires et du sein (Borman, 1991). Malheureusement le taxol est présent en faible quantité dans l'écorce de *T. brevifolia* (0,01 % de rendement). Il s'avère donc de première importance d'explorer toutes les avenues possibles permettant de trouver des sources alternatives de taxol, soit par synthèse, héli-synthèse, culture de tissus, extraction des aiguilles au lieu des écorces etc..., tout cela de manière à augmenter la production de taxol tout en protégeant la survie du genre *Taxus*.

On comprend aisément que la découverte du taxol ait soulevé beaucoup d'intérêt et ce, pour toutes les espèces d'ifs sauf pour celle que l'on retrouve au Québec, *Taxus canadensis* Marsh. En 1954, Bourbeau de L'Université Laval en avait fait une étude exhaustive mais limitée aux moyens techniques du temps. Depuis cette date, aucune autre étude n'avait été faite mais tout récemment, en décembre 1990, Witherup et son équipe de chercheurs se sont intéressés au *T. canadensis*, poussant aux États-Unis, et ils y ont retrouvé une certaine quantité de taxol.

De par sa toxicité et son faible caractère aromatique, l'if est un conifère différent de ceux qu'il côtoie dans nos forêts québécoises, tels le sapin, l'épinette et le cèdre. Les produits volatils de ces autres conifères sont bien connus alors que ceux de l'if ne le sont pas. Nous

nous sommes donc intéressés à connaître la composition de l'huile essentielle de l'if canadien afin de la comparer à celles d'autres conifères mieux connus.

Dans le but général de mieux connaître les caractéristiques chimiques de *Taxus canadensis* de la région du Saguenay--Lac-St-Jean, les objectifs de ce travail consistaient à:

1. Extraire l'huile essentielle à deux périodes de l'année et l'analyser par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse pour en identifier les principaux constituants.
2. Extraire les glycosides, les hydrolyser et analyser les aglycones par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.
3. Extraire les taxanes contenus dans les aiguilles et les tiges d'ifs, identifier le taxol et le doser à trois périodes de l'année par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
4. Isoler le taxol présent dans les aiguilles d'ifs et confirmer sa structure par résonance magnétique nucléaire, infrarouge etc...

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Description de *Taxus canadensis*

Les végétaux du genre *Taxus* font partie de la famille des Taxacées, du groupe des Gymnospermes (conifères). On en retrouve huit espèces morphologiquement voisines dans la zone tempérée boréale (Marie-Victorin, 1964), telles que *Taxus baccata* en Europe et *Taxus brevifolia* sur la côte ouest américaine et canadienne.

Ici, au Québec, on retrouve *Taxus canadensis*, une espèce qui croît en bonne quantité dans les sous-bois humides parmi les cèdres et les épinettes (Bourbeau, 1954). C'est un arbuste couché, d'environ un mètre de hauteur, dont les branches ne sont pas fixées au tronc principal mais courent plutôt sur le sol avant de se redresser (figure 1A). Les plus grosses branches ont environ trois cm de diamètre et les feuilles en forme d'aiguilles, vertes sur les deux faces mais d'un vert plus foncé sur la face supérieure, ont de 10 à 20 mm de longueur par deux mm de largeur (figure 1B). L'identification est assurée par deux caractéristiques spécifiques au genre: les aiguilles sont mucronées, c'est-à-dire qu'elles possèdent une fine pointe à leurs bouts, et ces aiguilles sont fixées à la branche, non pas directement, mais par un court pétiole.

Cet arbuste se reproduit surtout végétativement en formant des racines le long de ses branches rampant sur le sol (Allison, 1991), mais il peut aussi se reproduire par dispersion de ses graines (Chamberlain, 1966). C'est une plante dioïque, c'est-à-dire que ses fleurs printanières peuvent être mâles ou femelles. Et au début d'août les fleurs femelles deviennent de beaux fruits rouges qui sont constitués, en fait, d'un ovule encapsulé dans une graine brunâtre et entouré d'un arille rouge plus ou moins développé (figure 1C) (Allison, 1991; Marie-Victorin, 1964).



Figure 1A. Arbustes *T. canadensis* (premier plan)



Figure 1B. Aiguilles et tiges de *T. canadensis*



Figure 1C. Fruit de *T. canadensis*



## 2.2 Échantillonnage

Les récoltes de *Taxus canadensis* ont été faites à Alma, dans un secteur en bordure du lac St-Jean, près de la rivière Grande-Décharge (figure 2). À cet endroit, les ifs poussent sur un sol sablonneux humide et côtoient les espèces arborescentes suivantes: le sapin baumier (*Abies balsamea*), l'épinette blanche (*Picea glauca*), l'épinette noire (*Picea mariana*), le cèdre (*Thuja occidentalis*), le bouleau (*Betula papyrifera*) et le tremble (*Populus tremuloides*).

Des branches d'ifs provenant de plusieurs arbres, répartis sur un territoire de un km<sup>2</sup>, ont été coupées et ramassées dans des sacs en jute et placées dans une chambre froide à -18° Celsius. Trois récoltes ont été faites à des périodes différentes, soit en automne (19 novembre 1990), au printemps (30 mai 1991), et en été (30 juillet 1991).

## 2.3 Matériel général

Tous les solvants utilisés dans cette étude étaient de qualité "chromatographie". Les standards de taxol et de céphalomannine ont été fournis gracieusement par l'Institut de cancer américain. Les produits radioactifs et deutérés ont été aimablement fournis par Mme Lolita Zamir, lors d'un stage à son laboratoire de l'Institut Armand-Frappier.

## 2.4 Analyse de l'huile essentielle

### 2.4.1 Extractions par entraînement à la vapeur

De manière à minimiser les pertes de produits volatils, le matériel végétal utilisé a été

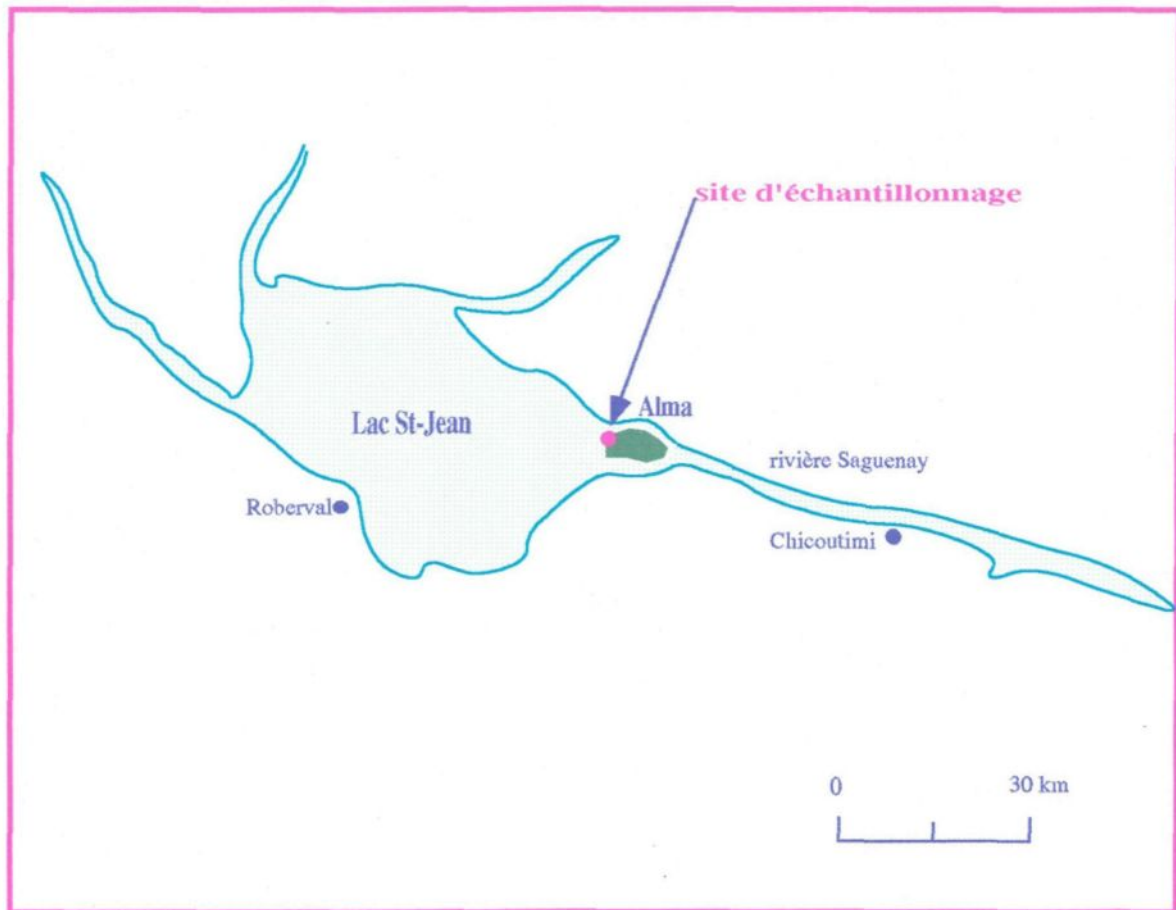


Figure 2 : Site d'échantillonnage de *T. canadensis*

congelé tout de suite après sa cueillette et utilisé dès sa décongélation. L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation avec le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau (figure 3).

Une quantité de 350 g de branches d'ifs (tiges minces et aiguilles) a été broyée au mélangeur avec de l'eau déminéralisée. Ce broyage avait pour fonction de briser les parois cellulaires des tissus végétaux contenant les huiles, afin de permettre à la vapeur d'eau de diffuser plus facilement et rapidement à travers le matériel végétal, de manière à augmenter la vitesse de distillation et le rendement en huile (Guenther, 1948).

Le mélange broyé a été placé dans un ballon central de cinq litres relié à un générateur de vapeur (ballon rempli d'eau que l'on chauffe au brûleur). Les composés volatils de l'if furent entraînés par la vapeur d'eau, condensés à l'aide de deux réfrigérants et récoltés dans un ballon de deux litres contenant 200 ml d'eau déminéralisée, 100 ml de pentane et 50 g de sel; ce dernier produit permettant d'augmenter la solubilité de l'huile dans le solvant organique.

Une hydrodistillation de 90 minutes a été faite sur les branches d'ifs récoltées en automne suivie d'une extraction de la phase aqueuse au pentane (3 x 50 ml). Les extraits de pentane ont été regroupés, séchés au sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrés et on y a ajouté cinq ml d'une solution standard (1,5256 g tétradécane dans 500 ml EtOH). Le volume total de la solution était de 200 ml.

Pour ce qui est de la récolte du printemps, la même quantité de matériel végétal (350 g) a subi une hydrodistillation de trois heures séparée en deux périodes de 90 minutes. Pour chaque période, la phase aqueuse restante après les extractions au pentane, a été extraite de la

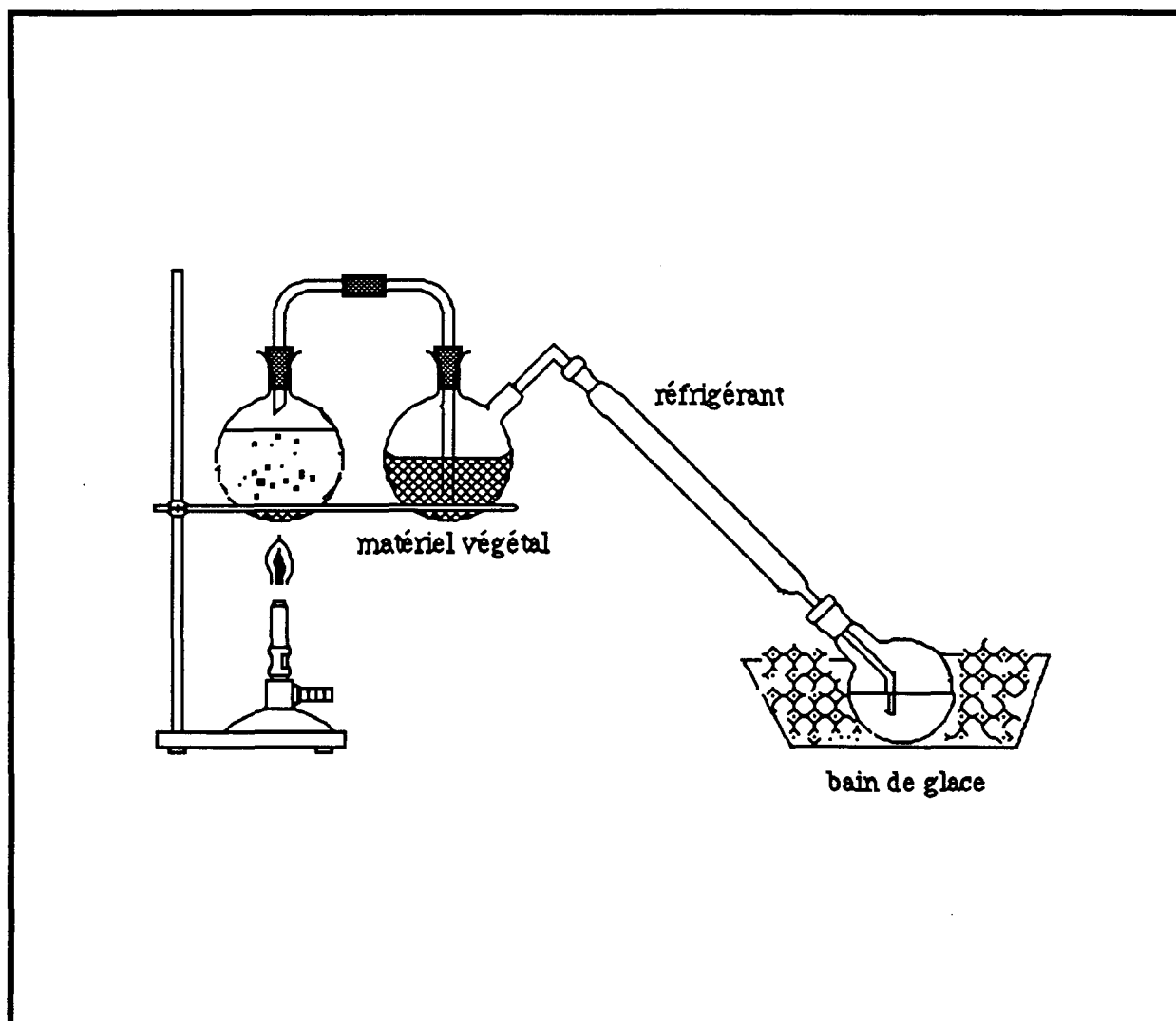


Figure 3. Schéma d'un entraînement à la vapeur d'eau

même manière mais à l'éther diéthylique cette fois. Ceci dans le but de vérifier si les composés solubles dans l'eau pouvaient être entraînés par un solvant plus polaire comme l'éther.

#### **2.4.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG)**

Les huiles essentielles étant des composés volatils, elles se prêtent bien à l'analyse par CG (Sandra et Bicchi, 1987). Tous les échantillons ont été analysés sur deux colonnes de polarité différente, ce qui a permis d'avoir une plus grande certitude dans l'identification des constituants.

Les conditions d'analyse sont décrites en détail au tableau 1. Les deux chromatographes Hewlett-Packard 5890 A fonctionnaient avec des détecteurs à ionisation de flamme. L'un équipé d'une colonne capillaire DB-5, de 30 mètres par 0,32 mm de diamètre avec une épaisseur de film de 0,25  $\mu\text{m}$ , et d'un injecteur avec diviseur. L'autre, équipé d'une colonne capillaire Supelcowax 10, de 30 mètres par 0,25 mm de diamètre avec une épaisseur de film de 0,25  $\mu\text{m}$ , et d'un injecteur de tête de colonne. L'enregistrement et l'intégration des chromatogrammes ont été faits avec un intégrateur électronique Hewlett-Packard 3390 A.

Les solutions d'huiles essentielles ont été évaporées jusqu'à cinq ml, sous vide et à température ambiante, avant d'être injectées sur les chromatographes et analysées en programmation de température. L'identification des pics fut d'abord faite par comparaison des temps de rétention des constituants de l'huile avec ceux de standards aux mêmes conditions d'analyse. Et ensuite, par comparaison des indices de Kovats calculés à l'aide

**TABLEAU 1.**  
**CONDITIONS D'ANALYSE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE**  
**CAPILLAIRE**

	<b><u>DB-5</u></b>	<b><u>SUPELCOWAX 10</u></b>
INJECTEUR	AVEC DIVISEUR	TÊTE DE COLONNE
T ° INJECTEUR	200 °C	
DÉTECTEUR	FID	FID
T ° DÉTECTEUR	250 °C	250 °C
GAZ PORTEUR	HÉLIUM	HÉLIUM
DÉBIT	1 ML/MIN.	1 ML/MIN.
T ° INITIALE	40 °C x 2 MIN.	40 °C x 2 MIN.
VITESSE	2 °C / MIN.	2 °C / MIN.
T ° FINALE	210 °C x 33 MIN.	210 °C x 33 MIN.
VOLUME D'INJECTION	1 µl	0,3 µl

d'hydrocarbures saturés, selon la formule suivante (Jennings et Shibamoto, 1980) :

$$I(a) = 100N + 100n \left( \frac{\log t_R(a) - \log t_R(N)}{\log t_R(N+n) - \log t_R(N)} \right)$$

où  $I(a)$ : Indice de Kovats d'une substance (a).

$N$  : Nombre d'atomes de carbone de l'hydrocarbure dont le  $t_R$  est inférieur à (a).

$n$  : Nombre d'atomes de carbone de différence entre les deux hydrocarbures.

$t_R(a)$ : Temps de rétention de la substance (a).

$t_R(N)$ : Temps de rétention de l'hydrocarbure inférieur au  $t_R$  de (a).

$t_R(N+n)$ : Temps de rétention de l'hydrocarbure supérieur au  $t_R$  de (a).

Les indices de Kovats, étant moins variables que les temps de rétention, ils ajoutent encore plus de précision à l'identification; en minimisant les variables affectant la rétention d'un composé, ils permettent de comparer et d'identifier plus facilement des produits qui n'ont pas été analysés dans les mêmes conditions (Shibamoto, 1987).

### 2.4.3 Analyse semi-quantitative (CG)

L'ajout d'un standard interne (tétradécane) à la solution analysée nous a permis de calculer le rendement en huile, par comparaison des pourcentages de surface obtenus, selon le nombre de carbones, entre le tétradécane et un produit connu A (Harris, 1982) :

$$1) X1 = \left( \frac{(\% \text{ produit A} / \# \text{ carbones}) \times (\text{qté tétradécane ajoutée})}{(\% \text{ tétradécane} / \# \text{ carbones})} \right)$$

$$2) X2 = \left( \frac{X1 \times (100\% - \% \text{ tétradécane})}{(\% \text{ produit A})} \right)$$

$$3) \% \text{ de rendement} = \left( \frac{X2}{\text{poids matériel végétal}} \right) \times 100$$

#### 2.4.4 Analyse par spectrométrie de masse (CG/SM)

La spectrométrie de masse permet de connaître la masse moléculaire d'un produit et son patron de fragmentation qui lui est caractéristique (Silverstein *et al*, 1981). Cette technique nous a donc permis de confirmer l'identification de produits par comparaison avec les spectres de masse retrouvés dans la littérature.

Les échantillons d'huile essentielle ont été analysés sur un spectromètre de masse VG12-250 à 70 eV, couplé à un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5790 A, équipé d'une colonne capillaire DB-5 et d'un injecteur de tête de colonne.

## 2.5 Analyse des glycosides

### 2.5.1 Extraction et hydrolyse enzymatique

La méthode mise au point par Mohammed Bouhajib fait le joint entre plusieurs articles dont celui de Svendsen et Merckx (1989). La figure 4 schématise la procédure employée.

À 500 g d'aiguilles d'ifs séchées et broyées en fine poudre, on a ajouté quatre litres d'un mélange méthanol: eau (70:30) et on a agité mécaniquement à 1000 tours / min pendant deux



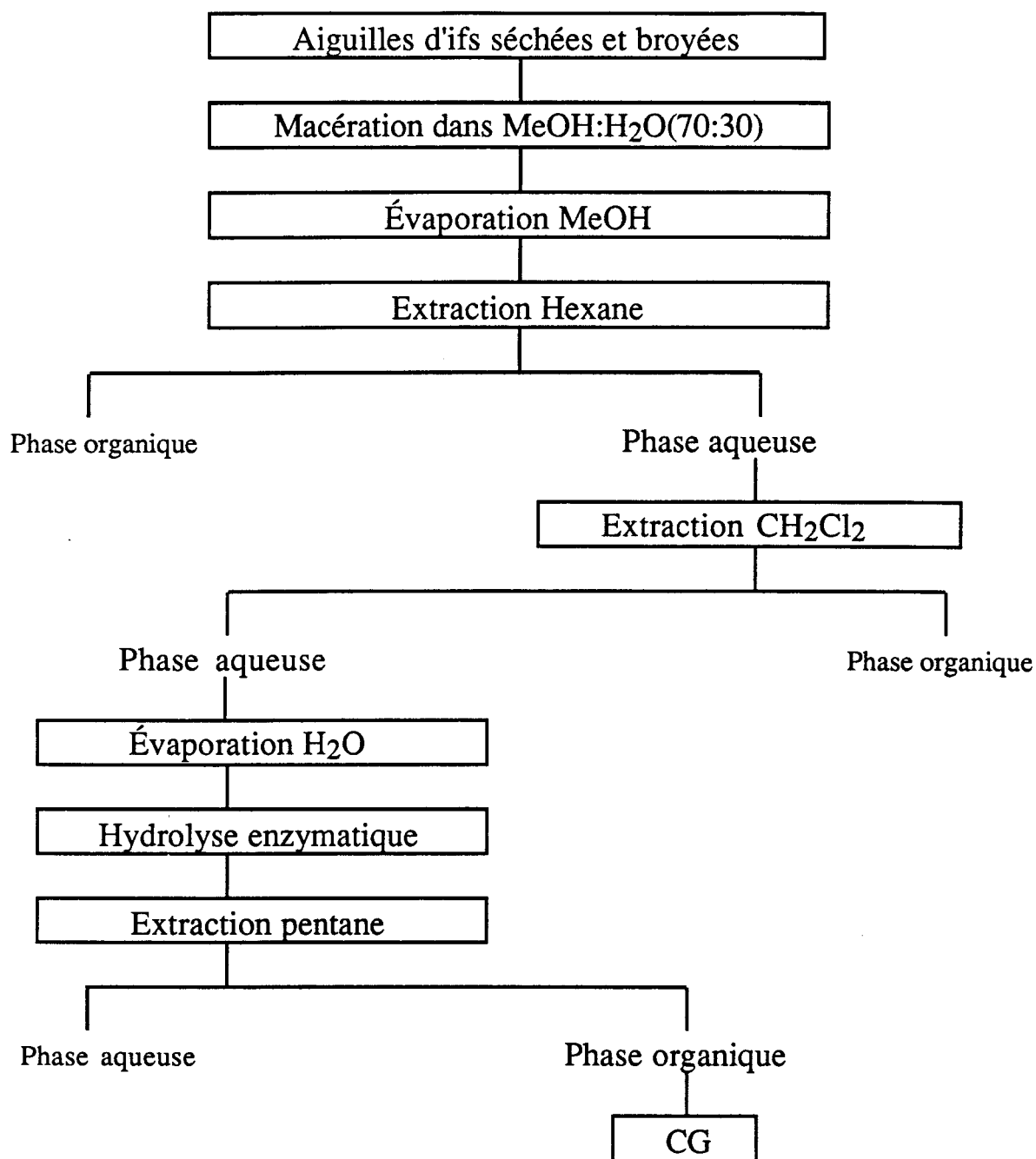


Figure 4. Schéma d'extraction des glycosides.

heures. Après filtration le méthanol fut évaporé sous vide à 40°C et une extraction de la phase aqueuse à l'hexane a été effectuée. Ensuite la phase aqueuse fut évaporée à sec sous vide et le résidu extrait au dichlorométhane. La phase organique a été analysée par chromatographie liquide (HPLC) pour vérifier la présence de taxanes alors que la phase aqueuse fut évaporée à sec.

