

PRODUCTION DE TAXOL A PARTIR DES CALS DE L'IF COMMUN *TAXUS BACCATA* L.

ABDELLATIF Nabila^{1*}, AIZER Nassima¹, SAIDI Fairouz¹ et CHAOUIA Cherifa²

1. Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé. Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida 1, B.P. 270, route de Soumaa ; Blida, Algérie

2. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales. Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida 1, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie

Reçu le 28/10/2018, Révisé le 12/12/2018, Accepté le 24/12/2018

Résumé

Description du sujet : *Taxus baccata* L. communément appelé l'if commun, regroupe les arbres connus par leur contenu en taxanes, particulièrement le taxol, agent anticancéreux prometteur. Un sérieux problème à surmonter est sa faible teneur en taxol qui ne dépasse pas 0,01%. De plus la demande de ce produit antinéoplasique augmente approximativement chaque année par 20%. Une production industrielle de la molécule sans, à terme, détruire l'espèce, n'est pas donc envisageable. Afin de pallier à ce faible taux de taxol, l'optimisation de la production du taxol dans des suspensions cellulaires s'avère intéressante.

Objectifs : Nous visons à homogénéiser les suspensions cellulaires par l'application de méthode de synchronisation des cellules et stimuler la production du taxol dans ces suspensions.

Méthodes. Nous avons appliqué une méthode de synchronisation par l'absence d'hormones de croissance dans le milieu de culture. Pour qu'on puisse ajouter l'éliciteur quand la production de taxol est à l'extrême, un système de culture à deux phases est utilisé. La détermination de la teneur des extraits en taxol, est réalisée par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Résultats : Les résultats obtenus montrent que la croissance des cellules synchronisées est plus importante que celle des cellules non synchronisées. Le meilleur rendement du taxol enregistré est égal à 8,42 mg/l produit par les cellules synchronisées et élicitées par l'acide salicylique sur le milieu MS (1mg/l de 2,4-D, 1mg/l de Kinétine et 0,5 mg/l de GA3). Il est de 1,3 et 1,5 fois plus grand que celui des cellules synchronisées non élicitées et des cellules non synchronisées respectivement.

Conclusion : La synchronisation des cellules a amélioré la croissance et la production de taxol. L'ajout de l'acide salicylique a augmenté le rendement des cellules jusqu'à 8,42 mg/l de taxol. Cette étude mérite d'être poursuivie et approfondie en essayant d'autres concentrations d'acide salicylique.

Mots clés : *Taxus baccata* L., Taxol, Synchronisation de cellules, Suspension cellulaire, Acide salicylique.

TAXOL PRODUCTION FROM THE CALLUS OF THE COMMON YEW *TAXUS BACCATA* L.

Abstract

Description of the subject: *Taxus baccata* L. commonly called the common yew, gathers the trees known by their contents in taxanes, particularly the taxol, one off the most promising natural anticancer agents. A serious problem to be surmounted is its low content of taxol which does not exceed 0.01%. Moreover the request of this product increases roughly each year by 20%. So an industrial production of the molecule without destroying the species is not possible. In order to increase this low yield of taxol, the optimization of the taxol production in suspensions cellular is interesting.

Objectives : We aim to homogenize the cellular suspensions by the application of cells synchronization method and to stimulate the production of the taxol in these suspensions.

Methods : We applied a cells synchronization method by the croissances regulators starvation in the culture medium. A biphasic culture system is used. The determination of the taxol extracts content is carried out by the high performance liquid chromatography (HPLC).

Results : The results obtained show that the growth of the synchronous cells is more considerable than that of the asynchronous cells. The best yield of taxol equal to 8.42 mg/l is produced in elicited synchronous cells in MS medium supplemented with 1mg/l of 2.4-D, 1mg/l of Kin and 0.5 mg/l of GA3. It being about 1.3 and 1.5 times higher than that in synchronous cultures (S1) and in asynchronous cultures (S0) respectively.

Conclusion : The synchronization of the cells increased the cells growth and the taxol production. The addition of the salicylic acid increased the yield of the cells up to 8.42 mg/l of taxol. This study deserves to be continued and thorough by testing other concentrations of salicylic acid.