Seulement 25 g de ce résidu a subi une hydrolyse enzymatique de la manière suivante: on place le résidu dans 500 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M, ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique glacial, solution à laquelle on ajoute, soit 100 mg de  $\beta$ -glucosidase ou 600 mg de cellulase selon le cas (les deux enzymes ont été employés). Le tout est agité dans une étuve à 37-40 °C pendant 24 heures.

### **2.5.2 Analyse par CG et CG/SM**

Par la suite une extraction au pentane a été effectuée et la phase organique séchée, filtrée et évaporée jusqu'à 10 ml a alors été analysée en chromatographie en phase gazeuse avec les mêmes conditions que celles employées pour les huiles essentielles (tableau 1). Une analyse en spectrométrie de masse a aussi été faite pour confirmer l'identification de certains pics.

## **2.6 Analyse des taxanes**

### **2.6.1 Préparation des extraits végétaux**

Pour l'analyse des taxanes les branches d'ifs ont été mises à sécher durant une à deux semaines, à la température de la pièce, après la décongélation. Par la suite les aiguilles ont été

séparées des tiges, et des extraits furent faits sur ces deux parties de l'arbre séparément, et ce pour chaque récolte. La méthode employée est basée sur plusieurs articles dont le plus important est celui de Witherup *et al*, 1990.

Le matériel végétal sec et broyé en fine poudre (200 g) a été mis à macérer dans deux litres de méthanol pendant 16 heures, avec agitation constante (agitateur rotatif à la vitesse de 100 tours/min). Par la suite la solution méthanolique fut filtrée et évaporée sous vide à 40°C et plusieurs extractions du résidu sec avec un mélange dichlométhane:eau (1:1) suivirent. La phase organique résultante a ensuite été séchée au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée à sec, sous vide à 40°C. Ce résidu fut alors dilué (20 mg/ml) et analysé par chromatographie liquide (HPLC), et par chromatographie sur couche mince (CCM).

### **2.6.2 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)**

Pour vérifier rapidement la présence de taxol dans l'extrait des aiguilles d'ifs de la récolte d'automne, des chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F254, phase normale, et aussi sur des plaques C18 phase inversée (Stasko et al, 1989). Les dimensions des plaques étaient de 5 cm par 10 cm et l'épaisseur de l'adsorbant de 0,25 mm.

En phase normale, le solvant favorisant une migration et une séparation optimales fut un mélange dichlorométhane:eau (95:5) (Vidensek *et al*, 1990), et en phase inversée un mélange méthanol:eau (70:30). Cinq microlitres d'extrait, à une concentration de 20 mg/ml dans le méthanol, ont été déposés sur les plaques et la migration a été comparée, sous lumière ultraviolette, avec des solutions de taxol et de céphalomannine standards (25 mg/ml). La

migration du taxol a été calculée de la manière suivante:

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le taxol (centre de la tache)}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

### **2.6.3 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Cette chromatographie (Yost *et al*, 1980) fait intervenir deux variables dans la séparation d'un mélange, soit la phase stationnaire c'est-à-dire la colonne, et la phase mobile c'est-à-dire le ou les solvants. Les interactions entre notre mélange, les particules de la colonne et les solvants employés vont permettre une séparation qui pourra être optimisée en faisant varier surtout la composition de notre phase mobile. Cette dernière est poussée avec pression (pompe) sur la colonne, entraînant le mélange à séparer, et c'est cette pression qui permet de faire passer le solvant à travers de très petites particules à une vitesse raisonnable, ce qui permet d'obtenir une haute résolution.

Tous les solvants utilisés en HPLC et tous les échantillons injectés furent dégazés et filtrés préalablement sur des filtres de nylon de 0,45 µm.

Les analyses en HPLC furent effectuées à l'aide d'un appareillage constitué d'une pompe LKB 2150, d'un détecteur u.v. LKB (2238 Uvicord S II) à une longueur d'onde de 226 nm (maximum d'absorbance du taxol 228 nm), d'une valve d'injection Rheodyne avec boucle d'injection de 5µl, et d'un enregistreur-intégrateur Hewlett-Packard 3390 A. Le système analytique était constitué d'une pré-colonne C<sub>18</sub> et d'une colonne C<sub>18</sub> (Supelco) phase inversée de 150 mm par 4,6 mm avec des particules de grosseur 5 µm. Pour vérifier le bon état de la colonne, permettant une séparation optimale, son nombre de plateaux théoriques

(N) a été calculé en injectant 20 µl d'un mélange test (acétophénone, benzène, toluène) et en éluant avec un mélange MeOH:H<sub>2</sub>O (65:35) à 1 ml/min:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{où } t_R = \text{temps de rétention du produit}$$

$$W_{1/2} = \text{largeur du pic à mi-hauteur ou}$$

$$= 0,939 \times \frac{\text{surface}}{\text{hauteur}} \times \text{vit. papier}$$

Après essai de plusieurs systèmes de solvants, la séparation des constituants des extraits végétaux fut faite, de manière optimale, en utilisant un mélange ternaire de solvants, en mode isocratique, soit méthanol:eau:acétonitrile (20:40:40) à un débit de 1ml/min. Le méthanol a été ajouté pour minimiser les problèmes de "back pressure" (Witherup *et al*, 1990). Après chaque injection le système analytique était rincé 30 minutes avec un mélange méthanol:eau:acétonitrile (20:20:60) pour s'assurer de déloger les produits qui auraient pu demeurer sur la colonne ou la pré-colonne. Une ligne de base exempte de pics était la condition préalable à toute injection.

#### 2.6.3.1 Analyse qualitative

L'identification des produits sur les chromatogrammes a été faite par comparaison des temps de rétention avec ceux des standards de taxol et de céphalomannine. De plus une certaine quantité de taxol pur a été ajoutée à l'extrait végétal pour s'assurer que le pic correspondant au taxol augmenterait de surface. Cette méthode appelée "spiking" n'est pas fiable à 100 %, parce qu'il peut arriver que deux produits éluent en même temps, mais elle donne quand même une bonne certitude dans l'identification (Yost *et al*, 1980).

### 2.6.3.2 Analyse quantitative

En analyse quantitative, il est important de s'assurer de la reproductibilité des résultats (unités de surface des pics), chaque injection a donc été répétée une deuxième fois, et si nécessaire une troisième. La précision du volume injectée a été contrôlée par la boucle d'injection de 5  $\mu$ l, avec un faible pourcentage d'erreur de 1 % (Skoog, 1985).

Il est aussi important de déterminer si la réponse du produit à quantifier est bien linéaire dans l'intervalle de concentrations qui nous intéresse (Yost *et al*, 1980; Witherup *et al*, 1990). Pour ce faire, une courbe de calibration a été réalisée avec des standards de taxol à six concentrations différentes: 0,003; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 et 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l de méthanol. Un graphique de la surface des pics en fonction de la concentration fut ensuite tracé.

De plus pour vérifier l'influence de la matrice sur le signal du taxol au détecteur (Harris, 1982; Witherup *et al*, 1990), nous avons aussi appliqué la méthode d'ajout standard qui consiste à incorporer, à une concentration fixe d'extrait végétal, des quantités variables de taxol standard et de noter l'augmentation du signal. Quatre échantillons d'extrait végétal de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l contenant des concentrations de taxol de 0; 0,025; 0,05 et 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l ont été injectés et une courbe de la surface des pics en fonction de la concentration a été tracée.

Après avoir constaté que la linéarité était bien respectée et que la matrice n'interférait pas, les calculs de la quantité de taxol présente dans les extraits (CTe) ont été faits en comparant sa surface (STe) avec celle du taxol standard (ST) de concentration connue (CT):

$$CTe = \left( \frac{STe}{ST} \right) \times CT$$

## 2.7 Taxol

### 2.7.1 Purification du taxol

Un schéma de purification basé sur les travaux de chercheurs américains (Witherup *et al*, 1990) est présenté à la figure 5. Des aiguilles d'ifs (récolte de novembre) séchées et broyées (400g) furent mises à macérer dans 4 litres de méthanol durant 16 heures avec agitation continue (voir partie 2.6.1). Par la suite une extraction du résidu sec avec un mélange hexane:eau (1:1) a été faite dans le but d'éliminer le plus possible les lipides et autres produits non polaires indésirables. La phase organique a été analysée sur HPLC pour vérifier l'absence de taxanes alors que la phase aqueuse a été extraite au dichlorométhane. Après évaporation de ce dernier, le résidu sec fut solubilisé dans 500 ml d'acétate d'éthyle et mélangé avec 300g de célite 503. L'évaporation sous vide de l'acétate d'éthyle (avec ajout de 3 x 100 ml d'hexane) a permis d'obtenir une poudre se déposant facilement sur une colonne de 45 cm par 4 cm, contenant 3 cm de célite fraîche où une filtration fut effectuée avec quatre solvants de polarité croissante (un litre chacun).

Après évaporation du solvant, chaque fraction fut analysée sur HPLC pour connaître celle contenant le taxol. La fraction éluée avec le dichlorométhane a été évaporée, mélangée à 30 g de célite et déposée sur une colonne de 45 cm par 4 cm contenant 15 cm de gel de silice 60 (230-400 mesh). En général, ce système de "flash chromatography" (Still *et al*, 1978), sous pression, permet de purifier rapidement et avec une bonne résolution de nombreux

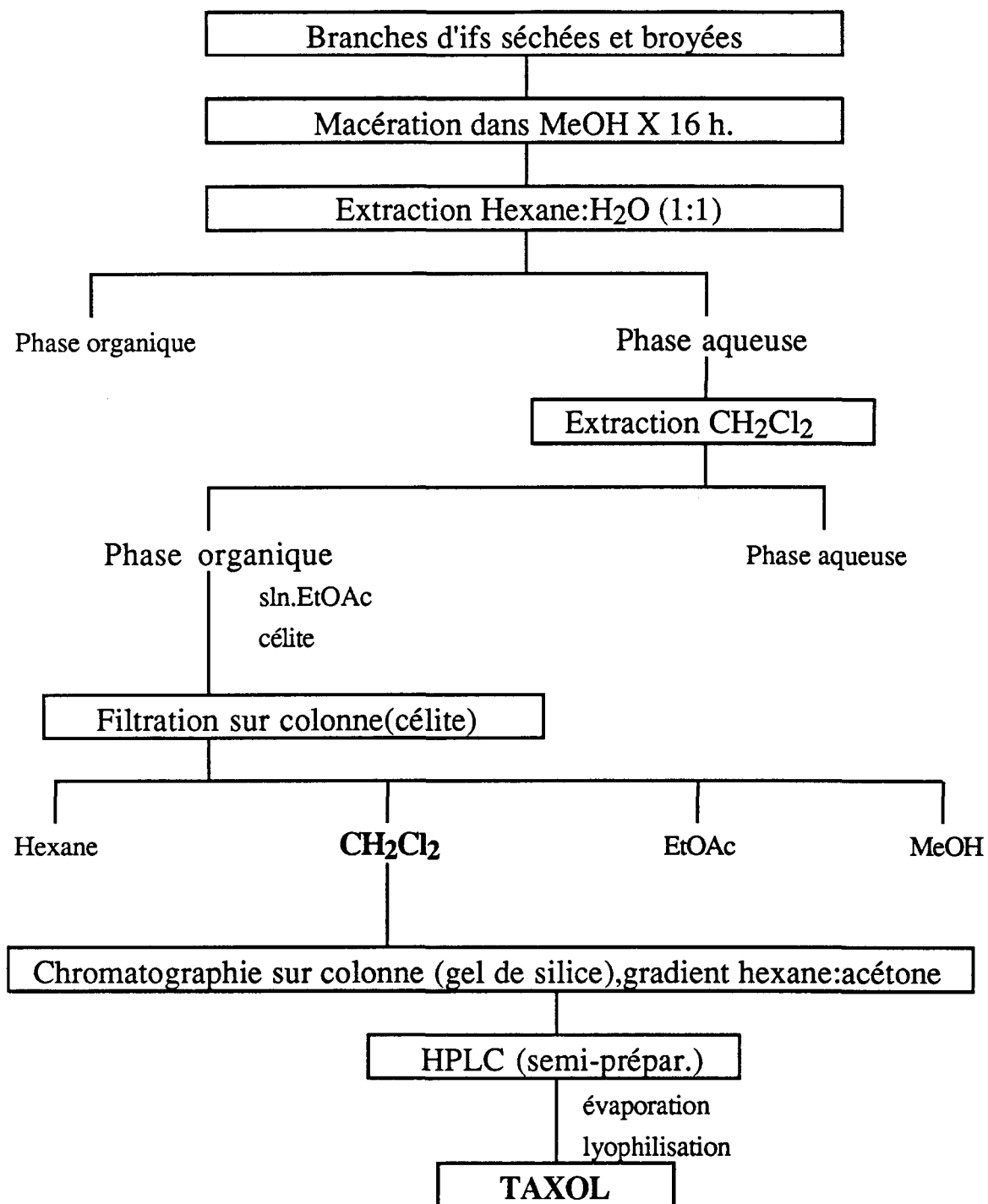


Figure 5. Schéma de purification et d'isolation du taxol.



produits organiques. L'élution fut faite en utilisant un mélange hexane:acétone avec un gradient d'élution de 5 % jusqu'à 55 % d'acétone. Sept fractions, ayant un volume de 150 à 200 ml chacune, ont été récoltées et analysées sur HPLC analytique.

### 2.7.2 Isolation du taxol

La fraction enrichie en taxol a été évaporée et pesée. Après solubilisation dans deux ml d'acétone, l'extrait fut injecté en HPLC semi-préparatif: le même appareillage fut utilisé, mais cette fois avec une colonne semi-préparative C<sub>18</sub> de 250 mm par 10 mm, avec des particules de 5 µm. Le nombre de plateaux théoriques de cette colonne a aussi été vérifié (section 2.6.3).

Vingt injections d'environ 20 mg chacune (100 µl par injection) ont été nécessaires pour récupérer le taxol présent dans la fraction enrichie, et ce, en utilisant le même système de solvant qu'en analytique mais à un débit de 3 ml/min. Après regroupement des fractions récoltées, correspondant au pic du taxol, et après évaporation des solvants organiques, la solution aqueuse a été congelée 24 heures à -22 °C pour finalement être lyophilisée avec un appareil Labconco sous un vide de 10 à 100 µm Hg pendant 48 heures.

### 2.7.3 Recristallisation du taxol

Pour éliminer les impuretés contenues dans le solide obtenu, nous avons procédé à une recristallisation du taxol (Pasto et Johnson, 1979; Mayo *et al*, 1991), en employant un mélange de solvants méthanol:eau (50:50). Le taxol, solubilisé à chaud dans ce mélange, s'est recristallisé doucement à la température de la pièce avant d'être placé dans un bain de

glace. La solution a ensuite été centrifugée 30 minutes, pour faciliter la récupération des cristaux qui ont été séchés au dessiccateur.

#### **2.7.4 Analyses physico-chimiques confirmant l'identification**

##### **2.7.4.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Plusieurs analyses ont permis de confirmer l'identification du taxol isolé, dont la plus importante est la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Cette technique (Silverstein *et al*, 1981) permet d'élucider la structure moléculaire d'un produit en mesurant l'absorption d'une radiation électromagnétique de fréquence radio soit par les noyaux hydrogène ou carbone-13. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à un produit de référence et ils nous indiquent la quantité d'atomes d'hydrogène ou de carbone-13 présents, ainsi que leur environnement moléculaire.

Des analyses de RMN du proton (RMN-H) ont été effectuées à l'université McGill sur un appareil Varian XL-300 à 300 MHz. Le taxol était en solution dans le chloroforme deutéré et ses déplacements chimiques ont été confrontés à ceux de la littérature pour s'assurer de notre identification.

##### **2.7.4.2 Autres analyses**

Un spectre infrarouge du taxol (Silverstein *et al*, 1981) a été pris de 600 à 4000 nm, sous la forme d'une pastille de KBr, en utilisant un appareil FTIR (infrarouge à "transformer

de Fourier") de Midac, couplé à un micro-ordinateur.

Un spectre ultraviolet du taxol, en solution dans le méthanol, a été enregistré de 200 à 500 nm avec un spectrophotomètre u.v.-visible Spectronic 2000 de Bausch and Lomb. Et finalement le point de fusion du taxol fut mesuré avec un appareil Mettler FP61.

Toutes les données obtenues ont naturellement été comparées avec celles retrouvées dans la littérature.

### **2.7.5 Réactivité du taxol**

Dans le but éventuel de faire une étude des mécanismes de biosynthèse du taxol, des essais sur la réactivité de cette molécule ont été faits.

La réaction d'acétylation du taxol a été faite avec de l'anhydride acétique radioactif ([ 1-<sup>14</sup>C]-anhydride acétique, 500  $\mu$ Ci ) de la manière suivante: un mg de taxol est solubilisé dans 30  $\mu$ l de pyridine, on ajoute à cette solution un  $\mu$ l d'anhydride acétique radioactif ( au moins 1 000 000 comptes mesurés avec un compteur à scintillations) et on laisse reposer à la température de la pièce pendant 16 heures. Pour être sûr que tous les sites possibles de la molécule soient acétylés, on ajoute, après 16 heures, un excès d'anhydride acétique deutéré (D6) à 98 %, soit 30  $\mu$ l, et on laisse réagir 24 heures ou plus. Par la suite, on évapore la pyridine sous un jet d'azote et on solubilise le taxol acétylé et deutéré dans 4 ml de méthanol.

D'après le nombre de comptes on a calculé la quantité nécessaire pour qu'il y ait détection et on a injecté 10  $\mu$ l de cette solution en chromatographie liquide (HPLC) sur un

appareil Perkin-Elmer, Binary LC Pump 250, équipé de deux colonnes C<sub>18</sub> de 250 mm par 4,6 mm avec des particules de grosseur 10 µm. Cet appareil était couplé à deux types de détecteurs, soit un détecteur u.v. Photodiode Array 990 de Waters et un détecteur à radioactivité LB 505 de Berthold.

Des analyses en résonance magnétique nucléaire du proton ont par la suite été faites pour élucider la structure du [ 1-<sup>14</sup>C ]-taxol acétylé et deutéré.

## **CHAPITRE 3**

### **ANALYSE DE L'HUILE ESSENTIELLE**

### 3.1 Introduction

Les substances aromatiques sont des composés organiques volatils qui sont perçus, en général agréablement, par les récepteurs olfactifs de notre muqueuse nasale. Ces substances sont utilisées dans les domaines de la parfumerie et de l'alimentation. En fait si l'on veut faire preuve de précision, on doit spécifier qu'un arôme est souvent le résultat d'une interaction entre nos récepteurs olfactifs, en grande partie, et nos récepteurs gustatifs, en moindre partie; le terme anglais "flavor" englobe cette interaction.

Les huiles essentielles font partie du monde des substances aromatiques, ce sont les produits volatils extraits des plantes par distillation à la vapeur d'eau. Parfois ces produits odorants peuvent être extraits en utilisant d'autres procédés techniques comme l'extraction par solvant organique, le pressage, l'enfleurage etc... L'état de nos connaissances actuelles permet de classer les constituants des huiles essentielles en quatre groupes (Guenther, 1948):

- 1) les terpènes
- 2) les hydrocarbures linéaires
- 3) les dérivés du benzène
- 4) les divers composés contenant du soufre ou de l'azote (plus rares)

Les terpènes sont, sans contredit, les produits les plus caractéristiques des huiles essentielles, ils sont constitués de plusieurs molécules d'isoprène ( $C_5H_8$ ) jointes principalement tête à queue et ayant subi le plus souvent des réactions de réarrangement. Les plus connus de ces produits sont les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ), mais on retrouve aussi dans les huiles des sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ) et des diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ). La figure 6 représente la

voie de formation biosynthétique des terpènes à partir de l'acide mévalonique (Torssell, 1983; Guignard *et al*, 1985).

Le second groupe de produits retrouvés dans les huiles essentielles est constitué des hydrocarbures linéaires et leurs dérivés oxygénés tels les alcools, aldéhydes, cétones, éthers, esters, dont le nombre d'atomes de carbone varie jusqu'à 35. La biosynthèse de ces hydrocarbures semble reliée à celle des acides gras (Guenther, 1948).

Le troisième groupe de produits volatils comprend les dérivés du benzène ou plus exactement du n-propyl benzène, produits largement utilisés en parfumerie comme la coumarine et la vanilline.

Chaque plante possède son huile essentielle qui lui est bien spécifique et cette huile pourra varier, en quantité et en composition, selon les diverses parties de la plante, l'âge de la plante, son habitat, le climat etc...(Guenther, 1948). Quant aux fonctions des huiles essentielles, elles sont multiples. À l'intérieur de la plante, l'huile semble jouer un rôle au niveau du métabolisme, alors que dans leur environnement, les fonctions des huiles varient selon chaque type de plante: ce peut parfois être un rôle attracteur et d'autres fois défensif, certaines huiles ont même démontré une activité bactériostatique ou fongicide (Pénoël *et al*, 1990).

La chromatographie en phase gazeuse capillaire est la technique idéale pour l'analyse des huiles essentielles (Tabacchi et Garnero, 1987). Son utilisation, à partir des années 60, a permis de séparer des mélanges d'huile de plus en plus complexes, et lorsque couplée à un spectromètre de masse, elle a permis l'identification de nombreux produits de ces mélanges.

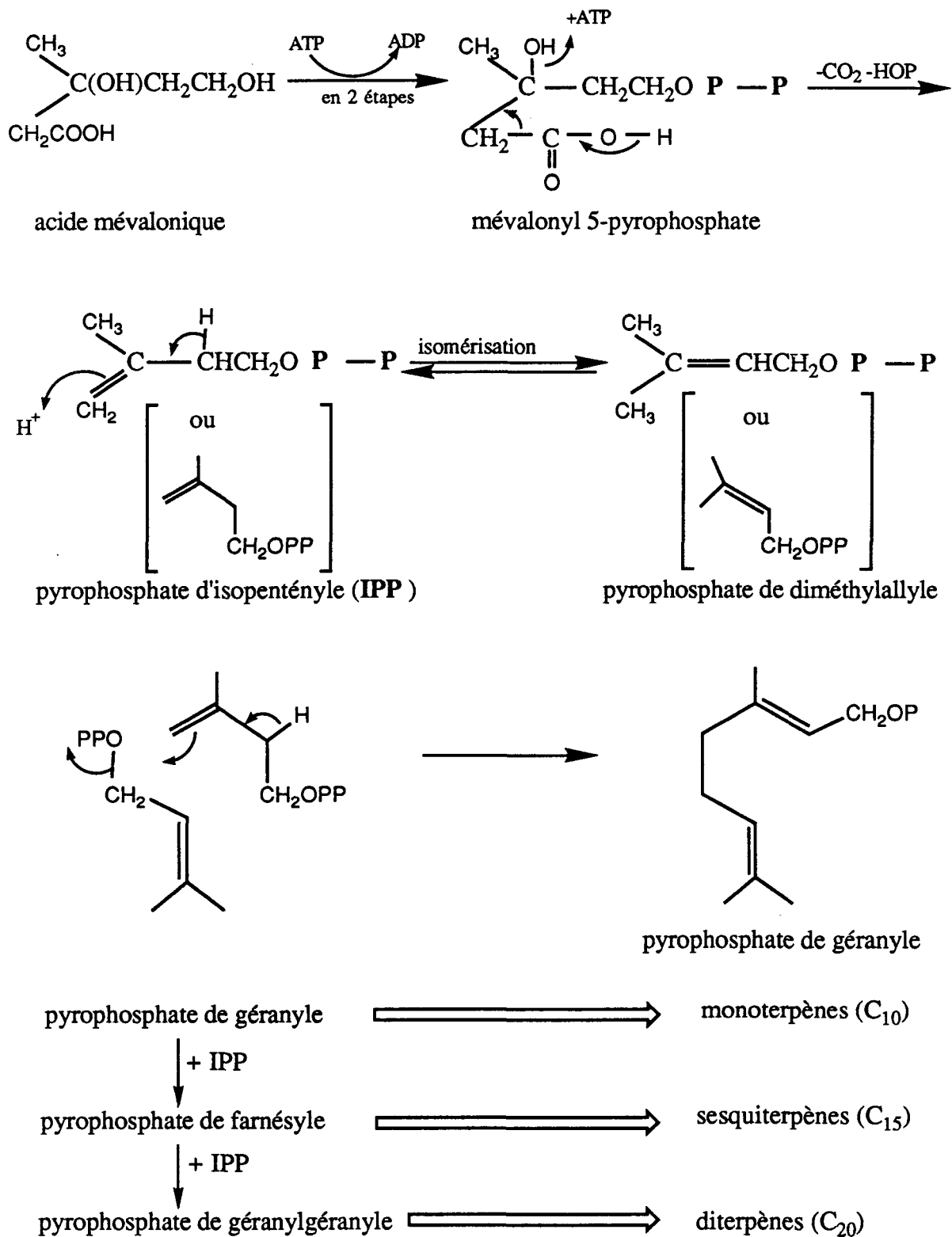


Figure 6. Schéma de la biosynthèse des terpènes



Naturellement, le traitement de la matière végétale avant l'analyse chromatographique demeure de toute première importance pour garantir un résultat analytique le plus fidèle possible à ce qui existe vraiment dans la plante.

La distillation à la vapeur d'eau (hydrodistillation) demeure une méthode d'extraction des huiles essentielles largement répandue au laboratoire et en industrie. Cependant, lors de l'analyse des résultats, il faut être conscient des lacunes potentielles de cette méthode. Selon la localisation, dans la plante, des structures spécialisées contenant l'huile essentielle, il peut s'avérer difficile d'extraire toute l'huile. Plusieurs chercheurs ont démontré qu'il est pratiquement impossible de recouvrer la totalité de l'huile par distillation et que souvent les constituants de l'huile essentielle demeurent associés aux acides gras de la plante, ce qui nuit à leur volatilisation (Koedam, 1987). Quant aux produits oxygénés, plus solubles dans l'eau, ils sont entraînés plus facilement donc distillés en plus grande quantité que les hydrocarbures non oxygénés qui demeurent liés aux tissus végétaux plus fortement et plus longtemps (Koedam, 1987).

De plus, dans un milieu aqueux, la matériel végétal atteint un pH de 4 à 7 ce qui, combiné à une température s'approchant de 100°C, ouvre la porte à plusieurs réactions de réarrangement en cours de distillation. Le monoterpène sabinène est un de ces produits instables qui se transforme facilement en plusieurs autres (Koedam, 1987). Tous les facteurs influant sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle doivent donc être pris en considération lors d'une analyse sérieuse.

Les huiles essentielles des conifères ont été étudiées par plusieurs chercheurs dont Von Rudloff, qui s'est intéressé, entre autres, au sapin baumier (1974) et aux épinettes noire et

blanche (1967), espèces abondantes de nos forêts canadiennes. Par contre, à ma connaissance, aucune étude n'a été faite sur l'huile essentielle de *Taxus canadensis*. Cet arbuste n'est pas très aromatique lorsqu'on circule à proximité mais par contre, si l'on frotte ses aiguilles, il s'en dégage une odeur particulière agréable. Il s'avère intéressant de connaître le profil particulier de l'huile essentielle de *T. canadensis* pour pouvoir comparer avec d'autres conifères et si possible faire un lien avec les autres produits naturels de cet arbuste.

## 3.2 Résultats et discussion

### 3.2.1 Identification des constituants de l'huile par CG et CG/SM

La composition de l'huile essentielle de *T. canadensis* a été évaluée à deux périodes de l'année. Premièrement, en automne où un entraînement à la vapeur d'eau de 90 minutes a été effectué sur l'échantillon A-1. Deuxièmement, au printemps où un entraînement à la vapeur de trois heures a été effectué, mais fractionné en deux périodes de 90 minutes, soit les échantillons P-1 et P-2. Les phases aqueuses restantes, après les extractions au pentane de P-1 et P-2, ont à leur tour été extraites avec un solvant plus polaire, l'éther, pour donner les échantillons P-3 et P-4. Ces cinq échantillons ont été analysés en chromatographie gazeuse sur deux colonnes de polarité différente, et aussi en spectrométrie de masse pour confirmer les identifications.

La figure 7 montre un chromatogramme typique de l'huile essentielle de *T. canadensis* sur la colonne non polaire DB-5. Dans le tableau 2, on retrouve tous les constituants, de plus de 0,2%, contenus dans l'un ou l'autre des cinq échantillons avec leur identification, si

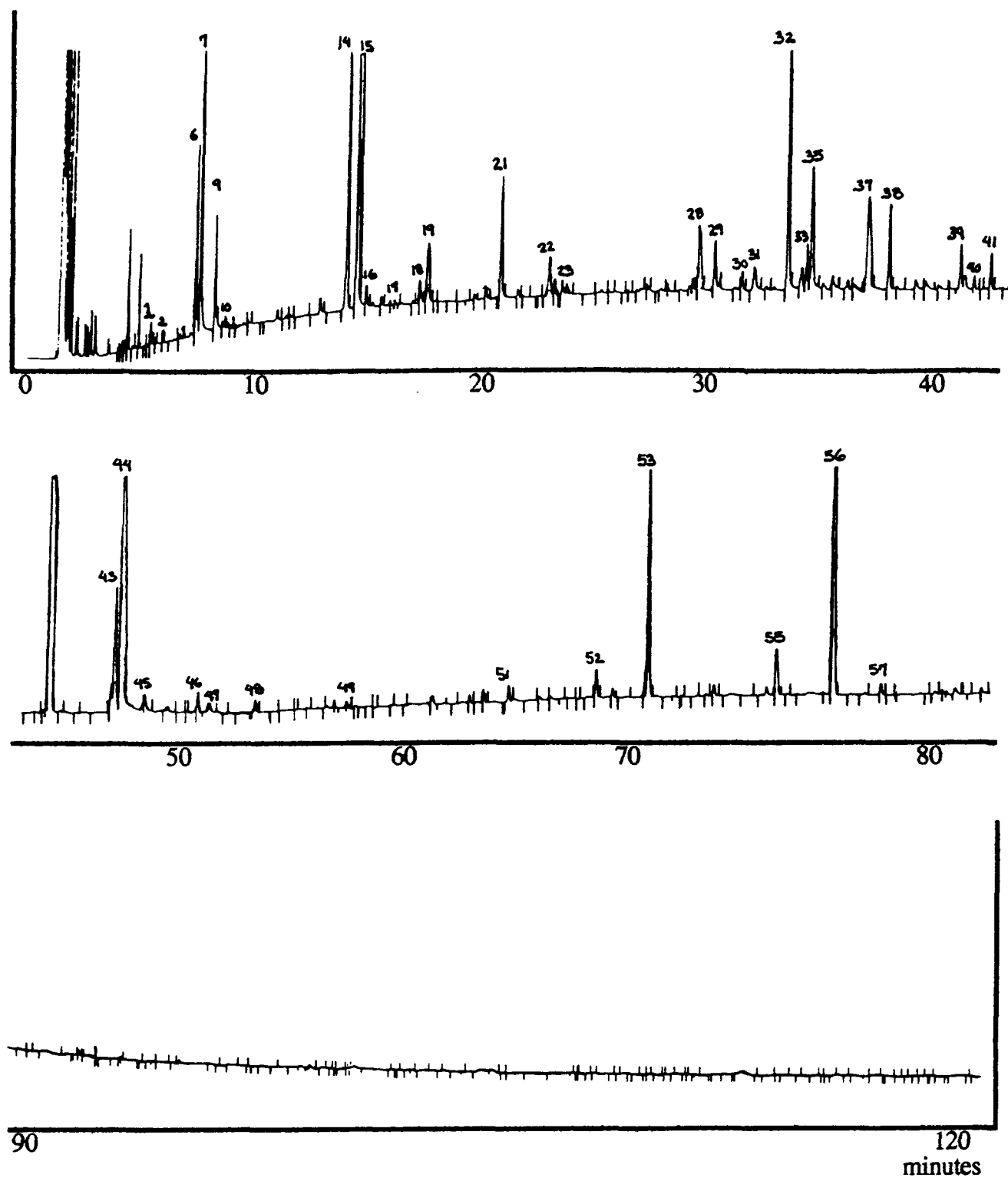


Figure 7. Chromatogramme type de l'huile essentielle (colonne DB-5)

Tableau 2. Composition qualitative de l'huile essentielle

#	Identification	CG			CG / SM					
		TR DB-5	I K DB-5	I K Sup.	M+	1°	2°	3°	4°	5°
1	oct-1-ène	5,41	795	-	110	41	44	56	43	57
2	hexanal	5,46	797	1086	112	41	69	55	42	83
3	non identifié	6,03	816	-	128	43	41	42	57	85
4	non identifié	6,71	837	-	-	43	41	42	57	56
5	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	7,18	849	-	100	41	55	83	69	42
6	trans-hex-2-én-1-al	7,43	856	1215	98	42	55	42	69	83
7	cis-hex-3-én-1-ol	7,64	861	1379	100	41	67	55	82	42
8	non identifié	8,15	873	1139	-	57	91	41	106	67
9	hexan-1-ol	8,30	877	1354	102	56	43	42	55	41
10	non identifié	8,69	886	-	-	57	43	56	71	85
11	non identifié	9,02	893	-	-	43	41	42	71	57
12	non identifié	9,24	897	-	-	91	106	105	77	65
13	non identifié	9,63	905	-	-	43	41	42	57	55
14	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	14,05	976	1485	126	57	70	41	55	69
15	oct-1-én-3-ol	14,54	983	1452	128	57	43	41	72	55
16	octan-3-one	14,92	988	1256	128	57	43	72	71	99
17	décane	15,89	1000	1000	-	57	44	42	71	85
18	p-cymène	17,06	1023	1263	134	43	41	57	119	55
19	limonène	17,42	1029	1198	136	68	43	41	67	57
20	1,8-cinéole	17,98	1038	1207	154	43	41	71	81	55
21	octan-1-ol	20,78	1084	1554	130	56	41	55	42	70
22	α-thujone	22,82	1113	1435	152	81	41	110	68	69
23	alcool phényléthylique	23,34	1121	1896	122	91	92	122	65	51
24	non identifié	25,22	1144	-	-	41	69	55	42	70
25	non identifié	26,13	1155	-	-	41	69	55	42	80
26	non identifié	27,60	1172	-	-	43	41	56	44	57
27	salicylate de méthyle	27,98	1177	1785	152	120	92	43	152	44
28	myrténol	29,36	1192	1774	152	79	91	41	108	43
29	p-menth-2-én-7-ol	30,06	1199	1766	154	41	93	67	43	81

Tableau 2 (suite). Composition qualitative de l'huile essentielle

#	Identification	CG			CG/ SM					
		TR DB-5	IK DB-5	IK Sup	M+	1°	2°	3°	4°	5°
30	non identifié	31,26	1219	-	-	41	43	93	57	55
31	non identifié	31,78	1228	-	-	43	41	57	93	79
32	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	33,19	1251	1906	152	43	93	41	79	91
33	géraniol	33,79	1261	1840	154	41	69	43	57	93
34	non identifié	34,00	1264	1798	-	41	55	43	67	68
35	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	34,21	1267	1850	-	79	41	67	55	68
36	non identifié	35,12	1281	-	154	43	41	55	56	69
37	p-menth-1,8-diène-7-ol	36,58	1303	1985	152	79	68	41	67	93
38	2-OH-5-CH <sub>3</sub> acétophénone	37,54	1316	2185	150	150	135	77	107	43
39	eugénol	40,59	1358	2159	164	164	43	57	55	77
40	non identifié	40,99	1363	-	-	43	57	41	85	71
41	3-méthyltridécano	41,90	1375	-	198	57	43	41	71	56
42	non identifié	46,53	1446	-	-	107	43	57	91	77
43	non identifié	46,71	1449	2032	-	79	41	67	55	93
44	non identifié	46,96	1453	2094	-	79	41	67	91	55
45	3,5-diméthoxyphénol	47,97	1470	2858	154	154	125	69	94	111
46	pentadécane	50,29	1508	1500	212	57	43	41	71	85
47	4-CH <sub>3</sub> -2,6-di-tert-butylphénol	50,82	1517	1902	220	205	57	220	41	145
48	occidentol	52,84	1548	2086	220	131	119	59	105	159
49	non identifié	56,06	1595	-	-	71	43	44	41	55
50	γ-eudesmol	57,76	1626	2148	222	43	55	161	189	59
51	5-méthylundéc-1-ène	63,84	1736	-	168	56	43	57	55	41
52	octadécane	67,63	1799	1800	254	57	43	71	41	85
53	6,10,14-triCH <sub>3</sub> pentadécane-2-one	69,90	1846	2632	268	43	58	71	41	59
54	2,6-diméthylheptadécane	71,61	1880	-	268	43	57	71	44	85
55	non identifié	75,62	1958	-	-	149	41	57	150	56
56	non identifié	77,97	2002	-	-	43	55	41	81	67
57	non identifié	80,08	2049	-	-	44	43	69	41	159

trouvée, et les cinq principaux fragments des spectres de masse, énumérés par ordre décroissant de leur intensité relative. Quand la concordance du produit a pu être établie sur les deux colonnes, l'indice de Kovats sur la colonne polaire Supelcowax a aussi été noté. Sur une soixantaine de constituants, 31 produits incluant les produits majeurs ont pu être identifiés avec certitude, lorsque le temps de rétention (T.R.), l'indice de Kovats (I.K.) et le spectre de masse concordaient avec les données de la littérature (Adams, 1989; Jennings et Shibamoto, 1980).

Le tableau 3 compare les pourcentages de surface respectifs de tous les constituants de l'huile, dans les cinq échantillons analysés. La majorité des produits non identifiés ont un pourcentage de surface inférieur à 1% sauf pour les pics # 8, 14, 25, 32, 35, 44, 56 et 57 présents en quantité plus importante, avec des pourcentages de surface allant jusqu'à 8%. Le pic # 44, présent dans quatre échantillons sur cinq, semble être un sesquiterpène d'après le spectre de masse, mais l'identification n'a pu être établie avec certitude. Il en est de même pour le pic # 32, présent dans tous les échantillons jusqu'à 5%, et pour lequel les fragments du spectre de masse suggèrent un monoterpène oxygéné ayant perdu une molécule d'eau. D'après la différence entre les indices de Kovats sur DB-5 et Supelcowax, le pic # 14 serait vraisemblablement un alcool aliphatique insaturé.

La plupart des produits identifiés sont des hydrocarbures et leurs dérivés, alcools, cétones et aldéhydes dont les plus importants (en quantité) contiennent de six à huit atomes de carbone. L'oct-1-én-3-ol, qui est le produit majeur de l'huile essentielle de *T. canadensis*, est aussi retrouvé chez les champignons et en plus faible quantité dans l'huile de lavande (maximum 1%), ce produit est apprécié en parfumerie pour son odeur "humique" (Bauer et Garbe, 1985). Nous retrouvons aussi, en faible quantité, quelques alcools monoterpéniques

Tableau 3. Composition quantitative de l'huile essentielle

#	Identification	T.R.	I.K.	% de surface-DB-5				
				A-1	P-1	P-2	P-3	P-4
1	oct-1-ène	5,41	795	0,22	0,25	-	2,53	-
2	hexanal	5,46	797	0,05	2,14	1,08	2,04	1,06
3	non identifié	6,03	816	0,08	0,05	0,27	-	-
4	non identifié	6,71	837	0,05	0,04	0,18	-	0,36
5	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	7,18	849	-	0,68	-	0,78	-
6	trans-hex-2-én-1-al	7,43	856	1,52	24,13	6,74	27,76	5,20
7	cis-hex-3-én-1-ol	7,64	861	3,80	1,97	2,04	13,87	9,67
8	non identifié	8,15	873	-	-	-	0,43	1,99
9	hexan-1-ol	8,30	877	1,00	1,02	1,33	2,13	1,61
10	non identifié	8,69	886	0,07	0,11	0,54	-	-
11	non identifié	9,02	893	-	0,09	0,40	-	-
12	non identifié	9,24	897	-	-	-	0,16	0,70
13	non identifié	9,63	905	-	0,05	0,21	-	-
14	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	14,05	976	4,52	4,65	4,09	4,06	2,36
15	oct-1-én-3-ol	14,54	983	43,93	44,64	40,41	22,32	16,87
16	octan-3-one	14,92	988	0,22	0,32	0,23	-	-
17	décane	15,89	1000	0,07	0,11	0,60	-	-
18	p-cymène	17,06	1023	0,26	0,14	-	-	-
19	limonène	17,42	1029	0,65	-	-	-	-
20	1,8-cinéole	17,98	1038	-	-	-	0,07	0,72
21	octan-1-ol	20,78	1084	1,48	0,56	1,44	-	-
22	α-thujone	22,82	1113	0,44	0,24	-	-	-
23	alcool phényléthylque	23,34	1121	0,17	0,08	0,35	1,14	2,09
24	non identifié	25,22	1144	-	0,09	-	0,54	-
25	non identifié	26,13	1155	-	-	-	2,88	-
26	non identifié	27,60	1172	-	-	-	0,30	-
27	salicylate de méthyle	27,98	1177	-	0,09	0,29	-	-
28	myrténol	29,36	1192	0,81	0,68	0,75	0,21	-
29	p-menth-2-én-7-ol	30,06	1199	0,76	0,52	0,70	-	-

Tableau 3 (suite). Composition quantitative de l'huile essentielle

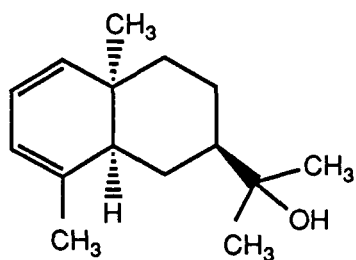
#	Identification	T.R.	I.K.	% de surface-DB-5				
				A-1	P-1	P-2	P-3	P-4
30	non identifié	31,26	1219	0,26	0,29	-	0,26	0,86
31	non identifié	31,78	1228	0,53	0,36	0,36	-	-
32	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	33,19	1251	5,08	3,00	2,75	1,14	0,37
33	géraniol	33,79	1261	0,37	0,20	-	-	-
34	non identifié	34,00	1264	0,55	0,34	0,48	-	-
35	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	34,21	1267	1,97	1,18	1,59	0,21	-
36	non identifié	35,12	1281	0,28	0,04	0,38	-	-
37	p-menth-1,8-diène-7-ol	36,58	1303	1,40	0,84	1,39	0,29	-
38	2-OH-5-CH <sub>3</sub> acétophénone	37,54	1316	0,13	0,43	3,97	0,34	2,33
39	eugénol	40,59	1358	0,67	0,23	0,45	0,10	-
40	non identifié	40,99	1363	0,39	0,18	-	0,79	2,39
41	3-méthyltridécan	41,90	1375	0,49	0,29	1,06	0,37	1,49
42	non identifié	46,53	1446	0,38	-	0,29	-	-
43	non identifié	46,71	1449	1,85	0,49	1,04	-	-
44	non identifié	46,96	1453	5,29	1,46	2,85	0,57	-
45	3,5-diméthoxyphénol	47,97	1470	0,10	0,12	0,52	<b>11,74</b>	<b>46,26</b>
46	pentadécane	50,29	1508	0,30	0,09	0,42	0,12	0,44
47	4-CH <sub>3</sub> -2,6-di-tert-butylphénol	50,82	1517	0,23	-	-	1,74	6,26
48	occidentol	52,84	1548	0,20	<b>1,41</b>	<b>8,13</b>	0,26	0,64
49	non identifié	56,06	1595	-	-	0,32	-	-
50	γ-eudesmol	57,76	1626	-	0,15	0,50	-	-
51	5-méthylundéc-1-ène	63,84	1736	0,21	-	0,27	-	-
52	octadécane	67,63	1799	0,43	0,13	0,56	0,16	0,66
53	6,10,14-triCH <sub>3</sub> pentadécane-2-one	69,90	1846	3,85	0,62	2,85	-	-
54	2,6-diméthylheptadécane	71,61	1880	-	-	0,24	-	-
55	non identifié	75,62	1958	0,70	0,10	0,70	0,12	0,51
56	non identifié	77,97	2002	8,32	0,36	1,81	-	-
57	non identifié	80,08	2049	0,20	0,70	2,03	-	-



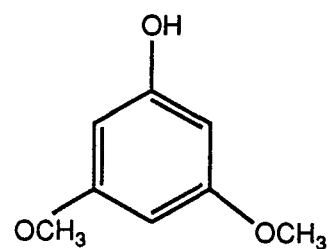
comme le myrténol, le géraniol, et aussi un alcool sesquiterpénique l'occidentalol (figure 8). Notons la présence de l' $\alpha$ -thujone, une cétone monoterpénique peu abondante, et de deux phénols, le 3,5-diméthoxyphénol (#45) et le 4-méthyl-2,6-di-tert-butylphénol (BHT-#47). Ce dernier n'est pas un produit naturel; il est préparé à partir du p-crésol et de l'isobutylène et est utilisé comme antioxydant, dans l'industrie alimentaire entre autres. Le BHT est donc un contaminant provenant, soit des poches en jute utilisées pour le transport de la matière végétale, ou encore des solvants utilisés, bien qu'ils aient été de qualité "chromatographie".

Nous supposons que les produits volatils reflètent bien la composition "réelle" de l'huile essentielle dans l'if. Mais il est toujours possible qu'il y ait eu, en cours de distillation, des réactions de réarrangement chez certains produits, surtout dans les échantillons P-2 et P-4 qui ont été extraits plus longtemps. On peut aussi s'interroger sur le pourcentage "réel" dans la plante du produit majeur l'oct-1-én-3-ol. La figure 9 nous montre comment cet alcool aliphatique est formé à partir de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique chez les champignons (Belitz et Grosch, 1987). De nombreuses études ont été faites sur les réactions enzymatiques qui ont démontré que les lipides insaturés tels que les acides oléique, linoléique et linolénique étaient facilement oxydables en hydroperoxydes, à cause de leurs groupements allyles, et que ces hydroperoxydes étaient à leur tour dégradés en de nombreux produits volatils. De plus, cette oxydation enzymatique conjuguée à une lipolyse survient à un taux plus rapide quand les tissus végétaux sont coupés ou homogénéisés (Belitz et Grosch, 1987).