Keywords: *Taxus baccata* L., Taxol, Cells synchronization, Cell suspension, Salicylic acide.

*Auteur correspondant: ABDELLATIF Nabila, Email : bionab0@gmail.com

INTRODUCTION

Taxus baccata L. est une espèce appartenant à la famille des Taxacées possède un composé diterpénique le taxol (paclitaxel) isolée pour la première fois à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia* Nutt. [1]. Ce métabolite secondaire est l'un des agents naturel anticancéreux le plus prometteur [2], il suscite de grands espoirs dans la lutte contre une large gamme de cancers (du sein, des ovaires et des poumons) [3, 4, 5, 6, 7]. Cependant, la demande de cet agent antinéoplasique augmente approximativement chaque année par 20% [8]. De plus, ces espèces sont en voie de disparition car elles possèdent un contenu faible en paclitaxel et sont surexploitées [2]. La culture de cellules et de tissus de plants est une alternative prometteuse pour produire le taxol et les composés dérivés. Elle permet de contourner les aléas pédo-climatiques et les risques induits par les agents pathogènes [9]. La synthèse de métabolites secondaires est souvent corrélée avec la prolifération de cellules dans la culture cellulaire [10, 11]. De plus, il y a plusieurs systèmes dans lesquels la production des métabolites spécifiques se produit pendant certaines phases de cycle cellulaire [12]. La production des terpénoïdes est étroitement liée au cycle cellulaire [13, 14]. Cependant, dans les suspensions cellulaires, les phases de cycle cellulaire diffèrent d'une cellule à une autre, ce qui rend probablement la production de terpénoïdes variable. Des cultures synchrones peuvent être induites par plusieurs méthodes, telles que des méthodes physiques, l'absence des éléments nutritifs et l'addition des inhibiteurs chimiques [15]. L'étude entreprise consiste à appliquer la méthode de synchronisation des cals de *Taxus baccata* L. provenant de l'Atlas Blidéen, Chréa (Algérie) par l'absence d'hormones de croissance dans le milieu de culture pour homogénéiser la suspension cellulaire. Une stimulation de la production de taxol par l'ajout d'acide salicylique dans un système biphasique est effectuée.

Tableau 1 : Essais de la suspension cellulaire

Suspensions cellulaires	Cals utilisés	Milieu de production de	Milieu de production	Eliciteur utilisé
		biomasse	de taxol	
S ₀ (Témoin)	cals non synchronisés	B5 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.		—
	Cals synchronisés	B5 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.		—
S ₂	Cals synchronisé	B5 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.	MS 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.	+ acide salicylique (50 mg/l)

S : Suspension ; B5 : milieu de GAMBORG ; MS : MURASHIGE et SKOOG

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Synchronisation de culture

Les cals utilisés dans ces expériences ont été induits à partir des jeunes pousses de *Taxus baccata*. Une méthode de synchronisation par l'absence d'hormones de croissance dans le milieu de culture est utilisée [16]. Les cals ont été rincés au préalable par le milieu B5 liquide puis maintenues dans le milieu de base B5 solide dépourvu de 2,4-D. Après 72 heures de culture, les cals ont été transférés sur un nouveau milieu B5 auquel nous avons ajouté 2 mg/l de 2,4-D et incubés à 25 ± 2°C à l'obscurité. Ces cals vont être utilisés pour inoculer les suspensions cellulaires.

2. Suspension cellulaire

Deux stades de culture ont été établis, dans lesquelles les cellules synchronisées ont été cultivées premièrement dans un milieu de production de biomasse pendant 16 jours, puis transférées sur un milieu de production du taxol pendant 30 jours de culture. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque suspension. Le milieu utilisé pour la production de biomasse est le milieu de base GAMBORG (B5) contenant 20 g/l de sucrose, 100 mg/l d'acide ascorbique, 1 mg/l de kin, 1 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de GA3 (Tableau 1). Quant à la deuxième phase, le milieu de base utilisé pour la production du taxol est le milieu MS qui présente une meilleure production du taxol par les cals de *Taxus cuspidata* [17]. Nous avons ajouté à ce milieu, l'acide salicylique à une concentration de 50 mg/l en gardant toujours la même composition hormonale (1 mg/l kin, 1 mg/l 2,4-D et 0,5 mg/l GA3).

Le transfert des cellules vers le milieu de production de taxol est effectué après filtration et rinçage avec le milieu MS.

3. Mesure de la densité cellulaire

La densité cellulaire a été mesurée tous les 8 jours durant 46 jours de culture, en tant que poids sec, en suivant le protocole cité par WU et LIN [18]. Les cellules ont été séparées du milieu par filtration de 2ml prélevés de la suspension cellulaire (Wattman 150mm). La masse fraîche des cellules a été rincée avec de l'eau distillée et séchée à $40 \pm 2^\circ\text{C}$ dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

4. Extraction du taxol

L'extraction du taxol s'est faite à partir de la matière sèche des pousses, des cals induits à partir de ces pousses, des cellules mises en suspension et du milieu de cette suspension.

4.1. Extraction du taxol à partir des pousses

La méthode de Vallata [19] et Vidensek *et al.* [20], a été utilisée pour l'extraction du taxol de notre échantillon.

4.2. Extraction du taxol à partir des cals

Les cals âgés de 30 jours sont séchés dans une étuve à $40 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Nous avons mélangé 0,2 g de cals secs induits à partir de jeunes pousses à 10 ml de méthanol, puis homogénéisé avec un mortier pendant 10min. Le mélange est filtré et évaporé sous vide au rotavapeur à $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Le résidu sec obtenu est dissous à nouveau dans 4ml de méthanol.

4.3. Extraction du taxol intracellulaire

Les cellules et le milieu de culture ont été séparés par filtration. 0,2 g de la masse cellulaire fraîche est mélangé avec 10ml du méthanol pendant 40min. le mélange est filtré et le filtrat obtenu est évaporé sous vide au Rotavapeur à $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Le résidu sec est dissous à nouveau dans 2ml de méthanol et analysé par la CLHP [21].

4.4. Extraction du taxol extracellulaire libéré dans le milieu

Nous avons mélangé 2ml du milieu de culture avec le dichlorométhane (CH_2Cl_2). La phase organique est séparée de la phase aqueuse par une ampoule à décanter (étape répétée deux fois).

Le CH_2Cl_2 est évaporé sous vide au Rotavapeur à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ et le résidu sec obtenu est dissous dans 2 ml de méthanol et analysé par la CLHP [18, 22].

5. Dosage du taxol

La détermination de la teneur des extraits en taxol est réalisée par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), selon le programme mis au point par Vallata [19]. Les analyses ont été réalisées sur l'appareil Agilent HPLC 1100 avec une colonne de SB-C8 ($5\mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$) et une phase mobile méthanol : eau. Le rapport de la phase mobile évolue selon un gradient pendant l'analyse : évolution d'un rapport méthanol : eau (50 : 50) à un rapport (100 : 0). Les volumes d'injection des échantillons et de l'étalon sont de 10 μl , le débit est fixé à 1:0 ml/min et l'analyse dure 30 minutes. La détection est réalisée à une longueur d'onde de 225 nm.

RÉSULTATS

1. Teneur en taxol des pousses et des cals

Nous constatons que la teneur en taxol la plus importante est celle des pousses récoltées à partir de la plante (Tableau 2). L'extrapolation des résultats obtenus donnent pour 10 kg de pousses sèches 2,54 g de taxol. Comparés aux cals secs où nous obtenons pour la même quantité (10 kg) 0,21 g de taxol, quantité qui est très faible.

Tableau 2 : Teneur en taxol des jeunes pousses et des cals de *Taxus baccata* L.

100 g de poudre	Taxol (g)
Pousses	0,0254
Cals	0,0021

2. Croissance des cellules mises en suspension

Les résultats obtenus montrent que, la croissance dans toutes les suspensions cellulaires est caractérisée par une phase exponentielle entre le 1^{er} et le 16^{ème} jour, caractérisée par une croissance rapide et linéaire des cellules et une phase stationnaire à partir du 16^{ème} jour, caractérisée par une augmentation lente de la croissance des cellules jusqu'à atteindre un plateau au bout de 46 jours (Fig. 1).