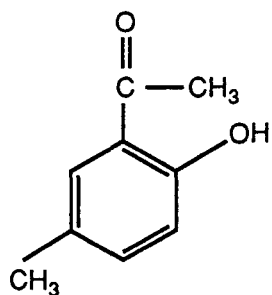
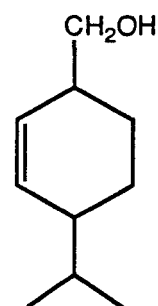
On peut donc soupçonner qu'un mécanisme semblable ait lieu chez l'if et que les pourcentages de certains produits, incluant le cis-hex-3-én-1-ol et le trans-hex-2-én-1-al, communément nommés l'alcool et l'aldéhyde des feuilles, soient surestimés par rapport au



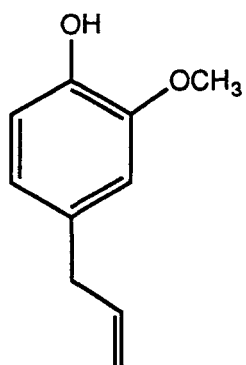
occidentalol



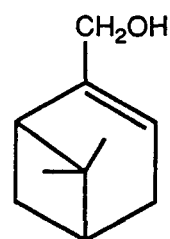
3,5-diméthoxyphénol

2-OH-5-CH<sub>3</sub>-acétophénone

p-menth-2-én-7-ol



eugénol



myrténol

Figure 8. Structures de quelques constituants de l'huile essentielle

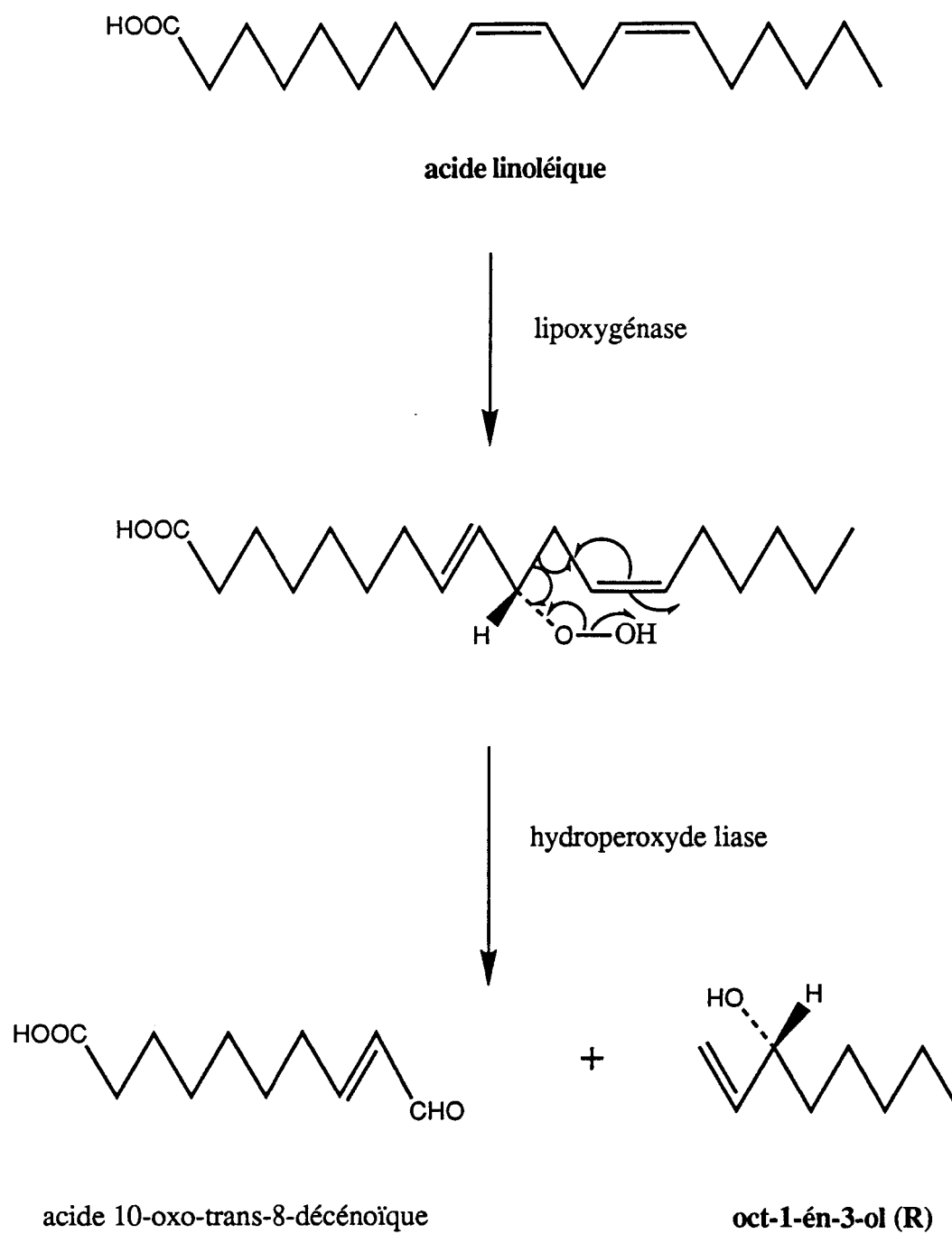


Figure 9. Schéma de la formation de l'oct-1-én-3-ol par oxydation enzymatique

contenu réel dans la plante. Un entraînement à la vapeur, sans broyage du matériel végétal, aurait permis de vérifier s'il y avait vraiment une différence dans les pourcentages et de là, conclure ou non à la présence d'oxydation enzymatique chez l'if. De plus s'il avait été possible d'utiliser la technique "head space" (Chialva et Gabri, 1987), cela nous aurait permis de connaître avec une bien plus grande exactitude les produits volatils de *T. canadensis*, puisque ces produits risquent moins d'être altérés lors de ce genre d'extraction. Cette technique consiste à placer une petite quantité d'herbe dans une chambre chauffée, reliée à un chromatographe en phase gazeuse capillaire, qui permet la séparation des produits volatils présents à l'équilibre dans la phase vapeur au-dessus de l'échantillon. Il n'y a donc ni perte, ni dégradation de produit.

Les produits volatils de l'if sont différents de ceux que l'on retrouve habituellement chez les autres conifères. Le tableau 4 nous montre les pourcentages moyens des produits majeurs retrouvés, après distillation des feuilles, chez *Picea mariana* (épinette noire), *P. glauca* (épinette blanche), *Abies balsamea* (sapin baumier) et *Thuja occidentalis* (cèdre), tous des conifères de l'est du Canada (Von Rudloff 1961, 1967, 1974). On constate que les produits majeurs, dans chacun des cas, sont des monoterpènes, contrairement à ceux de l'if, ce qui pourrait expliquer que *T. canadensis* soit moins aromatique que ces autres conifères. Un point commun entre le cèdre et l'if est la présence d' $\alpha$ -thujone mais à un pourcentage beaucoup plus faible chez l'if (0,4% contre 60%). L'alcool sesquiterpénique occidentalol, que l'on retrouve chez l'if, est le produit majeur du bois de cèdre (Lessard *et al*, 1991).

La composition de l'huile essentielle d'une plante peut être considérée comme l'empreinte digitale bien caractéristique d'une espèce donnée (Von Rudloff, 1967). Cette empreinte peut permettre de trouver, selon la localisation d'une espèce, des chémotypes

**Tableau 4. Pourcentages des constituants majeurs des huiles essentielles  
de quelques conifères**

#	Constituants	Épinette noire	Épinette blanche	Sapin	Cèdre
1	santène	4	traces	2	-
2	$\alpha$ -pinène	10	7	7	1,5
3	camphène	18	8	7	1
4	$\beta$ -pinène	2	7	<b>35</b>	0,5
5	myrcène	4	5	2	0,5
6	$\Delta$ -3-carène	3	0,5	<b>20</b>	-
7	limonène	4	10	6	1
8	$\beta$ -phellandrène	0,5	1	4	-
9	fenchone	-	-	-	14
10	$\alpha$ -thujone	-	-	-	<b>60</b>
11	$\beta$ -thujone	-	-	-	10
12	camphre	0,2	<b>30</b>	-	2
13	bornéol	0,6	3	0,3	-
14	acétate de bornyle	<b>40</b>	17	15	2

différents. Il en est ainsi pour *A. balsamea* de l'ouest du Canada dont l'huile essentielle contient très peu de  $\Delta$ -3-carène alors que celui de l'est du Canada en contient jusqu'à 20% (Von Rudloff, 1974). À partir de cette relation entre la composition de l'huile essentielle et les caractéristiques cellulaires et morphologiques d'une plante, on peut être amené à vouloir vérifier s'il peut y avoir une concordance entre le patron d'huile essentielle et les autres produits naturels de la plante. Une étude semblable effectuée sur des plants individuels de *T. canadensis* permettrait de connaître s'il existe des variations entre les arbustes de notre région et ceux de l'est des États-Unis par exemple, et par la suite il serait peut-être possible de relier un patron d'huile essentielle à une présence plus ou moins grande de taxanes, et plus spécifiquement de taxol dans la plante; bref de cibler des populations d'ifs plus riches en taxol grâce au profil des produits volatils.

### 3.2.2 Influence de la période de cueillette sur la qualité et la quantité de l'huile

Les échantillons A-1 et P-1, dans le tableau 3, font référence aux cueillettes d'automne et de printemps. On constate que l'oct-1-én-3-ol y est le produit majeur en quantité similaire dans les deux cas. Par contre le trans-hex-2-én-1-al (#6) est présent à 24,1% en P-1 et seulement à 1,5% en A-1. En supposant que cet aldéhyde ne soit pas un produit de transformation, on peut expliquer sa moins grande abondance en automne par la période de dormance que connaissent tous les conifères en hiver. C'est peut-être aussi relié à la présence des jeunes pousses qui étaient en bonne quantité lors de l'extraction de la matière végétale printanière, il est possible que cet aldéhyde soit synthétisé plus abondamment par les cellules végétales jeunes. L'alcool, cis-hex-3-én-1-ol (#7), est légèrement plus abondant en automne qu'au printemps, 3,8% contre 1,9% et les produits inconnus # 44, et 56 sont plus abondants en automne aussi. Cette différence qualitative entre les huiles d'automne et de

printemps est en accord avec les travaux de Von Rudloff sur l'épinette blanche (1972), qui ont démontré, dans une étude annuelle, des variations qualitatives de l'huile essentielle en mai et juin lors de la présence des nouvelles pousses.

Dans le tableau 5, on peut voir les rendements respectifs en huile des cinq échantillons.

**Tableau 5. Pourcentages de rendement en huile essentielle**

	A-1	P-1	P-2	P-3	P-4
Poids sec (g)	97,4	114,7	114,7	114,7	114,7
Quantité d'huile (mg)	20,81	39,31	9,73	28,59	7,01
% de rendement	0,021	0,034	0,009	0,025	0,006

Au point de vue quantitatif, la matière végétale printanière produit un peu plus d'huile essentielle que celle d'automne, 0,034% contre 0,021%. Cette différence quantitative, qui n'est pas très importante, peut s'expliquer par une activité biosynthétique maximale au printemps, durant la croissance des jeunes pousses.

Ces rendements en huile sont faibles comparativement à ceux obtenus d'autres conifères comme l'épinette noire et le sapin baumier (0,5 à 1%). On peut tenter d'expliquer un rendement aussi faible en supposant que la majorité des produits volatils de l'if soient sous forme de glycosides (liés à des sucres), étude qui sera faite dans le prochain chapitre. Ou encore que les autres produits naturels de l'if, responsables entre autres de la toxicité,

comblent certaines fonctions, habituellement dévolues aux huiles essentielles, chez les autres plantes non toxiques et plus aromatiques.

Nous n'avons ici qu'un aperçu sommaire de la variation automne-printemps. Il est certain qu'une étude mensuelle de l'huile essentielle de l'if aurait permis d'évaluer avec une plus grande précision l'influence de la période de cueillette sur la qualité et la quantité de l'huile durant toute une année.

### **3.2.3 Influence du temps de distillation**

Comparons dans le tableau 3 les échantillons P-1 et P-2 qui représentent respectivement la première période d'entraînement à la vapeur de 90 minutes et la seconde période, de 90 minutes aussi.

Le produit majeur est toujours l'oct-1-én-3 ol en P-2 avec un pourcentage de 40,4%, ce qui est comparable à P-1. Le trans-hex-2-én-1-al (#6) est encore présent mais en quantité quatre fois moindre (6,7%) qu'en P-1 (24,1%). Cet aldéhyde est donc en majeure partie épuisé après un temps d'extraction de 90 minutes. Pour le reste des constituants, les pourcentages des produits légers de P-1 se comparent en général avec ceux de P-2, par contre les différences commencent à être plus marquées vers un temps de rétention de 35 minutes. Le 2-hydroxy-5-méthylacétophénone (#38) est présent à 0,43% en P-1 alors qu'il est plus abondant en P-2 avec 3,9% de surface, quant à l'occidentalol (#48), il est six fois plus abondant dans la deuxième extraction de 90 minutes. Il est évident qu'il serait favorable d'extraire la matière végétale pendant trois heures et peut-être même plus, si on est intéressé à récolter les produits lourds de l'huile, qui se volatilisent plus difficilement.



Pour ce qui est du rendement en huile (tableau 5), il chute de façon drastique dans la deuxième période d'entraînement vapeur, passant de 0,034% à 0,009%. D'après ces résultats on peut dire qu'il est inutile d'extraire plus longtemps que deux heures pour obtenir le maximum d'huile essentielle de *T. canadensis* et que, de plus, ce temps de distillation est suffisant pour évaluer la composition globale de l'huile.

### 3.2.4 Influence du solvant d'extraction

D'après les produits retrouvés en P-3 et P-4, énumérés au tableau 3, on constate à prime abord que plusieurs produits sont solubles dans l'eau, donc qu'il valait la peine d'utiliser un solvant plus polaire comme l'éther pour les récupérer dans la phase aqueuse, après une première extraction au pentane.

Comparons tout d'abord P-1 et P-3 représentant le même temps d'extraction. On retrouve une dizaine de produits en moins dans l'échantillon P-3 où le produit majeur est toujours l'oct-1-én-3-ol mais avec un pourcentage moindre de 22,3% comparativement à 44,6% en P-1, cet alcool est donc plus soluble dans le pentane que dans l'eau ou l'éther. Par contre un autre alcool, le cis-hex-3-én-1-ol (#7) qui était présent à 1,9% en P-1 augmente à 13,9% en P-3. La chaîne hydrocarbonée plus courte et la fonction alcool qui est primaire peuvent expliquer la plus grande solubilité du cis-hex-3-én-1-ol dans des solvants polaires, comparativement au oct-1-én-3-ol. Le trans-hex-2-én-1-ol est présent en pourcentages comparables dans les deux échantillons. L'alcool phényléthylique (#23), soluble en partie dans l'eau, est naturellement plus abondant en P-3, ainsi que l'oct-1-ène (#1) et les produits inconnus # 24, et 40. Des produits comme les inconnus # 8, 25, 26 sont présents en P-3 mais non en P-1. Par contre d'autres produits sont plus abondants en P-1 comme

l'occidentalol et les inconnus # 32 et 44. Il est logique que le 3,5-diméthoxyphénol soit plus soluble dans un solvant polaire, on en retrouve 11,7% en P-3 et seulement 0,12% en P-1.

Dans les échantillons P-2 et P-4, on retrouve sensiblement les mêmes résultats que ceux cités plus haut, sauf qu'il y a maintenant une vingtaine de produits de moins en P-4 qu'en P-2. L'occidentalol (#48) qui était présent à 8,1% en P-2 n'est plus qu'à 0,6% en P-4, ce produit est donc peu soluble dans l'eau et l'éther. En comparant P-3 et P-4 on constate que le 3,5-diméthoxyphénol (#45) est en quantité encore plus importante en P-4 avec un pourcentage de 46,2%, il y est d'ailleurs le produit majeur.

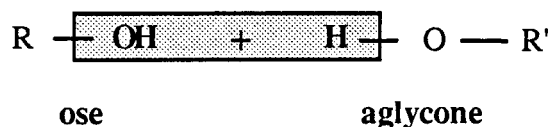
Les pourcentages de rendement de P-3 et P-4 sont respectivement 0,025% et 0,006% (tableau 5), résultats légèrement plus faibles que dans les extraits au pentane (P-1 et P-2). On constate donc que l'huile n'est pas épuisée après l'extraction au pentane et qu'une extraction avec un solvant plus polaire que l'éther permettrait peut-être de récupérer encore plus de produits volatils dans la phase aqueuse. Il aurait été intéressant de faire, en plus, un entraînement à la vapeur d'eau en utilisant dès le départ l'éther diéthylique au lieu du pentane, ceci pour avoir un meilleur aperçu de la solubilité des divers produits et ce, sans qu'il y ait eu d'autres extractions au préalable. Cela nous aurait aussi permis de comparer plus adéquatement la quantité d'huile produite dans chacun des cas, et de vérifier si un solvant plus polaire permettrait d'augmenter sensiblement le rendement en huile essentielle.

## CHAPITRE 4

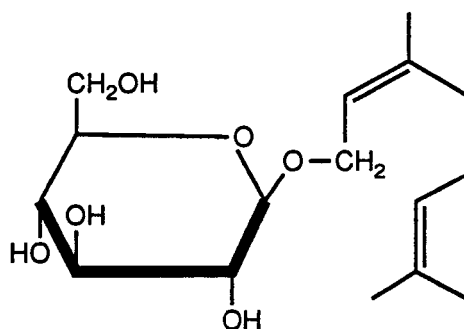
### ANALYSE DES GLYCOSIDES

## 4.1 Introduction

Les hétérosides ou "glycosides" résultent de la combinaison, avec élimination d'eau, du groupe réducteur d'un "ose" avec une substance non glucidique, l'aglycone:



Il existe un très grand nombre de glycosides végétaux dont plusieurs constituent les principes actifs de drogues végétales. Les glycosides qui nous intéressent ici sont les précurseurs d'arômes, c'est-à-dire les constituants des huiles essentielles qui ne sont pas entraînés par la vapeur d'eau, donc qui existent dans la plante sous forme "liée". Ce sont en général des monoterpènes acycliques et cycliques ainsi que des composés à noyau aromatique. Francis et Allcock en 1969 ont été les premiers à détecter les glucosides de géranyle, de néryle et de citronellyle dans les pétales de rose. Le terme "glucoside" signifie que l'aglycone est lié au glucose sous la forme  $\beta$ -D-glucopyranoside, ce qui se produit dans 80% des cas (Stahl-Biskup, 1987):



$\beta$ -D-glucoside de néryle

Mais les glycosides peuvent aussi être formés d'autres sucres tels que d'autres hexoses (fructose, galactose...), des pentoses (xylose, ribose...) ou encore d'un méthylpentose (rhamnose).

Des recherches sur le rôle des glycosides ont mis en évidence certaines fonctions. D'après Banthorpe (1972), ces composés seraient des intermédiaires dans la biosynthèse des monoterpènes. De plus ces derniers seraient accumulés et transportés dans les tissus végétaux sous forme de glycosides. Il a aussi été démontré, chez plusieurs fruits, que les fractions terpéniques liées étaient plus importantes que les fractions libres, selon un rapport variant de 3,1 à 5,5 (Salles *et al*, 1987). Ces glycosides représentent donc un domaine d'avenir pour l'industrie des arômes, et de nouvelles méthodes ont été élaborées pour séparer les produits volatils des sucres d'une manière plus douce que l'hydrolyse acide, afin d'éviter des réactions indésirables de réarrangements.

Il est toujours possible d'isoler les glycosides en entier et de les analyser ensuite par chromatographie liquide à haute performance, mais la méthode de choix pour libérer les aglycones d'un extrait végétal aqueux est l'hydrolyse enzymatique (Svendsen et Merckx, 1989; Svendsen et Van Den Dries, 1989). À cette fin, plusieurs enzymes peuvent être utilisés car chacun présente sa propre spécificité, cependant des travaux réalisés sur la rose ont démontré que la "cellulase" semblait être l'agent de coupure enzymatique le plus adéquat, permettant de libérer le plus large éventail d'aglycones (Ackermann *et al*, 1989).

Svendsen et Merckx (1990) ont étudié les glycosides de plusieurs plantes, entre autres des conifères dont *Taxus baccata*. L'hydrolyse enzymatique des extraits aqueux de ces plantes, après libération des produits volatils, a permis de retrouver sur les chromatogrammes (CG)

des produits tels que le cis-hex-3-én-1-ol, l'hexan-1-ol, l'oct-1-én-3-ol, l'octan-3-ol et les alcools benzylique et phényléthylique. En général, dans la majorité des plantes étudiées, les alcools aliphatiques étaient présents en bonne quantité et plusieurs aglycones identifiés étaient différents des constituants de l'huile essentielle de la plante.

Notre analyse des aglycones de *Taxus canadensis* permettra de connaître la quantité de produits volatils liés existant dans l'if, de les identifier et de comparer nos résultats avec ceux de Svendsen et Merckx.

## 4.2 Résultats et discussion

Pour vérifier si un enzyme pouvait être plus efficace qu'un autre pour hydrolyser les glycosides de *T. canadensis*, nous avons employé la  $\beta$ -glucosidase et la cellulase. Dans chacun des cas les aglycones libérés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse et les résultats comparés.

Dans le tableau 6, nous retrouvons tous les aglycones de plus de 0,2% avec leur identification, si trouvée, et les cinq principaux fragments du spectre de masse par ordre décroissant de leur intensité relative. Sur 34 produits, 17 ont pu être identifiés lorsque le temps de rétention, l'indice de Kovats et le spectre de masse correspondaient avec la littérature (Adams, 1989; Jennings et Shibamoto, 1980). On constate que tous les aglycones identifiés possèdent un groupement hydroxyle ce qui nous rassure sur l'efficacité de notre hydrolyse enzymatique, puisque normalement, dans les glycosides, la liaison se fait entre le groupe réducteur du sucre et un groupement hydroxyle (alcool ou phénol) de l'aglycone.

Tableau 6. Identification des aglycones

#	Identification	CG			CG / SM					
		TR DB-5	I K DB-5	I K Sup.	M+	1°	2°	3°	4°	5°
1	cis-hex-3-én-1-ol	7,49	861	1382	100	41	67	55	42	82
2	hexan-1-ol	8,16	878	1357	102	56	43	41	42	55
3	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	13,82	976	1489	126	57	41	55	70	42
4	oct-1-én-3-ol	14,25	982	1453	128	57	43	41	72	55
5	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	16,99	1025	-	-	41	43	69	57	55
6	alcool benzylique	17,59	1036	1872	108	79	77	108	107	51
7	octan-1-ol	20,56	1084	1557	130	43	41	42	57	55
8	alcool phényléthylique	23,02	1119	1906	122	91	92	122	65	51
9	trans-pinocarvéol	24,79	1142	-	152	41	43	55	92	91
10	bornéol	26,76	1166	1695	154	95	43	41	55	110
11	salicylate de méthyle	28,66	1187	1785	152	120	92	152	65	121
12	non identifié	28,78	1189	-	-	59	43	93	41	81
13	myrténol	29,05	1192	1781	152	79	41	43	91	108
14	p-menth-2-én-7-ol	29,75	1199	1766	154	43	41	67	93	57
15	non identifié	30,97	1219	-	-	43	41	44	91	57
16	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	32,89	1251	1914	152	43	41	93	79	91
17	géraniol	33,50	1261	1843	154	41	43	69	42	57
18	non identifié	33,70	1264	1798	-	41	43	55	67	68
19	non identifié	33,91	1267	1856	-	41	67	79	55	43
20	p-menth-1,8-diène-7-ol	36,26	1303	1993	152	41	68	67	79	43
21	2-OH-5-CH <sub>3</sub> acétophénone	37,22	1316	2180	150	150	135	77	44	107

Tableau 6 (suite). Identification des aglycones

#	Identification	CG			CG/ SM					
		TR DB-5	I K DB-5	I K Sup.	M+	1°	2°	3°	4°	5°
22	non identifié	39,37	1346	-	-	44	43	41	91	79
23	eugénol	40,25	1358	2159	164	164	77	55	44	43
24	non identifié	44,26	1412	2353	208	107	43	41	122	91
25	non identifié	46,23	1447	2372	-	43	44	41	55	164
26	non identifié	46,39	1449	2032	-	41	43	79	67	55
27	non identifié	46,64	1453	2101	-	41	79	67	91	55
28	3,5-diméthoxyphénol	47,69	1472	2858	154	154	125	69	94	111
29	non identifié	50,47	1516	2595	182	151	182	52	51	123
30	non identifié	53,75	1566	-	-	69	43	125	154	55
31	non identifié	54,20	1573	-	-	69	43	125	154	55
32	non identifié	58,24	1641	-	-	43	121	93	41	79
33	non identifié	61,24	1696	-	-	44	43	41	69	154
34	non identifié	65,31	1766	-	224	43	44	137	164	55



Les aglycones inconnus # 30 et 31 présentent des spectres de masse dont le patron de fragmentation ressemble au 3,5-diméthoxyphénol (# 28) avec des fragments de masse à 69, 125 et 154; sans pouvoir les identifier avec certitude on peut préciser qu'il s'agit sûrement de produits très similaires au 3,5-diméthoxyphénol. La présence de ce dernier, comme aglycone majeur chez *T. canadensis*, n'est pas surprenante car ce glycoside a déjà été isolé des aiguilles de *T. baccata* et *brevifolia* sous le nom de taxicatine (Khan et Parveen, 1987).