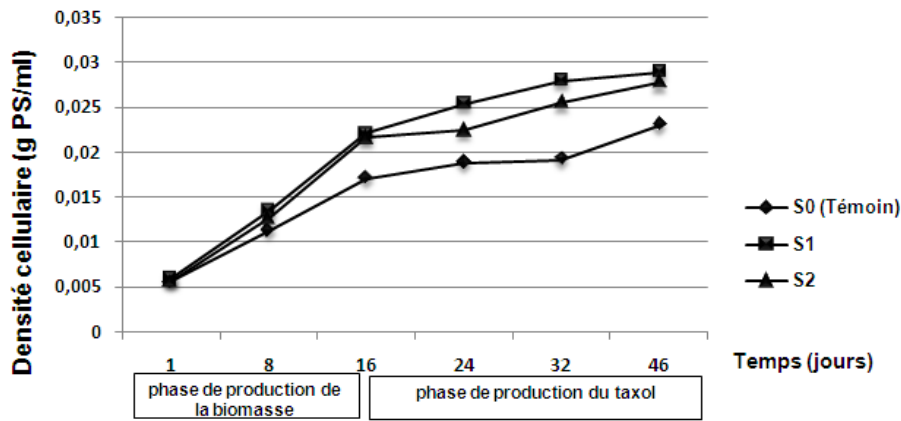


Figure 1 : Cinétique de la croissance des cellules mises en suspension.

S0 (Témoin) : cals non synchronisés, S1 : cals synchronisés, S2 : cals synchronisés transférés sur le milieu MS + l'acide salicylique.

La croissance des cellules, estimée par le poids sec, diffère d'une suspension à une autre. En comparant les suspensions S₁ et S₂ avec le témoin (S₀), nous remarquons que la croissance des cellules synchronisées (S₁ et S₂) est plus importante que celle des cellules non synchronisées et ce quel que soit le milieu de culture testé (B5 ou MS). Cette différence de poids augmente progressivement au cours du temps jusqu'à avoir un maximum de biomasse à la fin de la culture (46^{ème} jour), estimé à 0,0289 g PS/ml et 0,0277 g PS/ml respectivement pour S₁ et S₂. Une biomasse faible est obtenue pour le témoin (S₀) qui est estimée à 0,023 g PS/ml.

Nous constatons aussi que, pendant les 16 premiers jours de culture, la croissance des cals synchronisés S₂ demeure la même que celle de S₁. Durant cette période, ces cals se caractérisent par une cinétique de croissance rapide allant d'un poids initial de l'ordre de 0,006 g PS/ml pour S₁ et 0,0057g PS/ml pour S₂ et progresse jusqu'à 0,0221g PS/ml (S₁) et 0,0216 g PS/ml (S₂) (Fig. 1).

3. Production du taxol

Les extraits de chaque suspension cellulaire ont été analysés par la CLHP. Le calcul de taxol intracellulaire et extracellulaire (libéré dans le milieu) a été également réalisé (Fig. 2).