Le tableau 7 compare les pourcentages des aglycones libérés par les enzymes  $\beta$ -glucosidase et cellulase. Dans l'extrait hydrolysé par la  $\beta$ -glucosidase, le chromatogramme compte neuf produits de moins que celui de la cellulase, ce qui confirme la théorie que la cellulase possède un champ d'action plus vaste que les autres enzymes (Ackermann *et al*, 1989). Le produit majeur de l'hydrolyse enzymatique avec la  $\beta$ -glucosidase est le 3,5-diméthoxyphénol, avec un pourcentage de 48,6% contre 26,3% avec la cellulase. Par contre cette dernière libère une plus grande quantité d'oct-1-én-3-ol, 39,1% contre 23%. Pour les autres produits, les quantités d'aglycones libérés par la cellulase sont égales ou légèrement supérieures à celles des aglycones libérés par la  $\beta$ -glucosidase sauf pour les inconnus # 15, 16, 18, 19, 27 et 32 qui sont un peu plus abondants avec la  $\beta$ -glucosidase.

On peut constater que les enzymes semblent spécifiques puisque les quantités d'aglycones libérés, surtout les plus importants, varient selon l'un ou l'autre enzyme.  $\beta$ -glucosidase semblerait avoir plus d'affinités pour les composés aromatiques comme les phénols, si l'on en juge d'après les plus grandes quantités de 3,5-diméthoxyphénol et de 2-hydroxy-5-méthylacétophénone libérées avec cet enzyme.

Tableau 7. Quantification des aglycones

#	Identification	TR DB-5	I K DB-5	I K Sup.	% de surface-DB-5	
					$\beta$ -glucosidase	cellulase
1	cis-hex-3-én-1-ol	7,49	861	1382	3,68	4,09
2	hexan-1-ol	8,16	878	1357	0,79	1,47
3	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	13,82	976	1489	1,94	3,49
4	oct-1-én-3-ol	14,25	982	1453	23,05	39,11
5	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	16,99	1025	-	0,23	0,44
6	alcool benzylique	17,59	1036	1872	2,22	2,34
7	octan-1-ol	20,56	1084	1557	0,21	0,23
8	alcool phényléthylique	23,02	1119	1906	1,92	2,33
9	trans-pinocarvéol	24,79	1142	-	-	0,62
10	bornéol	26,76	1166	1695	-	0,65
11	salicylate de méthyle	28,66	1187	1785	-	0,69
12	non identifié	28,78	1189	-	0,69	0,94
13	myrténol	29,05	1192	1781	0,56	0,71
14	p-menth-2-én-7-ol	29,75	1199	1766	0,27	0,28
15	non identifié	30,97	1219	-	0,39	0,27
16	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	32,89	1251	1914	2,04	1,91
17	géraniol	33,50	1261	1843	-	0,25
18	non identifié	33,70	1264	1798	0,24	0,22
19	non identifié	33,91	1267	1856	0,97	0,91
20	p-menth-1,8-diène-7-ol	36,26	1303	1993	0,76	0,87
21	2-OH-5-CH <sub>3</sub> acétophénone	37,22	1316	2180	2,39	0,77

Tableau 7 (suite). Quantification des aglycones

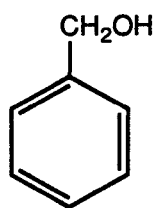
#	Identification	TR DB-5	I K DB-5	I K Sup.	% de surface-DB-5	
					$\beta$ -glucosidase	cellulase
22	non identifié	39,37	1346	-	0,30	0,31
23	eugénol	40,25	1358	2159	0,41	0,77
24	non identifié	44,26	1412	2353	-	1,14
25	non identifié	46,23	1447	2372	0,61	0,69
26	non identifié	46,39	1449	2032	0,43	0,43
27	non identifié	46,64	1453	2101	2,23	1,72
28	3,5-diméthoxyphénol	47,69	1472	2858	48,65	26,29
29	non identifié	50,47	1516	2595	2,90	3,96
30	non identifié	53,75	1566	-	-	0,72
31	non identifié	54,20	1573	-	-	0,27
32	non identifié	58,24	1641	-	0,55	0,21
33	non identifié	61,24	1696	-	-	0,23
34	non identifié	65,31	1766	-	-	0,36

Sur les 34 produits listés dans le tableau 7, dix-neuf se retrouvent aussi dans l'huile essentielle de *T. canadensis* (tableau 3), ce sont les produits # 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 26, 27 et 28, majoritairement identifiés. Dans les produits retrouvés uniquement chez les aglycones, l'alcool benzylique, le bornéol et le trans-pinocarvéol sont les seuls identifiés, les douze autres produits inconnus sont surtout des produits lourds (T.R.> 35 min). L'oct-1-én-3-ol qui est le produit majeur à 44% dans l'huile essentielle est présent à 39% dans les aglycones libérés par hydrolyse enzymatique avec la cellulase. L'hydrolyse permet donc de libérer une quantité encore importante d'oct-1-én-3-ol et plusieurs autres alcools et phénols (figure 10).

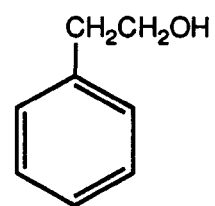
Svendsen et Merkx (1989) ont aussi retrouvé l'oct-1-én-3-ol comme aglycone majeur (50%) dans *T. baccata*, de plus ils ont retrouvé des traces (< 0,5%) d'hex-3-én-1-ol alors que nous en retrouvons 4% dans *T. canadensis* et de 0,5 à 5% d'eugénol contre 0,8% dans *T. canadensis*. Par contre ces chercheurs n'ont pas détecté les alcools benzylique et phényléthylique alors que nous retrouvons 2,3% de chacun dans *T. canadensis*.

Les différences dans les résultats tiennent sûrement aux caractéristiques distinctes des deux espèces qui, de plus, ne vivent pas dans le même environnement. Les alcools aromatiques et aliphatiques présents dans *T. canadensis* sont aussi retrouvés chez plusieurs autres conifères. Svendsen et Merkx (1990) ont d'ailleurs observé que ces alcools liés, sous forme glycosides, se trouvaient un peu partout chez les végétaux, mais sans pouvoir toutefois expliquer leurs fonctions.

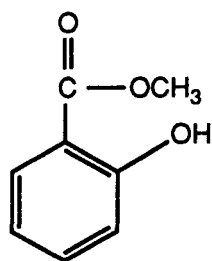
Le tableau 8 nous indique les pourcentages de rendement en aglycones obtenus avec les deux enzymes.



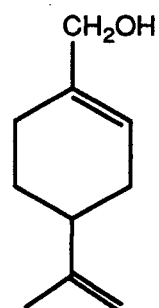
alcool benzylique



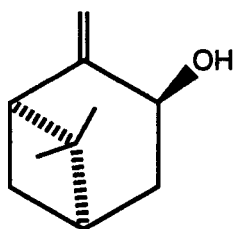
alcool phényléthylque



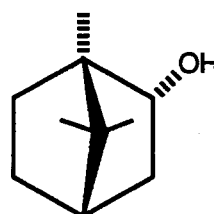
salicylate de méthyle



p-menth-1,8-diène-7-ol



trans-pinocarvéol



bornéol

Figure 10. Structures de quelques aglycones

Tableau 8. Pourcentages de rendement en aglycones

	$\beta$ -glucosidase	cellulase
Poids sec (g)	25	25
Qté. d'aglycones (mg)	23,04	24,68
% de rendement	<b>0,092</b>	<b>0,098</b>

Ces rendements sont supérieurs à ceux des huiles essentielles (tableau 5), 0,09% contre 0,03%. Il y a donc une quantité importante de produits volatils liés chez *T. canadensis*, précisément trois fois plus importante que celle des produits volatils libres. On peut penser qu'il serait même possible d'augmenter l'efficacité de la méthode en employant un mélange de plusieurs enzymes au lieu d'un seul, ou encore en prolongeant le temps de l'hydrolyse.

Si les produits volatils existent sous forme liée, il est possible que les taxanes puissent l'être aussi. Ces études ouvrent donc la voie à d'autres investigations dont les résultats permettront peut-être d'augmenter les quantités disponibles de produits naturels végétaux utiles à l'être humain.

## **CHAPITRE 5**

### **ANALYSE DES TAXANES**

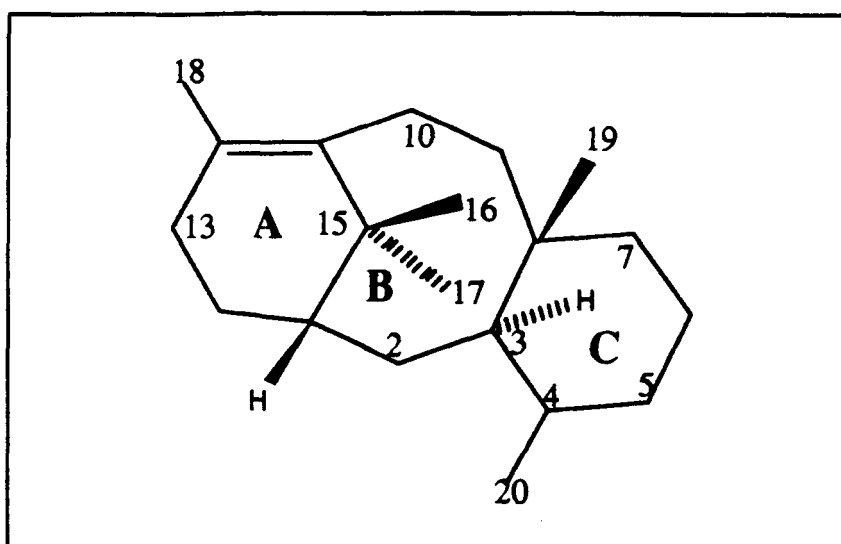
## 5.1 Introduction

Depuis le début du siècle, les végétaux du genre *Taxus* ont été l'objet d'investigations dont le but premier était de connaître les substances responsables de la toxicité légendaire de l'if. En 1856, Lucas fut le premier à isoler de *T. baccata* un alcaloïde nommé "taxine" qui, par la suite, s'est avéré être un mélange d'au moins trois alcaloïdes (Lythgoe, 1968).

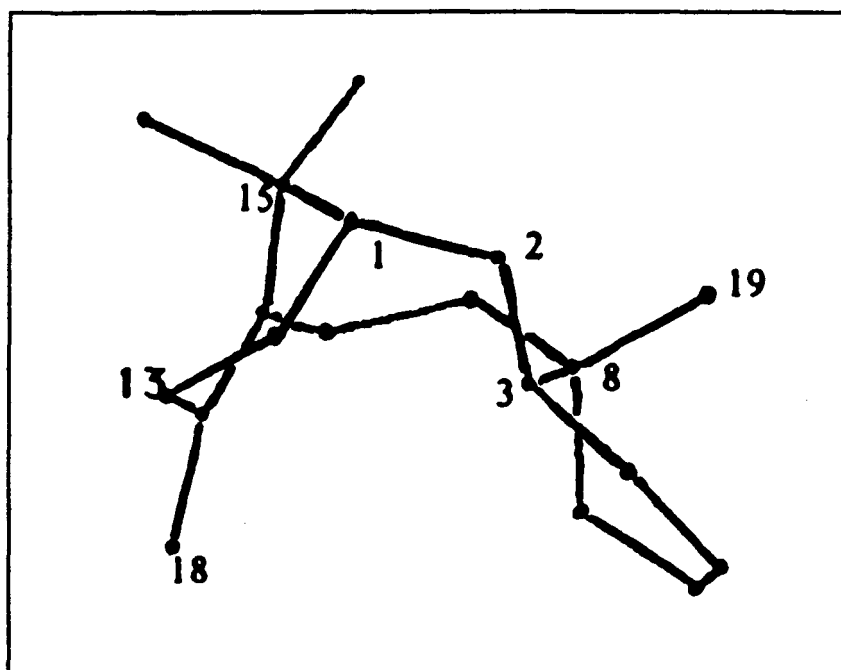
Les alcaloïdes sont des substances naturelles qui contiennent de l'azote, le plus souvent inclus dans un hétérocycle; on parlera de "protoalcaloïdes" si l'azote n'est pas intracyclique. Ces produits ont un caractère basique et ils existent à l'état naturel sous forme de sels ou combinés à des tannins. La majorité des alcaloïdes possède des propriétés pharmacologiques et on les retrouve surtout chez les Angiospermes, mais très peu chez les Gymnospermes; l'if est donc un cas isolé parmi les conifères.

Miller, en 1980, a clarifié les nombreux produits naturels identifiés depuis le début du siècle, surtout chez *T. baccata*, mais aussi chez d'autres espèces. Ces produits ont tous en commun le squelette "taxane" qui est un diterpène (C<sub>20</sub>) composé de trois cycles. La figure 11 montre la structure planaire (I) du squelette taxane ainsi que sa structure en trois dimensions (II) (Guénard et Blechert, 1990). Le cycle à 6 (A), a une conformation "bateau" déformée et il est lié, en cis, au cycle à 8 (B), qui a une conformation "bateau-chaise". Le cycle à 6 (C), qui a une conformation "chaise" déformée est lié, en trans, au cycle B. À ce jour, quatre squelettes diterpéniques de base des taxanes sont connus (figure 12) et leur biosynthèse est relié au géranylgéraniol (Guénard et Blécher, 1990; Guéritte-Voegelein et al, 1987). Les taxanes ayant un cycle oxirane en 4-20 (B) peuvent provenir de dérivés avec une





I



II

Figure 11. Structures planaire (I) et en trois dimensions (II) du squelette taxane

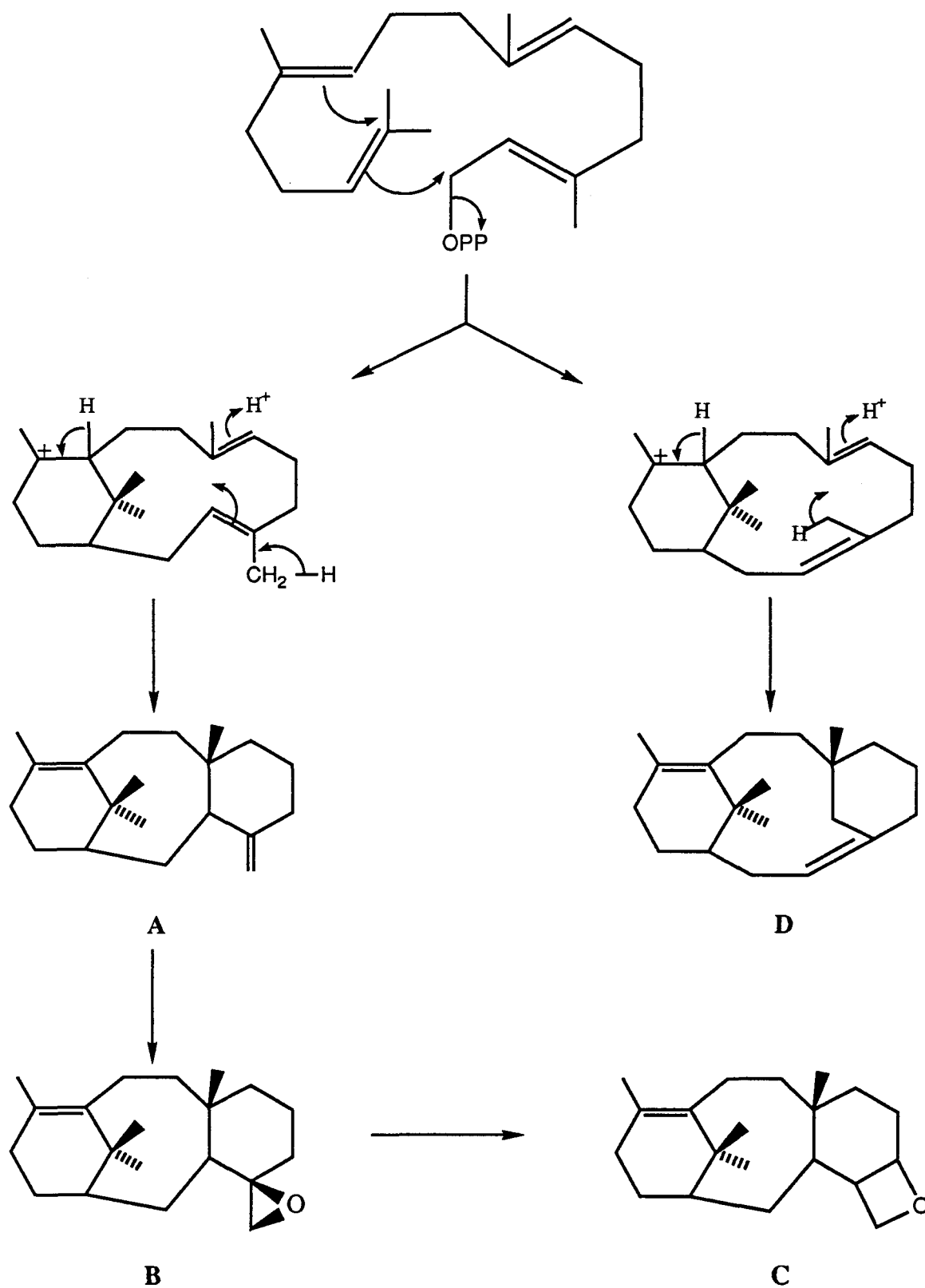


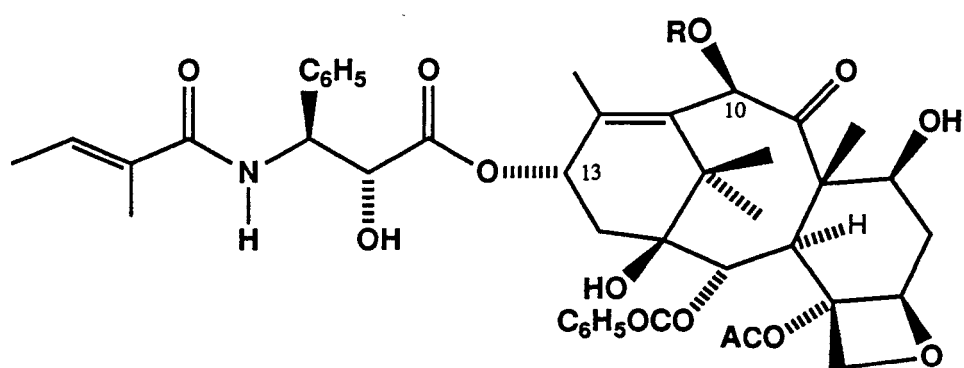
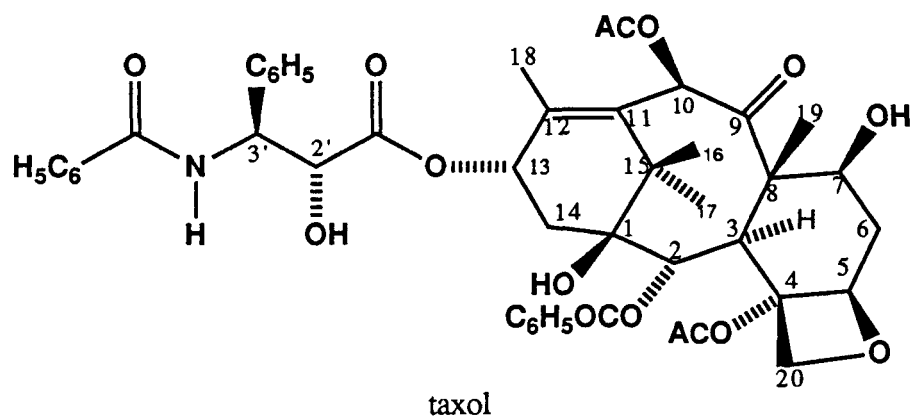
Figure 12. Schéma de la biosynthèse des quatre squelettes "taxane"

double liaison (A) à cette même position, alors que le cycle oxétane (C) peut être le résultat de l'ouverture du cycle oxirane suivi d'un réarrangement (Guénard et Blécher, 1990).

De nombreux taxanes ont été isolés et identifiés (environ 40), surtout depuis la découverte du taxol en 1971 par Wani et son équipe, à partir de l'écorce de *T. brevifolia*. La figure 13 nous montre les structures de quelques taxanes bien connus, dont le taxol. Ce dernier est un protoalcaloïde diterpénique,  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , constitué du squelette taxane à lequel est liée une chaîne latérale azotée, en position 13. Le taxol possède des propriétés cytotoxiques bien spéciales et il est présentement au stade II des essais cliniques pour le cancer des ovaires et d'autres types de cancer.

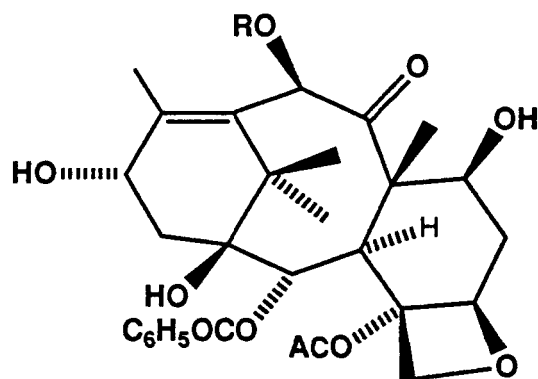
Le mode d'action du taxol sur la cellule est particulier, il a été mis en évidence par Horwitz *et al* (1979). Sa cible est une protéine, la tubuline, qui joue un rôle essentiel dans la division cellulaire (mitose) en s'assemblant en microtubules organisés en fuseau mitotique. C'est pourquoi l'on nomme "poisons du fuseau" ce genre de médicament comme la vinblastine, la vincristine, la colchicine, la podophyllotoxine, car ils s'attaquent au fuseau mitotique et nuisent à son bon fonctionnement. Mais là s'arrête la ressemblance avec le taxol car, contrairement à ces autres poisons du fuseau, qui inhibent l'assemblage de la tubuline en microtubules, le taxol lui, inhibe le désassemblage des microtubules; il stabilise tellement ces derniers qu'ils ne peuvent plus se désassembler normalement, d'où la perturbation de la division cellulaire et la mort des cellules.

Cette activité cytotoxique du taxol (figure 13) ne peut avoir lieu si la molécule a été privée de sa chaîne latérale à la position 13 (Sénilh *et al*, 1984), ni si la partie diterpénique ne contient pas de cycle oxétane en position 4-5 (Guéritte-Voegelein *et al*, 1987). De plus, il est



R = Ac = céphalomannine

R = H = désacétyl-10 céphalomannine



R = Ac = baccatine III

R = H = désacétyl-10 baccatine III

Figure 13. Structures de quelques taxanes

important que la position 2' soit occupée par un groupement hydroxyle libre pour que la molécule conserve toute son activité cytotoxique (Mellado *et al*, 1984).

Avec sa structure et son mode d'action très particuliers, différents des antitumoraux classiques, le taxol s'avère d'un intérêt considérable pour les chercheurs. De plus il représente un défi de taille sur deux points: premièrement, le taxol n'étant pas soluble dans l'eau, des techniques novatrices doivent être trouvées pour le rendre injectable et assimilable par l'organisme humain. Deuxièmement, étant présent en très faible quantité dans l'if (0,01%), des sources alternatives de taxol doivent être trouvées impérativement, de manière à pouvoir suppléer aux demandes croissantes de traitement sans mettre en danger la survie du genre *Taxus*. Les synthèses, synthèses partielles, cultures de tissus etc... sont l'objet de recherches intensives actuellement. L'extraction du taxol à partir des aiguilles d'ifs au lieu des écorces est aussi un moyen étudié pour satisfaire à la demande, tout en faisant subir à l'arbre un traitement beaucoup moins traumatisant.

La synthèse totale du taxol, avec un bon rendement, représente un travail considérable dont l'échéance semble encore lointaine. Par contre une synthèse partielle du taxol a été mise au point par des chercheurs français (Denis *et al*, 1988), à partir d'un précurseur naturel, la désacétyl-10 baccatine III (figure 13), qui est présent dans les aiguilles de *T. baccata* en plus grande quantité que le taxol (0,1%). Par la même occasion fut synthétisé un nouveau produit très semblable au taxol, le taxotère, qui possède lui aussi des propriétés cytotoxiques.

Dans le but de mieux connaître la réactivité de la molécule du taxol nous avons effectué, dans ce travail, un premier essai d'acétylation radioactive du taxol pour connaître à quelle(s)

position(s) elle avait lieu, et s'il était possible de détecter de faibles quantités de ce produit acétylé en HPLC, avec un détecteur à radioactivité.