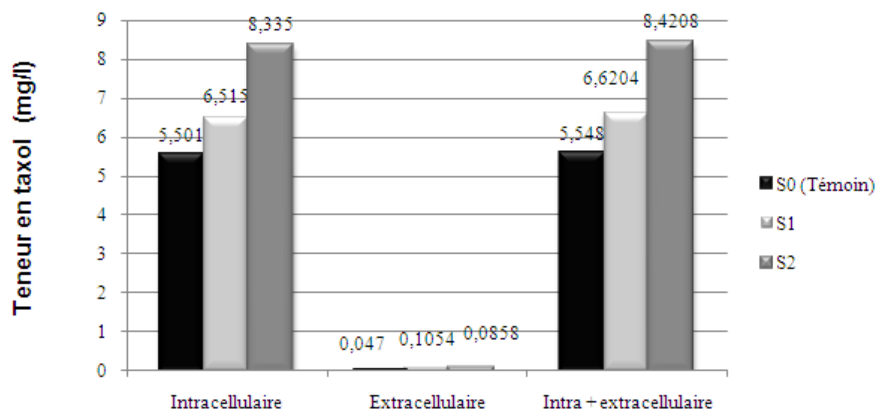


Figure 2 : Teneur en taxol intracellulaire et extracellulaire des suspensions

S₀ (Témoin) : cals non synchronisés (B5(M₄)), S₁ : cals synchronisés (B5(M₄)), S₂ : cals synchronisés transférés sur le milieu MS(M₄) + l'acide salicylique.

Nous observons des différences de taux de taxol, en fonction du milieu de culture utilisé et de l'inoculum initial (cellules synchronisées et non synchronisées) (Fig. 2). La comparaison de la suspension S₁ avec le témoin S₀,

montre que les cellules synchronisées (S₁) ont produit une quantité un plus élevée du taxol que celle des cellules non synchronisées (S₀). Cette production est estimée à 6,6204 mg/l du taxol total comparée à celui produit par les cellules non synchronisées (S₀) avec 5,548 mg/l.

L'homogénéité de la suspension cellulaire a augmenté légèrement le rendement en taxol par un facteur de 1,2 après 46 jours de culture. La stimulation de la production dans le milieu MS par l'acide salicylique (S_2) a augmenté le rendement en taxol total de 6,6204 mg/l (S_1) jusqu'à 8,4208 mg/l, après 30 jours de production.

Quant au taxol extracellulaire, nous remarquons que la quantité du taxol libérée par les cellules synchronisées non élicitées (S_1) est de 0,1054 mg/l. Elle est plus élevée que celle libérée par les cellules synchronisées et élicitées (S_2) avec 0,0858mg/l. Suite à ces résultats, nous remarquons que la concentration du taxol extracellulaire n'est pas liée à la concentration du taxol intracellulaire, cette hypothèse peut être confirmée lors de nos travaux futurs.

DISCUSSION

Les compositions qualitatives et quantitatives des produits peuvent varier considérablement à cause de la variabilité naturelle des plantes. Durant nos expérimentations, l'analyse chromatographique CLHP montre que les extraits des pousses du l'if (*Taxus baccata* L.), récoltées pendant le moins d'octobre (Parc National de Chréa), contiennent 0,0254 g de taxol par 100 g de poids sec. Ce résultat est cohérent en termes d'ordre de grandeur avec celui énoncé pour l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*) qui contient entre 0,001 et 0,1 g pour 100 g de poids sec [23]. Nous déduisons que la teneur de taxol dans les pousses estimée à 0,0254 g est plus importante comparée aux cales avec une quantité de 0,0021 g dans 100 g de poids sec. Selon Yu *et al.* [15], les métabolites secondaires s'accumulent habituellement à des niveaux très bas dans les cales en comparaison avec la plante dans son milieu naturel.

Dans le système biphasique utilisé, les cellules synchronisées (S_1 et S_2) et non synchronisées (S_0) se sont développées activement pendant la première phase de la culture dans le milieu de production de biomasse, en multipliant par un facteur égal à 3,7 et 3 respectivement après seulement 16 jours. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Onrubia *et al.* [8] en élicitant les cellules de *T. baccata* par le méthyle jasmonate et le vanadyle sulfate.

Quand les cellules synchronisées (S_2) ont été transférées sur le milieu de production du taxol MS (1 mg/l de Kin + 1 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de GA3) auquel nous avons ajouté l'acide salicylique dans des conditions contrôlées (température, obscurité et agitation), la biomasse a augmenté approximativement par un facteur de 1,2 seulement entre le 16^{ème} et le 46^{ème} jour. L'addition de l'acide salicylique n'a pas vraiment changé la croissance de ces cellules (S_2) si on la compare avec celle des cellules synchronisées non élicité (S_1). Nos résultats ne sont pas conformes à ceux obtenus par Yu *et al.* [24], qui ont mentionné que l'acide salicylique provoque plutôt une diminution de croissance des cellules mises en suspension de *Taxus chinensis*. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer, par le fait que, l'effet ne dépend pas seulement de l'éliciteur lui-même (type, concentration et durée de stimulation) mais également des espèces, des cellules et du stade de développement de la culture [25].

La teneur en taxol total (intracellulaire + extracellulaire) de la culture S_0 (témoin) maintenue dans le milieu de production de la biomasse B5, était faible, atteignant une production de 5,548 mg/l à la fin de la culture. Nous déduisons que les conditions de production de la biomasse ne sont pas favorables à la production du taxol. Selon Wang *et al.* [22], la synthèse des métabolites secondaires s'accroît quand le métabolisme primaire (synthèse de biomasse) est inactif. Toutefois, la synchronisation des cellules a permis une augmentation légère de rendement multiplié par un facteur de 1,2 après 46 jours de culture. Ces résultats ne sont pas conformes à ceux obtenus par Yu *et al.* [15], où ils mentionnent que la production de taxol par les cellules synchronisées est moins élevée que celle des cellules non synchronisées. Le meilleur rendement du taxol enregistré est celui des cellules synchronisées (S_2) et élicitées par l'acide salicylique sur le milieu MS, il est de 8,4208 mg/l. Nos résultats ne sont pas conformes à ceux obtenus par Yu *et al.* [24], qui en utilisant la même concentration en acide salicylique (50mg/l), ils n'obtiennent que 5 mg/l de taxol. La réponse à l'éliciteur dépend de plusieurs facteurs, en particulier la capacité biosynthétique de la cellule [8]. Quant au taxol libéré dans le milieu, les concentrations obtenues sont entre 0,047 et 0,1054 mg/l, ce qui reste très faible. Ces concentrations ne sont pas liées à la concentration du taxol intracellulaire.

L'un des problèmes qui doit encore être résolu dans l'exploitation biologique des cultures cellulaires de *Taxus sp.* est comment augmenter la libération du taxol dans le milieu de culture. Selon Wu et Lin [18], les produits accumulés dans les cellules ou dans le milieu de culture peuvent causer une rétro-inhibition de leur biosynthèse et ils pourraient être également exposés à la dégradation.

CONCLUSION

La synchronisation des cellules est une stratégie efficace pour améliorer la production de la biomasse, elle a augmenté la croissance après 16 jours de culture. Ainsi, le système biphasique utilisé a permis le contrôle de la production de biomasse et de taxol. L'ajout de l'acide salicylique comme éliciteur n'a pas affecté la croissance des cellules et a augmenté la production de taxol avec une concentration de 8,4208 mg/l après 30 jours de culture. Cependant, en raison de l'intérêt commercial du taxol, les résultats obtenus restent faibles et il serait judicieux d'optimiser la concentration d'acide salicylique pour l'espèce *Taxus baccata* L. dans les travaux futurs car la réponse à l'éliciteur dépend de plusieurs facteurs notamment la concentration et le type d'éliciteur.

A travers les résultats obtenus et ceux de la littérature, nous pouvons déduire que la suspension des cellules végétales est caractérisée par un degré très élevé d'hétérogénéité. Il peut également y avoir des variations significatives, entre les cellules de la même suspension, dans leur capacité de production, leur taux de croissance et leurs cycles cellulaires.