Toutes les espèces d'ifs ont fait l'objet de plusieurs études, sauf *T. canadensis* qui l'a été très peu (Bourbeau, 1954; Witherup *et al*, 1990). Il devenait donc intéressant de rechercher le taxol dans l'if régional, de le doser et de l'isoler. Par la même occasion, l'identification d'autres taxanes était aussi rendue possible. En général les alcaloïdes sont répartis dans toute la plante et non pas seulement dans des organes spécifiques (Manske, 1950). De plus l'on a observé des fluctuations du contenu en alcaloïdes des plantes au cours d'une saison, la période au contenu maximal étant au début de la floraison, soit au printemps. Nous avons voulu vérifier ces faits chez l'if régional, en dosant le taxol des aiguilles et des tiges séparément et à trois périodes différentes, soit à l'automne, au printemps et à l'été. Il est à noter que notre but était de connaître la tendance globale du comportement du taxol à ces deux points de vue et non pas de faire une analyse statistique de la question.

Les produits naturels végétaux représentent un défi pour la chimie, car étant souvent présents en faible quantité dans la plante, il s'avère difficile de les extraire de la matrice végétale. De plus, la présence dans le feuillage végétal, de nombreux pigments et cires donnent souvent des chromatogrammes très "peuplés" où il peut être difficile de retrouver notre produit d'intérêt. On sait que le taxol n'est pas le seul taxane présent dans l'if, il est d'ailleurs toujours accompagné de la céphalomannine; un des défis majeurs de la méthode d'analyse employée consistait justement à séparer ces deux taxanes, de manière à pouvoir quantifier le taxol et l'isoler par HPLC.

## 5.2 Résultats et discussion

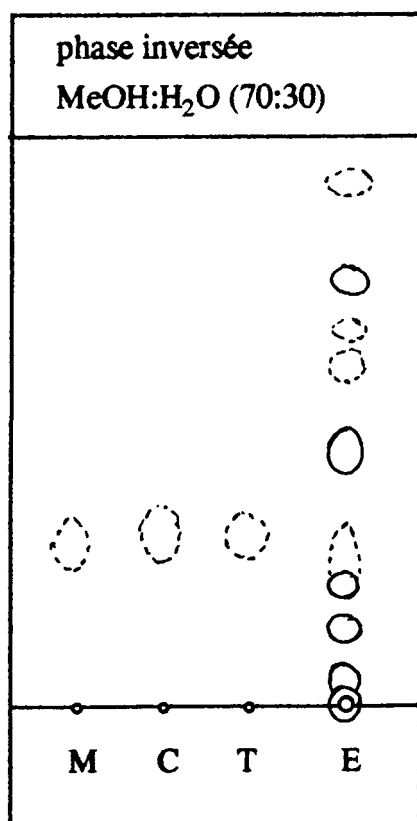
### 5.2.1 Préparation des extraits végétaux

La méthode employée pour préparer les extraits est adéquate puisqu'elle permet d'extraire le taxol. Cependant, un essai effectué vers la fin de notre expérimentation nous a permis de constater qu'il restait encore un peu de taxol dans le matériel végétal, après la macération de 16 heures dans le méthanol. Nous croyons donc qu'il serait favorable d'améliorer la méthode en rafraîchissant le solvant après le premier huit heures; cela assurerait, en prévenant la saturation du solvant, un retrait maximum de taxol de la matière végétale.

### 5.2.2 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

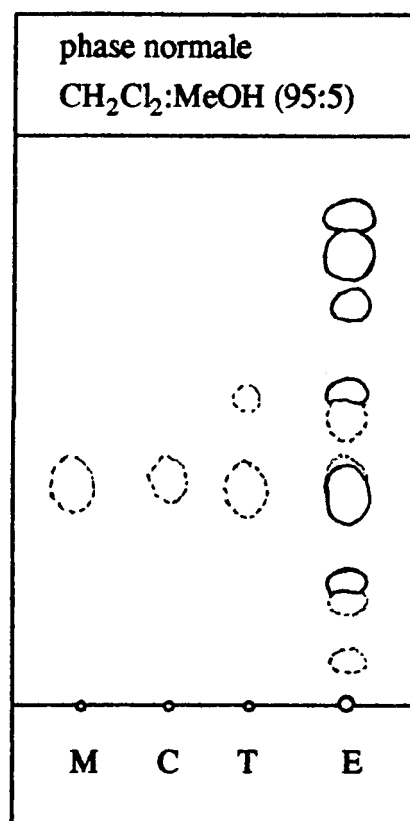
La figure 14 présente les chromatogrammes obtenus en phase inversée (MeOH:H<sub>2</sub>O; 70:30) et en phase normale (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH; 95:5). Nous avons appliqué, sur les plaques, l'extrait végétal (E), le taxol (T) et la céphalomannine (C) standards et un mélange de ces standards (M). Nous pouvons constater, à prime abord, que plusieurs produits sont présents dans l'extrait végétal, certains étant bien visibles, de coloration jaune, verte et rose, et d'autres visibles à la lumière ultraviolette seulement, dont le taxol et la céphalomannine.

En phase normale, le taxol et la céphalomannine ont presque le même R<sub>f</sub> et leur mélange nous donne une seule tache qui migre à peu près au même niveau que chaque standard individuellement. On peut noter la présence d'une faible tache au-dessus de celle du taxol



Rf taxol = 0,31

Rf céphalomannine = 0,32



Rf taxol = 0,41

Rf céphalomannine = 0,42

Figure 14. Chromatographie sur couche mince



standard, ce qui laisse supposer la présence d'une impureté dans notre standard. Vis-à-vis les taches du taxol et de la céphalomannine, nous retrouvons une tache jaune dans l'extrait végétal.

En phase inversée, les deux taxanes standards migrent un peu moins qu'en phase normale, mais ils sont encore très près l'un de l'autre; leur mélange nous donne une tache presque au même niveau que chacun individuellement. Il n'y a pas de deuxième tache avec le taxol standard dans ce cas-ci. Dans l'extrait végétal, vis-à-vis les standards, nous retrouvons une faible tache imprécise visible à la lumière ultraviolette.

Le but de ces analyses en CCM était de vérifier rapidement la présence de taxol dans un extrait végétal. Ce but n'a pas été atteint puisque la présence de taxol ne peut être confirmée, avec certitude, d'aucune des deux plaques de chromatographie. En phase normale, la tache jaune cache probablement le taxol et la céphalomannine non séparés, car nous pouvons voir, à la lumière u.v., un mince halo mauve au-dessus de cette tache, halo qui s'amplifie lorsqu'on ajoute du taxol à notre extrait (spiking). En phase inversée, la tache vis-à-vis le taxol et la céphalomannine est très imprécise malgré une bonne quantité de produit appliquée sur la plaque, par contre elle a l'avantage de ne pas être cachée par une autre tache, comme c'est le cas en phase normale. Il faudrait pouvoir augmenter de beaucoup la quantité d'extrait appliquée sur la plaque sans nuire à la séparation des produits.

De plus, la séparation du taxol et de la céphalomannine n'est vraiment pas adéquate dans aucun des deux modes. Stasko *et al* (1989) ont réussi à séparer le taxol de la céphalomannine par chromatographie sur couche mince multimodale en deux dimensions (plaque diphényl). Nous aurions pu continuer les essais en travaillant sur des plaques "haute résolution" en deux

dimensions et en utilisant des mélanges de solvants ternaires et quaternaires, mais nous avons préféré passer tout de suite à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), qui est une méthode analytique beaucoup plus précise permettant une meilleure séparation de produits très rapprochés.

### 5.2.3 Évaluation de la performance du système HPLC

La performance de notre système analytique ( $C_{18}$ , 4,6 mm x 150 mm x 5  $\mu$ m) a été testée en injectant un mélange standard et en calculant le nombre de plateaux théoriques (N). Ce dernier se doit d'être conforme aux données de la compagnie, c'est-à-dire environ 60 000 plateaux théoriques par mètre, pour une colonne analytique performante. Le tableau 9 nous montre les résultats obtenus. Le nombre de plateaux théoriques moyen est de 75 660 ce qui est excellent pour garantir une séparation optimale des taxanes.

**Tableau 9. Calcul du nombre de plateaux théoriques**

	TR(min)	TR(mm)	S/H	$W_{1/2}$	N	N/mètre
acétophénone	3,47	34,7	0,103	0,967	7 134	47 560
benzène	5,58	55,8	0,117	1,098	14 309	95 393
toluène	8,91	89,1	0,199	1,868	12 604	84 027

#### 5.2.4 Analyse qualitative par HPLC

Plusieurs essais pour trouver le meilleur mélange de solvants nous ont amené à choisir le mélange ternaire MeOH: MeCN: H<sub>2</sub>O (20:40:40), avec lequel la séparation du taxol et de la céphalomannine était optimale dans un temps de 15 minutes. La figure 15 A nous montre un chromatogramme type d'un extrait végétal d'aiguilles d'ifs avec le taxol (1) et la céphalomannine (2) identifiés grâce à l'injection de standards (figure 15 C), individuellement et groupés. La figure 15 B nous montre un chromatogramme du même extrait végétal à lequel on a ajouté du taxol et de la céphalomannine standards (spiking). On remarque l'augmentation de la surface des pics, ce qui est une confirmation de plus de l'identification de ces deux taxanes. Il va sans dire que cette méthode a été effectuée préalablement avec les standards individuels.

En 1989, Witherup *et al* ont fait des essais avec une colonne C<sub>18</sub> de 4,6 mm x 250 mm x 8µm et ils n'ont pas réussi à bien séparer le taxol de la céphalomannine et ce, même en gradient d'élution. Notre très bonne séparation de ces deux taxanes, en mode isocratique, est sûrement due à la grosseur des particules de notre colonne. Ces dernières étant plus fines (5 au lieu de 8 µm), elles permettent une meilleure résolution et ce, même si la longueur de la colonne n'est que de 15 cm.

#### 5.2.5 Analyse quantitative par HPLC

La présence de taxol dans les extraits végétaux d'ifs étant confirmée, et le taxol étant bien séparé de tout autre taxane, il est alors possible de le quantifier. Pour ce faire la meilleure méthode demeure la courbe standard de taxol, présentée à la figure 16.

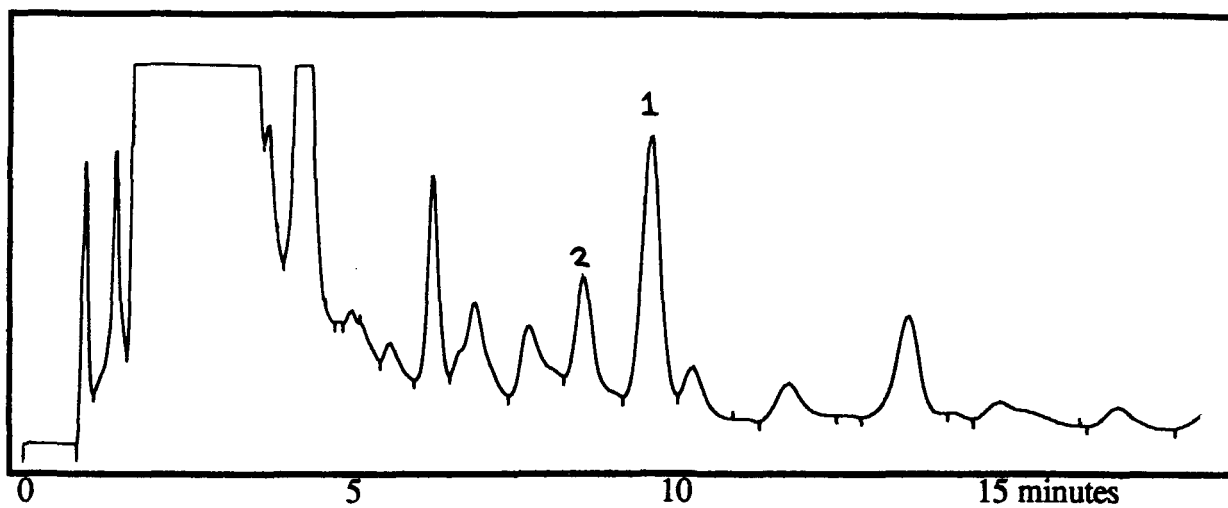


Figure 15A. Chromatogramme d'un extrait d'aiguilles d'ifs (taxol=1 et céphalomannine=2)

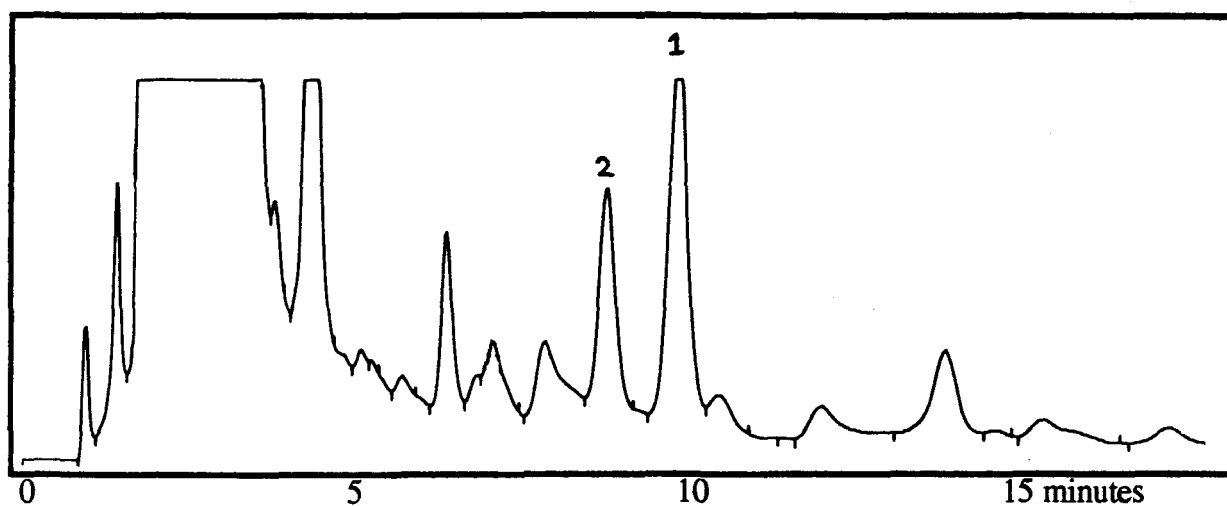


Figure 15B. Chromatogramme du même extrait (A) avec "spiking"

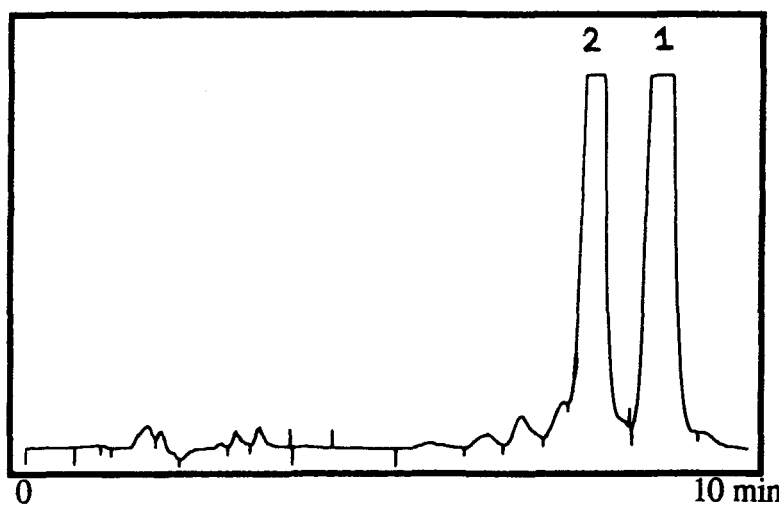


Figure 15C. Chromatogramme des standards de taxol (1) et céphalomannine (2)

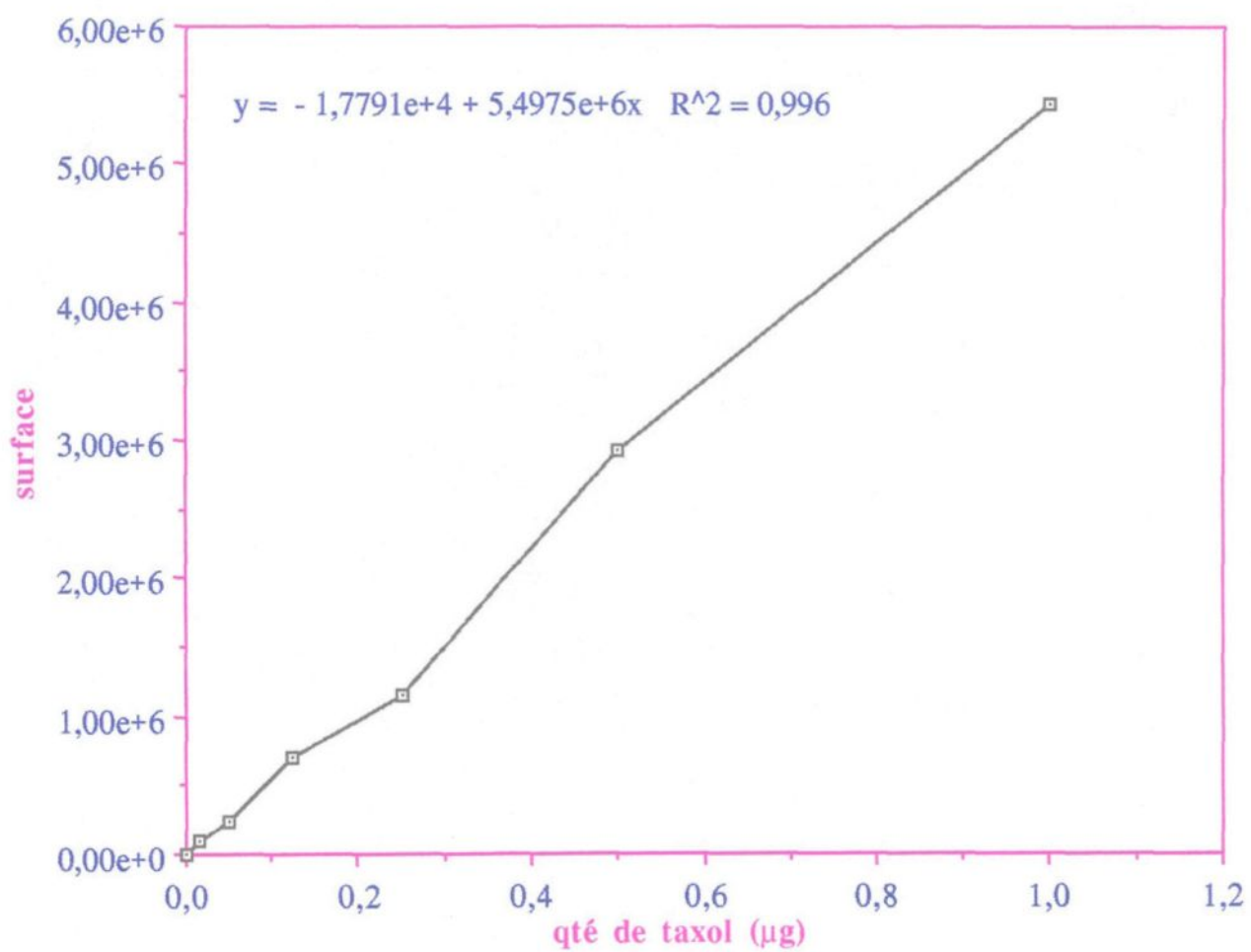


Figure 16. Courbe standard du taxol sur HPLC

Nous avons injecté 5  $\mu$ l de six standards de taxol, sur un intervalle de 15 ng à 1  $\mu$ g par injection. Nous pouvons constater que la relation surface-concentration est bien linéaire sur l'intervalle de concentration qui nous intéresse, le facteur de corrélation est de 0,996. On peut donc, sans craindre de se tromper, calculer les concentrations de taxol proportionnelles aux surfaces des pics (réponse du détecteur) obtenues.

Pour faire une double vérification de la linéarité et afin de voir l'influence de la matrice sur le signal du taxol au détecteur, nous avons effectué des ajouts standards, en ajoutant de 0 à 0,5  $\mu$ g de taxol à un extrait végétal de concentration fixe. Sur la figure 17 est tracée la courbe obtenue en comparaison avec la courbe standard. La relation linéaire est encore respectée avec un facteur de corrélation de 0,995. Le prolongement de cette droite sur l'axe des "x" nous donne la concentration du taxol présent dans l'extrait végétal, concentration qui correspond à celle trouvée par la courbe standard. Nous concluons donc que la matrice, qui est constante pour tous ces échantillons, n'interfère pas dans le signal du taxol au détecteur.

Nous pouvons alors connaître les concentrations de taxol de nos extraits végétaux par la courbe standard ou encore, maintenant que la relation linéaire a été confirmée, en les calculant directement à l'aide de l'équation de la section 2.6.3.2, méthodes qui nous donnent des résultats comparables.

#### **5.2.6 Dosage du taxol dans les aiguilles et les tiges d'ifs**

Les extraits végétaux d'aiguilles et de tiges d'ifs, à des concentrations de 20 mg/ml, ont été injectés sur HPLC (5  $\mu$ l). Le tableau 10 nous montre les unités de surface de taxol, obtenues sur les chromatogrammes de chacun des extraits, et les résultats des calculs de

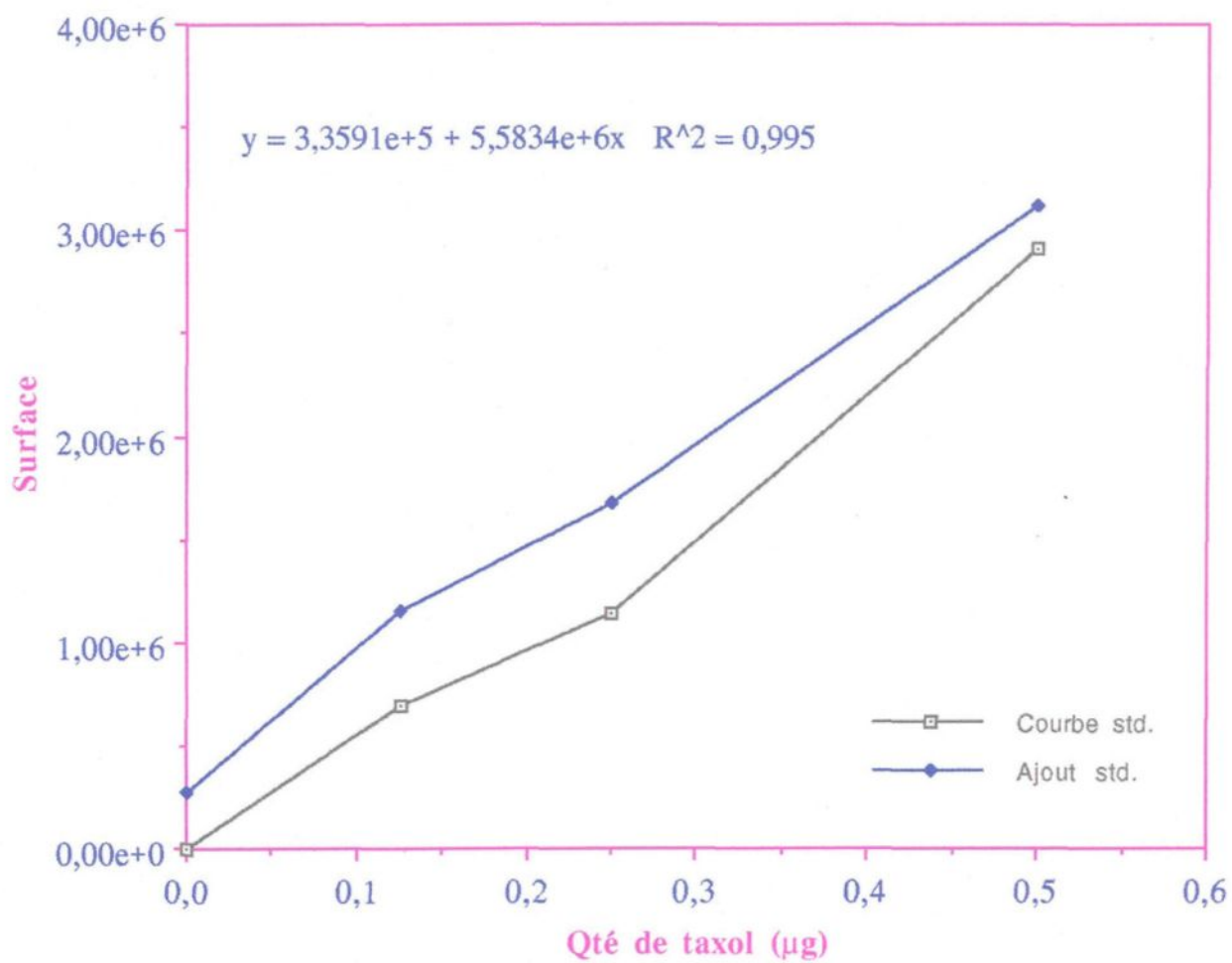


Figure 17. Courbe d'ajout standard du taxol sur HPLC

Tableau 10. Contenu en taxol des extraits végétaux

	pds. sec initial (g)	pds.résidu CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (g)	surface	% rendement (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	%rendement (pds. sec)
Aiguilles 90-11 (automne)	208,3	7,6	1 398 600 1 232 800	0,25 <sub>7</sub>	<b>0,009<sub>4</sub></b>
Tiges 90-11 (automne)	212,2	3,5	2 066 400 2 203 500	0,38 <sub>0</sub>	<b>0,006<sub>3</sub></b>
Aiguilles 91-05 (printemps)	208,5	10,5	1 488 200 1 557 200	0,27 <sub>3</sub>	<b>0,013<sub>7</sub></b>
Tiges 91-05 (printemps)	201,4	4,7	1 407 500 1 480 100	0,27 <sub>2</sub>	<b>0,006<sub>3</sub></b>
Aiguilles 91-07 (été)	214,0	10,9	1 224 600 1 235 700	0,22 <sub>7</sub>	<b>0,011<sub>6</sub></b>
Tiges 91-07 (été)	176,3	3,2	1 801 100 1 512 100	0,33 <sub>1</sub>	<b>0,006<sub>0</sub></b>



pourcentages de rendement en taxol, par rapport au poids du résidu sec, soluble dans le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), et par rapport au poids sec initial.

Les rendements de taxol obtenus à partir des aiguilles sont de l'ordre de 0,01%, ce qui est semblable au rendement obtenu à partir de l'écorce de *T. brevifolia* (0,01-0,015%). Dans une étude de Witherup *et al* (1990), sur six espèces de *Taxus*, *T. canadensis* est celle qui fournit le deuxième meilleur rendement de taxol à partir de ses aiguilles. Nos résultats sont comparables aux leurs, en ce qui a trait au rendement moyen des aiguilles, par rapport au résidu soluble ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et par rapport au poids sec, mais notre rendement en taxol des tiges est plus élevé que le leur, 0,006% contre 0,002%. Plusieurs facteurs comme le site d'échantillonnage et les différences individuelles, entre autres, peuvent expliquer ces écarts dans les résultats.

Selon Manske (1950), on devrait retrouver la même quantité d'alcaloïdes dans toutes les parties de la plante, pourtant l'on constate que, chez *T. canadensis*, ce n'est pas tout à fait le cas, le rendement en taxol étant plus faible dans les tiges. La méthode d'extraction employée s'est peut-être avérée plus efficace pour les aiguilles que pour les tiges, ou tout simplement, le comportement du taxol est moins celui d'un alcaloïde que d'un diterpène, ce dernier favorisant une concentration plus élevée de taxol dans le feuillage.

Par contre pour ce qui est de la variation saisonnière du contenu en taxol dans les aiguilles, les résultats obtenus corroborent la théorie qui soutient, qu'au printemps, la biosynthèse des produits naturels, dont les alcaloïdes, est plus active (Manske, 1950). Ce patron de taxol légèrement plus élevé au printemps qu'en automne est d'ailleurs retrouvé

aussi chez les huiles essentielles (tableau 5). Pour les tiges, le rendement en taxol est stable à 0,006%, aucune variation saisonnière n'est notée.

En résumé, nous avons vérifié que les aiguilles de *T. canadensis* de notre région, représentent une source renouvelable de taxol, puisqu'elles contiennent presque autant de taxol, par rapport au poids sec, que l'écorce de *T. brevifolia*, ce qui représente un avantage certain pour la survie de l'if. De plus, nous pensons que les récoltes printanières de *T. canadensis* peuvent présenter un léger surplus de taxol comparativement aux autres saisons; ce point mériterait d'être étudié plus précisément en faisant des analyses mensuelles de plusieurs échantillons tout au long d'une année, ce qui confirmerait ou non cette théorie. Cependant, il est bon de noter que, dans cette étude, nous n'avons pas tenu compte de la variation individuelle du contenu en taxol de chaque arbuste d'if. Cette variation, possiblement non négligeable, peut fausser nos résultats de variation saisonnière; il serait important de tenir compte de cette variable lors d'une analyse ultérieure.

#### 5.2.7 Isolation du taxol

Isoler le taxol à partir des aiguilles de *T. canadensis*, ce qui n'a jamais été fait, devient une étape plus compliquée qu'à partir de l'écorce à cause des nombreux produits pigmentaires, cireux et autres dont on doit se débarrasser, ce qui augmente les manipulations et le risque de perdre du taxol. Les extractions et les filtrations à l'hexane servent justement à éliminer, en partie, ces produits non polaires indésirables.

Lors de la chromatographie sur colonne (gel de silice), la fraction éluée avec le mélange hexane:acétone (55:45), solution transparente de coloration jaune verdâtre, est celle dans

laquelle nous avons retrouvé la majorité du taxol (90%). Dans cette solution, nous avons noté la présence d'un précipité granuleux jaune pâle (178,3 mg) dont nous ne connaissons pas l'identité; sur HPLC ce précipité se sépare en deux produits, l'un très polaire (T.R.2,03 min) et l'autre non polaire (T.R.43,35 min).

L'isolation du taxol, à partir de la fraction enrichie, a nécessité 20 injections sur le système semi-préparatif de chromatographie liquide à haute performance (N= 45 000). Tous les pics bien séparés ont été récoltés, dont le taxol. Dans le tableau 11 nous retrouvons les données pondérales de notre isolation du taxol.

**Tableau 11. Pourcentage de rendement en taxol**

Poids sec initial (g)	Poids taxol isolé (mg)	% rendement taxol (poids sec)
410,7	11,1	0,003

Après la lyophilisation nous avons récupéré 11,1 mg de cristaux de taxol, légers et d'une coloration beige-jaune pâle. Le rendement obtenu, par rapport au poids initial d'aiguilles séchées, est faible. Nous aurions espéré récupérer une plus grande quantité de taxol, s'approchant plus du contenu maximal des aiguilles (0,01%). Les pertes se sont sûrement produites lors de nos injections en HPLC semi-préparatif. Les multiples injections ont occasionné une perte non négligeable du matériel organique, ce qui aurait pu être minimisé par l'emploi d'une colonne préparative, de diamètre plus gros, permettant d'injecter de plus grands volumes sans saturer la colonne. Une deuxième isolation du taxol a été effectuée, sur le même système semi-préparatif, sans permettre d'amélioration du rendement.

## 5.2.8 Confirmations de l'identification du taxol

### 5.2.8.1 Point de fusion

La quantité de taxol obtenue est néanmoins suffisante pour effectuer les tests d'identification. Le premier de ces tests nous a donné un point de fusion de  $164,8 \pm 0,8$  °C pour le taxol alors que la valeur retrouvée dans la littérature se situe autour de 213-216 °C (Wani *et al*, 1971). Cet écart était sûrement synonyme de la présence d'impuretés dans le taxol isolé; d'ailleurs la coloration des cristaux laissait présager cela. Tout au long de l'isolation du taxol par HPLC semi-préparatif, la coloration verdâtre devait être éliminée en rinçant abondamment la colonne entre chaque injection avec un mélange concentré en acétonitrile. Si nous avions travaillé en gradient d'élution, ce problème se serait réglé de lui-même à chaque injection; une concentration maximale d'acétonitrile vers la fin de l'analyse aurait nettoyé le système. Idéalement, l'on devrait pouvoir éliminer les pigments de l'extrait végétal, sans perdre de taxanes, avant de faire l'analyse en HPLC.

Il peut donc y avoir eu contamination du taxol par ces pigments et une recristallisation s'imposait, malgré la faible quantité de matériel, afin de confirmer l'identification. La recristallisation du taxol a permis de récupérer 8,6 mg de cristaux, moins colorés et moins légers, dont le point de fusion était de  $207,3 \pm 0,8$  °C, valeur beaucoup plus près de celle de la littérature.

#### 5.2.8.2 Spectre infrarouge

Le spectre infrarouge du taxol est montré à la figure 18. La bande à  $2\,362\text{ cm}^{-1}$  ne provient pas du taxol, c'est une impureté présente dans le système FTIR employé. Le tableau 12 nous indique les bandes caractéristiques des principaux groupements fonctionnels de la molécule du taxol, retrouvées sur le spectre infrarouge. On remarque que les groupements cétonique et acétates de la molécule se retrouvent au même endroit à  $1\,735\text{ cm}^{-1}$ .

#### 5.2.8.3 Spectre u.v.-visible

La figure 19 présente le spectre u.v.-visible du taxol, mesuré dans le méthanol. L'absorbance maximale du taxol est de 2,529 à 228 nm, cette longueur d'onde correspond à celle retrouvée dans la littérature (Wani *et al*, 1971). La présence, dans la molécule du taxol, de trois groupements "phényles" aromatiques explique cette absorption vers 230 nm. La concentration du taxol étant de  $1,17 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ , le coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) est donc de  $21\,572\text{ L cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ . On remarque aussi, sur le spectre, un léger pic d'absorbance vers 270 nm.

#### 5.2.8.4 Résonance magnétique nucléaire (RMN du proton)

C'est la technique permettant la meilleure confirmation de la structure d'un produit naturel comme le taxol. La figure 20 nous montre le spectre RMN-H du taxol isolé et le tableau 13 détaille les déplacements chimiques des divers atomes d'hydrogène, la multiplicité et les constantes de couplage. Toutes ces données sont comparées à celles retrouvées dans la littérature.

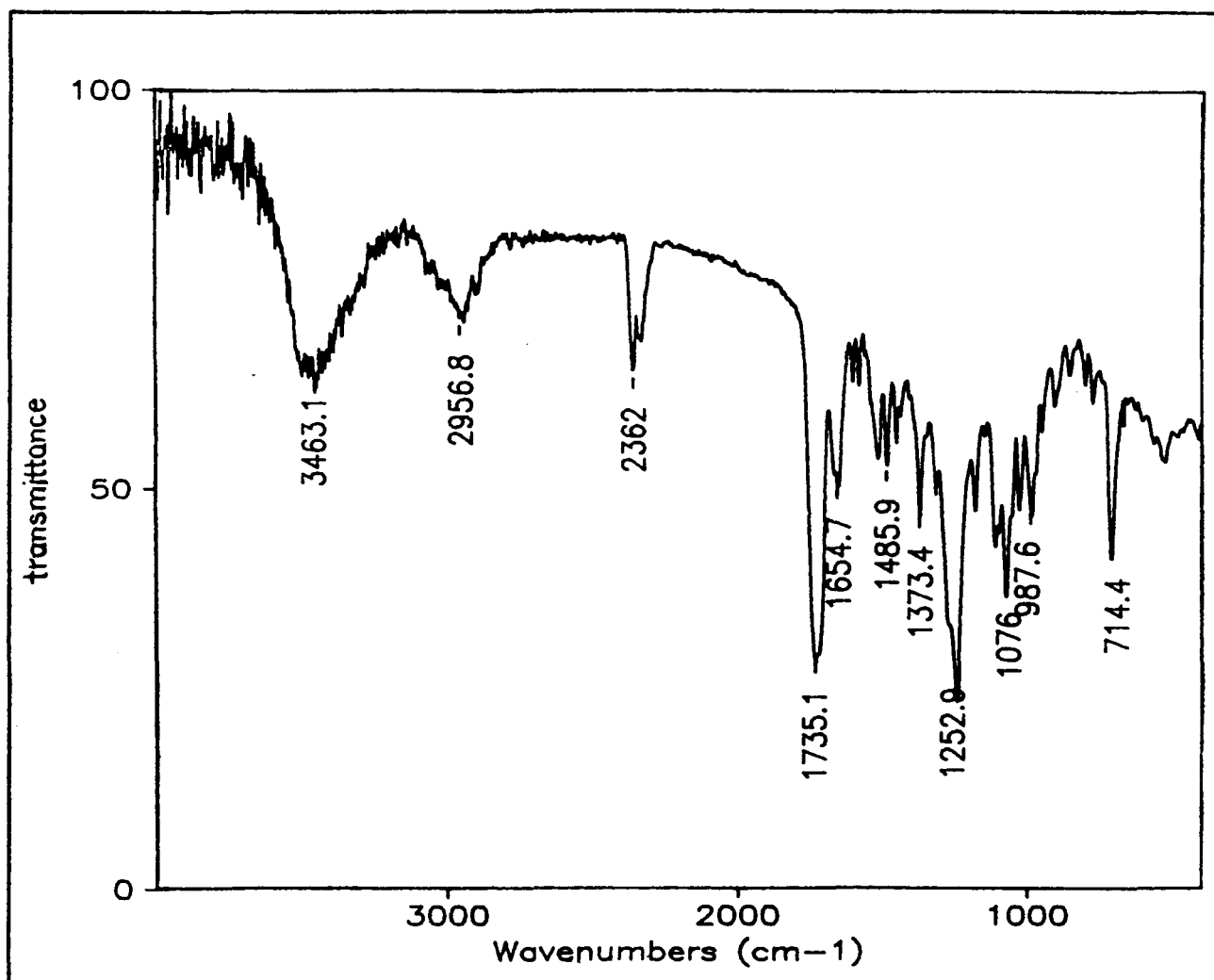


Figure 18. Spectre infrarouge du taxol

Tableau 12. Analyse du spectre infrarouge du taxol

Bande (cm <sup>-1</sup> )	Groupe ment fonctionnel
3 500-3 300	O—H
	N—H
2 957	C—H (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH)
1 735	C = O (ester et cétone)
1 655	C = C (alcène)
	N—H (amide)
1 486	C = C (aromatique)
1 373	C—H (méthyl)
1 253	C—O (ester)
1 076	C—O (alcool)
988	C—O (alcool)
714	C—H (benzène)

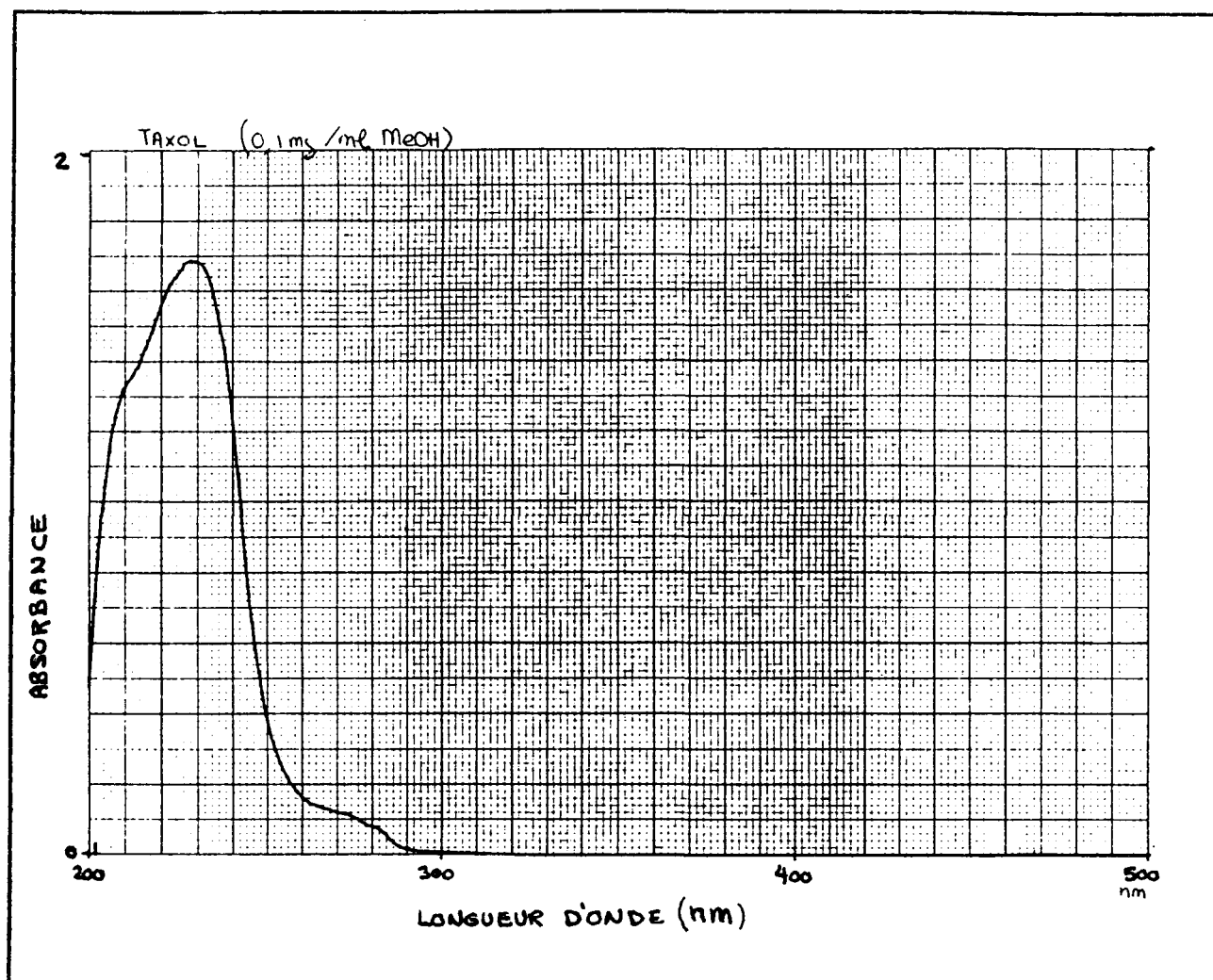


Figure 19. Spectre u. v.-visible du taxol



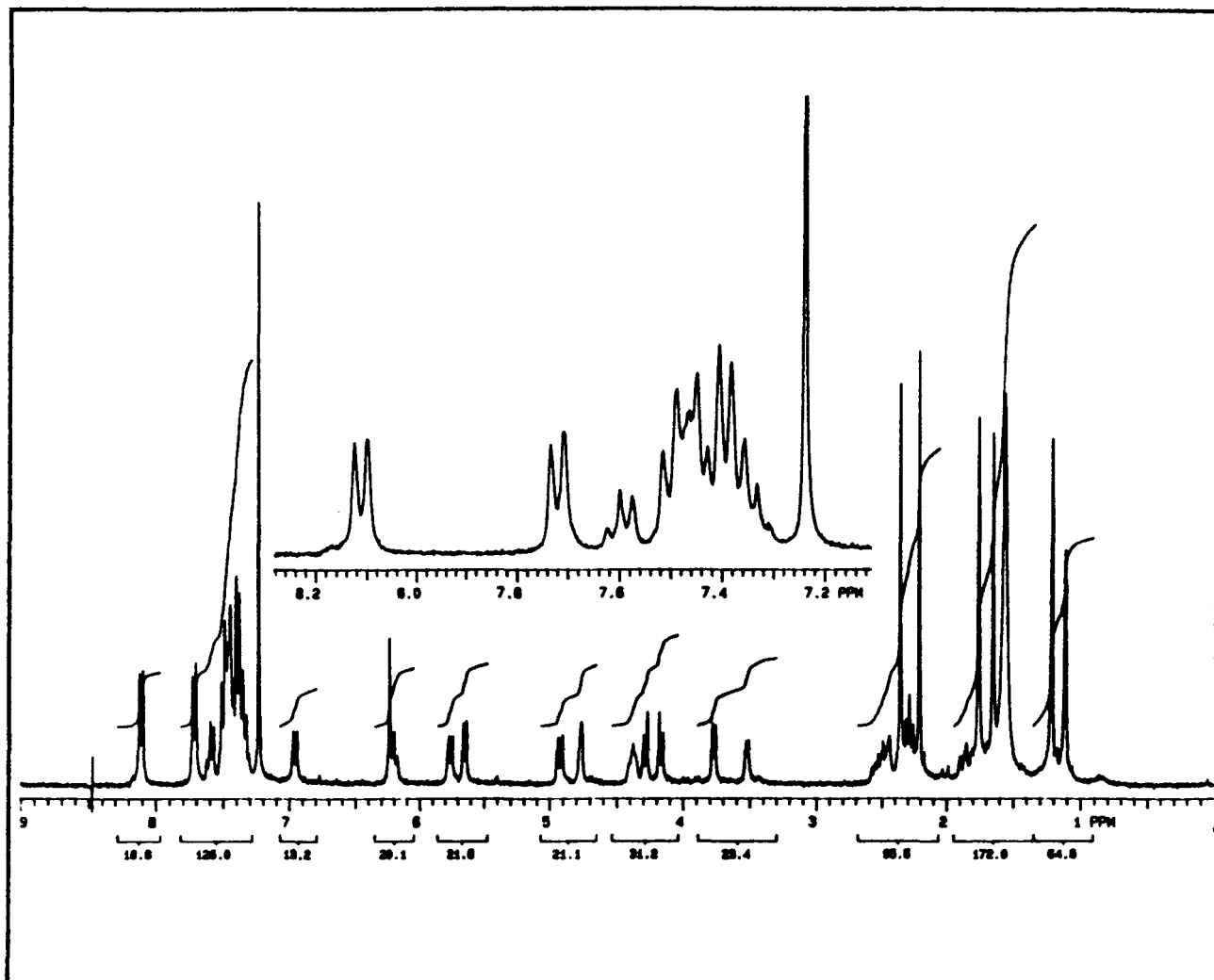


Figure 20. Spectre RMN-H du taxol

Tableau 13. Analyse du spectre RMN-H <sup>a</sup> du taxol et d'un taxane inconnu

H	TAXOL <sup>b</sup>	LITTÉRATURE <sup>c</sup>	INCONNU <sup>d</sup>
2	5,652 (d); J = 6,8	5,64 (d); J = 7	5,728 (d); J = 5,9
3	3,772 (d); J = 6,6	3,78 (d); J = 7	3,024 (d); J = 5,9
5	4,929 (dd); J = 8,1 et 0,8	4,92 (dd); J = 8 et 2	4,932 (d); J = 8,5
6 a	1,820 (m)	1,82 (m)	1,911 (m)
b	2,454 (m)	2,50 (m)	2,515 (m)
7	4,410 (m)	4,38 (m)	4,438 (m)
9	-	-	4,438 (d)
10	6,243 (s)	6,21 (s)	6,167 (d); J=11,6
13	6,208 (t); J = 5,2	6,20 (t); J = 8	6,147 (m)
14	2,299 (m)	2,25 (m)	2,158 (m)
16	1,220 (s)	1,24 (s)	1,911 (s)
17	1,122 (s)	1,12 (s)	1,792 (s)
18	1,770 (s)	1,78 (s)	1,654 (s)
19	1,662 (s)	1,66 (s)	1,224 (s)
20 a	4,171 (d); J = 8,5	4,16 (d); J = 8	4,137 (d); J=8,4
b	4,289 (d); J = 8,3	4,28 (d); J = 8	4,247 (d); J=8,3
2'	4,772 (s large)	4,76 (d); J = 3	-
3'	5,767 (dd); J = 9,3 et 1,9	5,76 (dd); J = 9 et 3	-
OAc	2,223 (s) 2,368 (s)	2,20 (s) 2,38 (s)	2,117 (s) 2,170 (s) 2,258 (s)
2-OBz	8,125 (d) 7,4 (m)	8,11 (dd) 7,4 (m)	8,073 (dd) 7,588 (t) 7,479 (t)
3' Ph	7,4 (m)	7,36	-
3'-NBz	7,734 (dd) 7,4 (m)	7,7 (dd) 7,4 (m)	- -
NH	6,961 (d); J = 9	6,97 (d); J = 9	-
2'-OH	3,532 (d)		-

a: les déplacements chim.( $\delta$ ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage (J) en hertz

b: voir la structure du taxol à la figure 13.

c: Miller, 1980; Sénilh *et al*, 1984; Kingston *et al*, 1982.

d: voir la structure proposée à la figure 21

Par l'intégration nous retrouvons 49 atomes d'hydrogène sur le spectre RMN, il ne manque que deux hydrogènes provenant de deux groupements hydroxyles, soit ceux en position 1 et 7, il est possible que la résonance de ces OH ait été trop faible pour qu'ils soient intégrés. Celui en position 2' se présente sur le spectre comme un doublet mal défini à 3,53 ppm.