Des expérimentations sont en cours pour confirmer et approfondir les résultats obtenus.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Frohne D., Pfander H.J. et Anton R. (2009). *Plantes à risque*. 5^{ème} Ed. Lavoisier. 459 p.
- [2]. Mihaljevic S., Bjedov I., Kovac M., Levanic D.L. and Jelaska S. (2002). Effect of Explant Source and Growth Regulators on *in vitro* Callus Growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. *Food Technol. Biotechnol.*, 40 (4) : 299–303.
- [3]. Suffness M. and Wall M.E. (1995). Discovery and development of Taxol. *Science and application*. CRC Press, Boca Raton. 3–25.
- [4]. Thayer A. M. (2000). Busting down a blockbuster drug. *Chem. Eng News*, 78 : 20–21.
- [5]. Havrilesky L. J., Alvarez A.A., Sayer, R.A., Lancaster J.M., Soper J.T., Berchuck A., Clarke-Pearson D. L., Rodriguez, G. C. et Carney, M. E. (2003). Weekly low-dose carboplatin and paclitaxel in the treatment of recurrent ovarian and peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.*, 88 : 51–57.
- [6]. Hata, K., Osaki, M., Dhar, D. K., Nakayama, K., Fujiwaki, R., Ito, H., Nagasue, N. and Miyazaki, K. (2004). Evaluation of the antiangiogenic effect of Taxol in a human epithelial ovarian carcinoma cell line. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 53 (1) : 68–74.
- [7]. Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J. P., Garg, G. et Munkarah, A. (2010). Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer. *Int. J. Womens Health*, 19 (2) : 411–427.
- [8]. Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Exposito O., Palazon J. and Cusido R. M. (2010). An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of txs and bap1 gene expression. *Biochemical Engineering Journal*, 53 : 104–111.
- [9]. Vongpaseuth K. and Roberts S.C. (2007). Advancements in the Understanding of Paclitaxel Metabolism in Tissue Culture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8 (4) : 219-236.
- [10]. Komamine A., Sakuta M., Hirose M., Hirano H., Takagi T. and Ozeki Y. (1989). Regulation of secondary metabolism in relation to growth and differentiation. In: Kurz GW, editor. *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*. Berlin: Springer. 49-52.
- [11]. Yeoman M.M., Lindsey K., Miedzybrodzka M.B. and McLaachlan W.R. (1982). Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant and tissue cultures. In: Yeoman MM, Truman DES, editors. *Differentiation In Vitro*. Cambridge: Cambridge University Press. 65-82
- [12]. Maki H., Ando S., Kodama H. and Komamine A. (1991). Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiology.*, 13 : 96-1008.
- [13]. Qian D.Q., Zhou D.F., Ju R., Cramer C.L. and Yang ZB. (1996). Protein farnesyltransferase in plants: molecular characterization and involvement in cell cycle control. *Plant Cell.*, 8:2387-794.
- [14]. Andrea H., Fischt I. and Bach T.J. (2000). Differential interaction of branch specific inhibitors of isoprenoid biosynthesis with cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Physiologia Plantarum.*, 9: 110-342.
- [15]. Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M. and Xu H.B. (2002). High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells. *Process Biochemistry.*, 38 : 207- 210.

- [16]. Nishida T., Ohnishi N., Kodama H. and Komamine A. (1992). Establishment of synchrony by starvation and readdition of auxin in suspension cultures of *Catharanthus roseus* cells ». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, 28 : 37-43.
- [17]. Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Sakata K. and DiCosmo F. (1993). Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition. *Biotechnology*, II:731-734.
- [18]. Wu J. and Lin L. (2003). Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 62 : 151-155.
- [19]. Vallata P. (2009). Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture *in vitro* et dosage. Thèse de doctorats, Faculté de pharmacie, Université HENRI POINCARÉ - NANCY 1, 106 p.
- [20]. Vidensek N., Lim, P. Campbell A. et Carlson C. (1990). Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *Journal of Natural Products*, 53 (6): 1609-1610.
- [21]. Kajani A.A., Moghim S. and Mofid M.R. (2012). Optimization of the basal medium for improving production and secretion of taxanes from suspension cell culture of *Taxus baccata* L. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20 : 54-60.
- [22]. Wang C.G., Wu J.Y. and Mei X.G. (2001). Enhanced Taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. *Biotechnol Prog.* 17: 89-94.
- [23]. Hoffman A.M., Voelker C.C.J., Franzen A.T., Shiotan K.S. and Sandhu J.S. (1996). Taxanes exported from *Taxus x media* hichsii cuttings into liquid medium over time. *Phytochemistry*, 43 (1) : 95-98.
- [24]. Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M. and Xu H.B. (2001). Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochemistry*, 37 : 477-482.
- [25]. Bonfill M., Palazon J., Cusido R.M., Joly S., Morales C. and Pinol M.T. (2003). Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus x media* cells. *Plant Physiol. Biochem.*, 41 : 91-96.