Tous les autres pics sont conformes à ce que l'on retrouve dans la littérature (Miller, 1980; Kingston *et al*, 1982; Sénilh *et al*, 1984). On peut noter la présence, non expliquée, d'un singulet large à 1,5 ppm, dont l'intégration nous donne une valeur de 9 hydrogènes, ce pic provient probablement d'impuretés présentes dans le taxol isolé ou encore d'un solvant.

Les quatre groupements "méthyles" de la molécule (16, 17, 18, 19) sont retrouvés comme singulets entre 1,12 et 1,77 ppm. Les deux groupements "acétates" sont aussi des singulets à 2,22 et 2,36 ppm. Les méthyles des acétates sont à plus bas champ que les autres à cause de l'électronégativité de l'oxygène qui les déblindent un peu, ils deviennent donc plus faciles à exciter. L'hydrogène en position 5 semble être un doublet dédoublé mal défini, car il subit l'influence des deux hydrogènes non équivalents en 6, c'est un système ABX. Les pics représentant les hydrogènes en 6 sont de petits multiplets, étant couplés l'un avec l'autre et aussi avec les hydrogènes en 5 et en 7. Cet hydrogène en 7 se présente sous la forme d'un multiplet à 4,41 ppm, soit à un champ légèrement plus élevé que celui en 5. Théoriquement H7 devrait être un doublet dédoublé qu'il aurait été possible de voir avec un appareil doté d'une plus grande résolution.

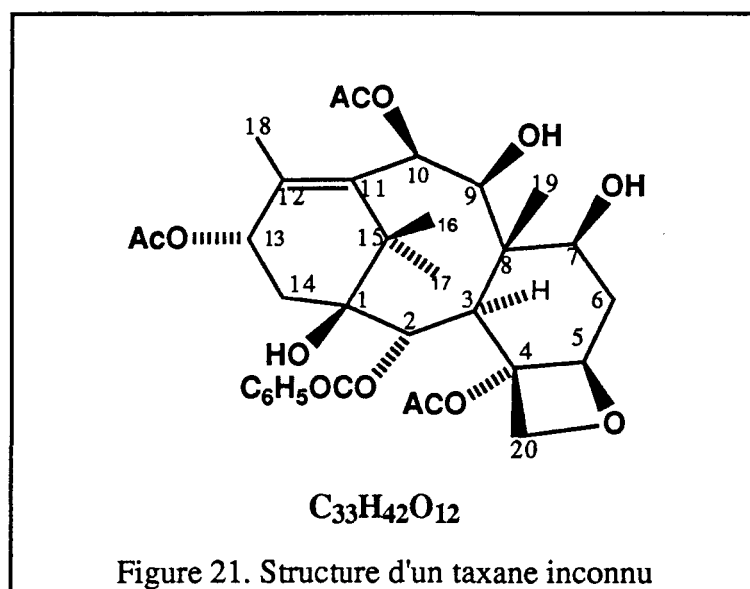
L'hydrogène lié au carbone 13 est probablement un triplet dont l'une des branches est cachée par le singulet de H10, ou encore un multiplet. Ce H13 est couplé aux deux hydrogènes non équivalents en position 14, il devrait donc apparaître comme un doublet dédoublé théoriquement. Dans la littérature cet H est aussi un triplet. Les hydrogènes en position 14 apparaissent comme un petit multiplet, alors qu'avec une meilleure résolution il devrait être possible de voir un doublet dédoublé. En position 20, les deux hydrogènes ne sont pas équivalents et ils apparaissent chacun comme un doublet dû à leur influence réciproque. L'hydrogène en 2' est un singulet large (doublet mal défini) à 4,77 ppm couplé à celui en 3'. À cette dernière position, nous avons un doublet dédoublé (système ABX), cet hydrogène est couplé à celui en 2' ( $J=1,9$ ) et aussi à l'hydrogène lié à l'azote ( $J=9,3$ ).

Les quinze hydrogènes des groupements "phényls" sont tous à bas champ comme il se doit. Les deux hydrogènes ortho du phényl en position 2 sont à 8,12 ppm; c'est le phényl le plus déblindé à cause du groupement "ester". Les hydrogènes ortho du phényl terminal (3'NBz) sont à 7,73 ppm, alors que tous les hydrogènes du phényl en 3' sont dans le multiplet à 7,4 ppm.

### 5.2.9 Identification d'un taxane inconnu (RMN-H)

Dans le tableau 13 nous retrouvons les déplacements chimiques des hydrogènes de ce produit inconnu, qui est élué environ cinq minutes avant le taxol. Par comparaison avec le spectre de ce dernier, on note l'absence des hydrogènes de la chaîne latérale et la présence d'un acétate de plus que le taxol. De plus, dans le multiplet de H7 se trouve un doublet correspondant à l'hydrogène du carbone 9 qui est couplé à H10, qui est lui aussi un doublet. Il n'y a donc pas de groupement cétonique en position 9 mais plutôt un groupement

hydroxyle puisque le déplacement chimique est de 4,43 ppm, cet OH serait d'ailleurs en position  $\beta$ . Nous proposons donc la structure suivante pour ce taxane inconnu, dont nous n'avons pas retrouvé l'identification dans la littérature:



### 5.2.10 Réactivité du taxol

Le taxol possède trois groupements hydroxyles qui n'ont pas tous la même réactivité. Une étude de Mellado *et al* (1984) a démontré que le site préférentiel d'acétylation était en position 2', les autres positions étant soit plus encombrée (7), soit trop encombrée et alors non réactive aux conditions normales d'acétylation (OH tertiaire en 1). Par contre il est possible d'acétyler la position 7 en ajoutant un excès d'anhydride acétique (deutéié dans notre cas) comme nous avons fait ici.

Les résultats de l'analyse RMN-H du taxol acétylé et deutéré sont détaillés au tableau 14 en comparaison avec le taxol et les valeurs trouvées dans la littérature pour le 2',7-

Tableau 14. Analyse du spectre RMN-H <sup>a</sup> du 2',7-diacétyltaxol

H	TAXOL <sup>b</sup>	2',7-DIACÉTYLTAXOL	LITTÉRATURE <sup>c</sup>
2	5,652 (d); J=6,8	5,666 (d); J=8	5,60 (d); J=7
3	3,772 (d); J=6,6	3,925 (d); J=6,6	3,87 (d); J=7
5	4,929 (dd); J=8,1 et 0,8	4,946 (dd); J=9,6 et 2,2	4,90 (d); J=9
6 a	1,820 (m)	1,820 (m)	2,2 (m)
b	2,454 (m)	2,594 (m)	
7	4,410 (m)	5,564 (dd); J=6,9 et 10,5	5,53 (m)
10	6,243 (s)	6,234 (s)	6,18 (s)
13	6,208 (t); J=5,2	6,203 (t); J=8,8	6,15 (t); J=8
14	2,299 (m)	2,162 (dd); J=14,7 et 10 2,340 (dd); J=15,2 et 3,2	2,55 (m)
16	1,220 (s)	1,189 (s)	1,14 (s)
17	1,122 (s)	1,142 (s)	1,09 (s)
18	1,770 (s)	1,788 (s)	1,74(s)
19	1,662 (s)	1,960 (s)	1,91(s)
20 a	4,171 (d); J=8,5	4,166 (d); J=8,5	4,11 (d); J=8
b	4,289 (d); J=8,3	4,306 (d); J=8,4	4,25 (d); J=8
2'	4,772 (s large)	5,540 (d); J=3,4	5,50 (d); J=3
3'	5,767 (dd); J=9,3 et 1,9	5,931 (dd); J=9,1 et 3,2	5,89 (dd); J=3 et 9
OAc	2,223 (s) 2,368 (s)	2,141 (s) 2,416 (s)	1,96 (s) 2,08 (s) (6H) 2,36 (s)
2-OBz	8,125 (d) 7,4 (m)	8,105 (d) 7,699 (t) 7,496 (t)	8,06 (dd); J=1 et 7 7,52 (t); J=7 7,45 (t); J=7
3' Ph	7,4 (m)	7,4 (m)	7,3 (m)
3'-NBz	7,734 (dd) 7,4 (m)	7,735 (d) 7,5 (t) 7,4 (m)	7,67 (dd); J=1 et 7 7,45 (t); J=7 7,33 (m)
NH	6,961 (d); J=9	6,889 (d); J=9,3	6,83 (d); J=9
2'-OH	3,532 (d)	-	-

a: les déplacements chim.( $\delta$ ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage (J) en hertz

b: voir la structure du taxol à la figure 13.

c: Kingston *et al*, 1982; Mellado *et al*, 1984.

diacétyltaxol non deutéré (Kingston *et al*, 1982; Mellado *et al*, 1984). Les différences majeures dans la résonance des protons du taxol et du taxol acétylé résident aux positions 2' et 7: le déplacement chimique de l'hydrogène en 2' varie de 4,77 à 5,54 ppm pour le taxol acétylé et celui de l'hydrogène en 7 varie de 4,41 à 5,56 ppm. Il est normal que ces hydrogènes se retrouvent à plus bas champ chez le taxol acétylé à cause de l'influence des groupements esters, plus électronégatifs que les hydroxyles, il y a donc confirmation de la présence d'acétates en 2' et en 7. Ces acétates, étant deutérées, ne sont pas visibles sur le spectre RMN-H.

Nous avons facilement détecté le 2',7-diacétyltaxol en HPLC avec un détecteur à radioactivité et ce, même en utilisant de faibles quantités.

## CHAPITRE 6

## CONCLUSION



L'huile essentielle de *T. canadensis*, qui est un conifère non résineux et peu aromatique, contient surtout des dérivés d'hydrocarbures aliphatiques, alcools, cétones et aldéhydes. À l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, 31 produits volatils ont pu être identifiés dont l'oct-1-én-3-ol qui est le produit majeur, à 40%. L'huile essentielle est extraite en faible quantité (0,03% de rendement) et, contrairement aux autres conifères, contient peu de monoterpènes; ses faibles qualités aromatiques découlent peut-être de ce dernier fait.

La composition de l'huile varie selon la saison car on retrouve 24% de trans-hex-2-én-1-al au printemps et seulement 1,5% en automne; d'autres variations plus mineures sont aussi notées. Il semble donc y avoir une biosynthèse plus active de certains produits au printemps, avec la présence des nouvelles pousses, le rendement en huile est d'ailleurs légèrement plus élevé au printemps qu'en automne. Nos résultats indiquent aussi qu'un temps de distillation de 90 minutes est optimum pour l'extraction de l'huile essentielle et qu'il est possible d'augmenter la quantité de certains produits (solubles en partie dans l'eau) en jouant sur la polarité des solvants.

Toutes ces données mériteraient d'être plus approfondies en faisant des études détaillées sur plusieurs individus de *T. canadensis*. Il serait peut-être alors possible de trouver un lien entre le patron d'huile essentielle et la quantité de taxol présente dans l'arbuste.

L'analyse des glycosides de *T. canadensis* nous a permis de constater qu'il y avait trois fois plus de produits volatils liés, sous forme glycosides, dans l'if (0,09% de rendement) que de produits volatils libres (0,03% de rendement). Sur les 34 aglycones séparés par chromatographie en phase gazeuse, 19 sont aussi présents dans l'huile essentielle dont les

produits majeurs l'oct-1-én-3-ol (40%) et le 3,5-diméthoxyphénol (26%). Par contre, ce dernier est très peu abondant sous forme libre (<1%). Selon nos résultats, l'enzyme cellulase serait supérieure à la  $\beta$ -glucosidase pour libérer un plus large éventail d'aglycones.

Étant donné que les produits volatils de l'if se trouvent en bonne partie sous forme liée, on peut penser que les taxanes pourraient aussi se retrouver liés à des sucres dans la plante. Ce point mériterait d'être vérifié car, si positif, il permettrait d'augmenter les quantités de taxol disponible.

Un des objectifs de ce travail était de rechercher la présence de taxol dans le *Taxus canadensis* régional. Nous avons confirmé sa présence dans les aiguilles d'ifs avec un rendement de 0,01%, ce qui est semblable à la quantité présente dans l'écorce de *T. brevifolia* (0,01-0,015%). Cependant notre procédure d'isolation n'a pas permis de récupérer ce maximum de taxol présent dans les aiguilles, seulement 0,003% de taxol a pu être isolé. L'étape ultérieure serait de travailler à améliorer la méthode pour que les aiguilles d'ifs puissent remplacer avantageusement l'écorce comme source de taxol et ce, afin d'éviter la disparition du genre *Taxus*. La présence de la céphalomannine a aussi été confirmée ainsi que celle d'un taxane inconnu dont nous proposons la structure. Le système HPLC utilisé s'est avéré très efficace pour la séparation des taxanes en un temps de 15 minutes.

L'étude du contenu en taxol des diverses parties de l'arbuste et sa variation selon la période de l'année nous a permis de connaître la tendance globale du comportement de ce protoalcaloïde diterpénique: les aiguilles d'ifs semblent contenir plus de taxol que les tiges et le contenu en taxol décroît légèrement du printemps à l'automne. Par contre, nous n'avons

pas tenu compte de la variation individuelle du contenu en taxol de chaque arbuste, ce qui peut fausser nos résultats. Ces derniers gagneraient à être appuyés par une étude statistique.

Notre étude de *Taxus canadensis* de la région du Saguenay--Lac-St-Jean nous a donc permis de mieux connaître les produits naturels de cet arbuste et de tirer quelques conclusions sur chacun des points étudiés. Cependant, elle ne permet pas de relier précisément ses différents produits naturels entre eux.

Nous espérons que ce travail préliminaire suscitera assez d'intérêt pour rendre les gens conscients d'un dilemme très actuel en ce qui regarde l'if et le taxol qu'il contient. La nature nous fournit gracieusement des substances ayant le pouvoir de nous aider à vivre, mais on peut se demander s'il est bien sage de détruire la source première de ces substances dans la hâte à combler nos besoins immédiats? On ne pourra plus prolonger aucune vie humaine quand l'if aura disparu suite à notre appétit trop vorace et à notre manque de vision à long terme.

Ce travail s'inscrit modestement dans la ligne de pensée qui veut prendre le temps de bien connaître et d'appivoiser cette ressource végétale qu'est l'if...

## BIBLIOGRAPHIE

- Ackermann, I.E., Banthorpe, D.V., Fordham, W.D., Kinder, J.P., Poots, I. 1989.  $\beta$ -glucosides of aroma components from petals of *Rosa* species: assay, occurrence and biosynthetic implications. J. Plant Physiol., 134: 567-572.
- Adams, R.P. 1989. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press, U.S.A. 302 p.
- Allison, T.D. 1991. Variation in sex expression in Canada yew (*Taxus canadensis*). Am. J. Bot., 78 (4): 569-578.
- Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V., Francis, M.J.O. 1972. Chemical reviews, 72: 115.
- Bauer, K., Garbe, D. 1985. Common fragrance and flavor materials. VCH, Germany. 213 p.
- Belitz, H.D., Grosch, W. 1987. Food chemistry. Springer-Verlag, Berlin. 774 p.
- Borman, S. 1991. Scientists mobilize to increase supply of anticancer drug taxol. C & EN, sept. 2: 11-18.
- Bourbeau, G. 1954. Étude chimique et pharmacologique de *Taxus canadensis*. Laval Médical, 19: 511-550.
- Chamberlain, C.J. 1966. Gymnosperms, structure and evolution. Dover Publications, New-York.
- Chialva F., Gabri, G. 1987. Headspace versus classical analysis. p.123-154. In: Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, New-York.

- Denis, J.-N., Greene, A., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Mangatal, L., Potier, P. 1988. A highly efficient , practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.*, 110: 5917-5919.
- Fleurentin, J., Pelt J.-M. 1990. Les plantes médicinales. *La Recherche*, 21 (222): 811-818.
- Francis, M.J.O., Allcock, C. 1969. Geranyl- $\beta$ -D-glucoside: occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochemistry*, 8: 1339-1347.
- Guénard, D., Blechert, S. 1990. *Taxus* alkaloids. p.195-238. In: *The Alkaloids* (edited by A. Brossi), vol. 39. Academic Press, New-York.
- Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Potier, P., Denis, J.-D., Greene, A. 1990. À la recherche de nouvelles substances anticancéreuses. *La Recherche*, 21 (226): 1427-1429.
- Guenther, E. 1948. *The essential oils*, vol. 1. Krieger Publishing Co., Florida. 427 p.
- Guéritte-Voegelein, F., Guénard, D., Potier, P. 1987. Taxol and derivatives: a biogenetic hypothesis. *J. Nat. Prod.*, 50 (1): 9-18.
- Guignard, J.L., Cosson, L., Henry, M. 1985. *Abrégé de phytochimie*. Masson, Paris. 224 p.
- Harris, D.C. 1982. *Quantitative chemical analysis*. W.H. Freeman and Co., New-York. 748 p.
- Horwitz, S.B., Schiff, P.B., Fant, J. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277: 665-667.
- Jennings, W., Shibamoto, T. 1980. *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*. Academic Press, New-York. 472 p.

- Khan, N.U., Parveen, N. 1987. The constituents of the genus *Taxus*. Journal of Scientific and Industrial Research, 46: 512-516.
- Kingston, D.G.I., Hawkins, D.R., Ovington, L. 1982. New taxanes from *Taxus brevifolia*. J. Nat. Prod., 45 (4): 466-470.
- Koedam, A. 1987. Some aspects of essential oil preparation. p.13-27. In: Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, New-York.
- Lessard, M., Collin, G.J., Garneau, F.X. 1991. Caractérisation des produits naturels, extraits du bois de *Thuja occidentalis* L. Rapport LASÈVE, UQAC. 53 p.
- Lythgoe, B. 1968. The *Taxus* alkaloids. p.597-626. In: The Alkaloids (edited by R.H.F. Manske), vol.10. Academic Press, New-York.
- Manske, R.H.F. 1950. Sources of alkaloids and their isolation. p.1-90. In: The Alkaloids (edited by R.H.F. Manske), vol.1. Academic Press, New-York.
- Marie-Victorin, frère. 1964. Flore laurentienne. Les Presses de l'Univ.de Montréal. 925 p.
- Mayo, D.W., Pike, R.M., Butcher, S.S., Trumper, P.K. 1991. Microscale techniques for the organic laboratory. John Wiley & Sons Inc., U.S.A. 285 p.
- Mellado, W., Magri, N.F., Kingston, D.G.I., Garcia-Arenas, R., Orr, G.A., Horwitz, S. 1984. Preparation and biological activity of taxol acetates. Biochemical and Biophysical research comm., 124 (2): 329-336.
- Miller, R.W. 1980. A brief survey of *Taxus* alkaloids and other taxane derivatives. J. Nat. Prod., 43 (3): 425-437.
- Pasto, D.J., Johnson, C.R. 1979. Laboratory text for organic chemistry. Prentice-Hall Inc., New-Jersey. 542 p.

- Pénoël, D., Franchomme, P., Jollois, R., Mars, J. 1990. L'aromathérapie exactement. Jollois, Limoges. 447 p.
- Rossion, P. 1991. If contre cancer. Science et Vie, No. 882: 28-30.
- Salles, C., Essaied, H., Challier, P., Jallageas, J.C., Crouzet, J. 1987. Bioflavor
- Sandra, P. Bicchi, C. 1987. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, New-York. 435 p.
- Sénilh, V., Blechert, S., Colin, M., Guénard, D., Picot, F., Potier, P., Varenne, P. 1984. Mise en évidence de nouveaux analogues du taxol extraits de *Taxus baccata*. J. Nat. Prod., 47 (1): 131-137.
- Sénilh, V., Guéritte, F., Guénard, D., Colin, M., Potier, P. 1984. Hémisynthèse de nouveaux analogues du taxol. Étude de leur interaction avec la tubuline. C. R. Acad. Sc. Paris, 299 (série II, no.15): 1039-1043.
- Shibamoto, T. 1987. Retention indices in essential oil analysis. p.259-270. In : Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, New-York.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. 1981. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, U.S.A. 442 p.
- Skoog, D.A. 1985. Principles of instrumental analysis. Saunders College Publishing, U.S.A. 947 p.
- Stahl-Biskup, E. 1987. Monoterpene glycosides, state-of-the-art. Flavour and Fragrance Journal, 2: 75-82.
- Stasko, M.W., Witherup, K.M., Ghiorzi, T.J., McCloud, T.G., Look, S., Muschik, G.M., Issaq, H.J. 1989. Multimodal thin layer chromatographic separation of taxol and related compounds from *Taxus brevifolia*. J. Liq. Chromatogr., 12 (11): 2133-2143.

- Still, W.C., Kahn, M., Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, 43 (14): 2923-2925.
- Svendsen, A.B., Merks, I.J.M. 1989. A simple method for screening of fresh plant material for glycosidic bound volatile compounds. *Planta Medica*, 55: 38-40.
- Svendsen, A.B., Merks, Y.M. 1990. Glycosidic bound volatile compounds in some coniferae. *J. Ess. Oil Res.*, 2: 71-72.
- Svendsen, A.B., Merks, Y.M. 1990. Glycosidically bound volatile aliphatic and aromatic alcohols- a common feature in the vegetable kingdom?. *J. Ess. Oil Res.*, 2: 207-208.
- Svendsen, A.B., Van Den Dries, J.M.A., 1989. A simple method for detection of glycosidic bound monoterpenes and other volatile compounds occurring in fresh plant material. *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 59-61.
- Tabacchi, R., Garnero, J. 1987. Introduction to essential oil analysis. p.1-11. In: *Capillary gas chromatography in essential oil analysis*. Huethig, New-York.
- Torsell, K.B.G. 1983. *Natural product chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Great Britain. 401 p.
- Vidensek, N., Lim, P., Campbell, A., Carlson, C. 1990. Taxol content in bark, wood, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *J. Nat. Prod.*, 53 (6): 1609-1610.
- Von Rudloff, E. 1961. Gas-liquid chromatography of terpenes. IV. The analysis of volatile oil of the leaves of eastern white cedar. *Can. J. Chem.*, 39: 1200-1206.
- Von Rudloff, E. 1967. Chemosystematic studies in the genus *Picea* I. Introduction. *Can. J. Bot.*, 45: 891-901.



- Von Rudloff, E. 1967. Chemosystematic studies in the genus *Picea*. II. The leaf oil of *Picea glauca* and *P. mariana*. Can. J. Bot., 45: 1703-1714.
- Von Rudloff, E. 1972. Seasonal variation in the composition of the volatile oil of the leaves, buds and twigs of white spruce (*Picea glauca*). Can. J. Bot., 50: 1595-1602.
- Von Rudloff, E., Hunt, R.S. 1974. Chemosystematic studies in the genus *Abies*. I. Leaf and twig oil analysis. Can. J. Bot., 52: 477-487.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc., 93 (9): 2325-2327.
- Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, M.W., Ghiorzi, T.J., Muschik, G.M. 1990. *Taxus* ssp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. J. Nat. Prod., 53 (5): 1249-1255.
- Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, M.W., McCloud, T.G., Issaq, H.J., Muschik, G.M. 1989. High performance liquid chromatographic separation of taxol and related compounds from *Taxus brevifolia*. J. Liq. Chromatog., 12 (11): 2117-2132.
- Yost, R.W., Ettre, L.S., Conlon, R.D. 1980. Practical liquid chromatography. An introduction. Perkin-Elmer, U.S.A. 255 p.