

## BIOSYNTHÈSE DU SQUALÈNE DANS UN SYSTÈME ACELLULAIRE OBTENU À PARTIR DE TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

P. BENVENISTE, G. OURISSON et L. HIRTH

Centre de Recherches Nucléaires, Département des Applications Biologiques,  
67 Strasbourg-Cronenbourg, France

(Received 21 September 1969)

**Abstract**—Squalene and farnesol are identified as products arising from 2-<sup>14</sup>C mevalonic acid in a cell-free system from tobacco tissues grown *in vitro*. This system is composed of a soluble fraction, which is involved in the synthesis of farnesyl pyrophosphate, and microsomes which are necessary to synthesize squalene from the latter compound. Squalene is obtained only when the incubation mixture contained ATP, NADH, a metallic divalent cation and thiols. Mn<sup>++</sup> is shown to be more active than Mg<sup>++</sup>. No products following squalene in the sterol pathway are detected.

IL A ÉTÉ suggéré au cours d'un travail précédent<sup>1</sup> que le cycloarténol pouvait remplacer le lanostérol en tant que premier triterpène tétracyclique formé à partir du squalène pendant la biosynthèse des stérols contenus dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro*. Pour démontrer cette hypothèse, Hewlins et coll.<sup>2</sup> ont incubé ces derniers en présence de 25-(<sup>14</sup>C) cycloarténol et ont montré que la conversion de ce triterpène en stérols avait lieu dans ce matériel. Cependant, du fait des rendements de conversion relativement faibles obtenus, il n'a pas été permis de conclure à l'existence d'une voie métabolique unique passant par le cycloarténol. En effet, les triterpènes administrés éprouvent apparemment de grandes difficultés à traverser les membranes cellulosiques des cellules de cultures de tissus de Tabac et à atteindre les sites de stéroïdogenèse. Pour éliminer ces problèmes, nous avons entrepris de mettre au point un système acellulaire capable de synthétiser *in vitro* des stérols.

A notre connaissance, aucun système acellulaire de plantes supérieures capable de synthétiser *in vitro* des stérols n'a été décrit jusqu'à ce jour. Les cultures de tissus de plantes pouvaient constituer un matériel favorable pour l'obtention de tels systèmes. En effet, d'une part, les cultures de tissus poussent dans des conditions de stérilité absolue; ceci nous permet d'éliminer tout risque de contamination de notre système acellulaire par des levures qui, comme on sait, synthétisent activement des stérols. D'autre part, les cultures de tissus sont souvent peu différencierées<sup>3</sup> et ne subissent que faiblement les variations saisonnières; ceci permet de travailler avec des populations relativement homogènes de cellules et dans des conditions de reproductibilité satisfaisante.

Nous avons fixé notre choix sur les tissus de tabac anergiés cultivés *in vitro*,<sup>4</sup> matériel qui nous était particulièrement connu sur le plan de la biosynthèse des stérols<sup>5</sup> et des substances phénoliques.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* **5**, 31 (1966).

<sup>2</sup> M. J. E. HEWLINS, J. D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON, *European J. Biochem.* **8**, 184 (1969).

<sup>3</sup> R. L. GAUTHERET, *La Culture de Tissus Végétaux*, Masson, Paris (1959).

<sup>4</sup> L. HIRTH, Thèse, Paris (1958).

<sup>5</sup> P. BENVENISTE, M. J. E. HEWLINS et B. FRITIG, *European J. Biochem.*, **9**, 526 (1969).

<sup>6</sup> B. FRITIG, Thèse, Strasbourg (1968).

Nous nous sommes, au départ, inspirés de travaux effectués dans une optique analogue avec des tissus animaux<sup>7</sup> et en particulier ceux de Popjak.<sup>8</sup> Cet auteur ayant mis au point une technique de préparation de microsomes de foie de Rat actifs dans la biosynthèse *in vitro* du cholestérol, nous avons, dans un premier temps, cherché à préparer des fractions subcellulaires à partir de notre matériel dans le but d'évaluer leur activité vis-à-vis de l'acide mévalonique. Une partie de ces travaux ont fait l'objet d'une note préliminaire.<sup>9</sup>

## RESULTATS

La méthode utilisée pour obtenir des fractions subcellulaires est schématisée dans le Tableau 1. Les culots de centrifugation C<sub>1</sub> et C<sub>20</sub> ne correspondent pas à des fractions homogènes et nous n'avons pas cherché à caractériser leurs constituants; on peut cependant dire que le culot C<sub>1</sub> est essentiellement constitué de noyaux et que le culot C<sub>20</sub> est particulièrement riche en mitochondries. Enfin, le culot C<sub>200</sub> est essentiellement composé de microsomes et a fait l'objet d'études plus détaillées. Aucun de ces culots ne contient de chloroplastes.

### *Nature de la Fraction Microsomiale*

Lorsque l'on soumet les microsomes (préparés en présence de DOC) à l'ultracentrifugation analytique on obtient deux pics. Le pic A correspond à un matériel dont le coefficient de sédimentation est de 80 S: il s'agit en toute probabilité de ribosomes cytoplasmiques.<sup>10</sup> Le pic B a un coefficient de sédimentation de 110 S: il pourrait s'agir de dimères de ribosomes.<sup>11</sup> Quant aux pics plus lourds, ils pourraient correspondre à des polysomes; l'identification définitive de ces fractions est en cours. Lorsque l'on soumet à la même opération des microsomes non traités au DOC, on obtient, à côté des pics A et B, un sédiment important; la fraction microsomiale des extraits de tissus de tabac cultivés *in vitro* contient donc, à côté d'une proportion importante de ribosomes libres, une fraction de type membranaire solubilisable par le DOC. Cette dernière fait actuellement l'objet d'études détaillées.

### *Incubations*

Dans la mesure où les résultats acquis par d'autres auteurs<sup>8</sup> avec des systèmes acellulaires de foie de Rat pouvaient être extrapolés à notre système, on pouvait s'attendre à ce que les surnageants post-microsomiaux S<sub>200</sub> contiennent les enzymes nécessaires à l'activation de l'acide mévalonique et à la formation de l'unité isoprénique active: le pyrophosphate d'isopentényle. Plutôt que d'utiliser directement S<sub>200</sub>, nous avons préféré en extraire les enzymes actifs suivant un protocole déjà décrit.<sup>8</sup> La méthode utilisée est schématisée sur le tableau I et détaillée dans la partie expérimentale.

Aux fractions particulières, on ajoute les enzymes E<sub>40</sub><sup>80</sup>, les cofacteurs nécessaires et le précurseur radioactif (acide mévalonique 2-<sup>14</sup>C). Les substances formées au cours des incubations sont traitées suivant un protocole décrit dans la partie expérimentale.

### *Nature des Métabolites Formés*

Quelle que soit la fraction particulière incubée, on obtient principalement deux métabolites radioactifs: un alcool A et un hydrocarbure B. Ce dernier migre comme le squalène

<sup>7</sup> N. R. L. BUCHER et K. McGARRAHAN, *J. Biol. Chem.* 222, 1 (1956).

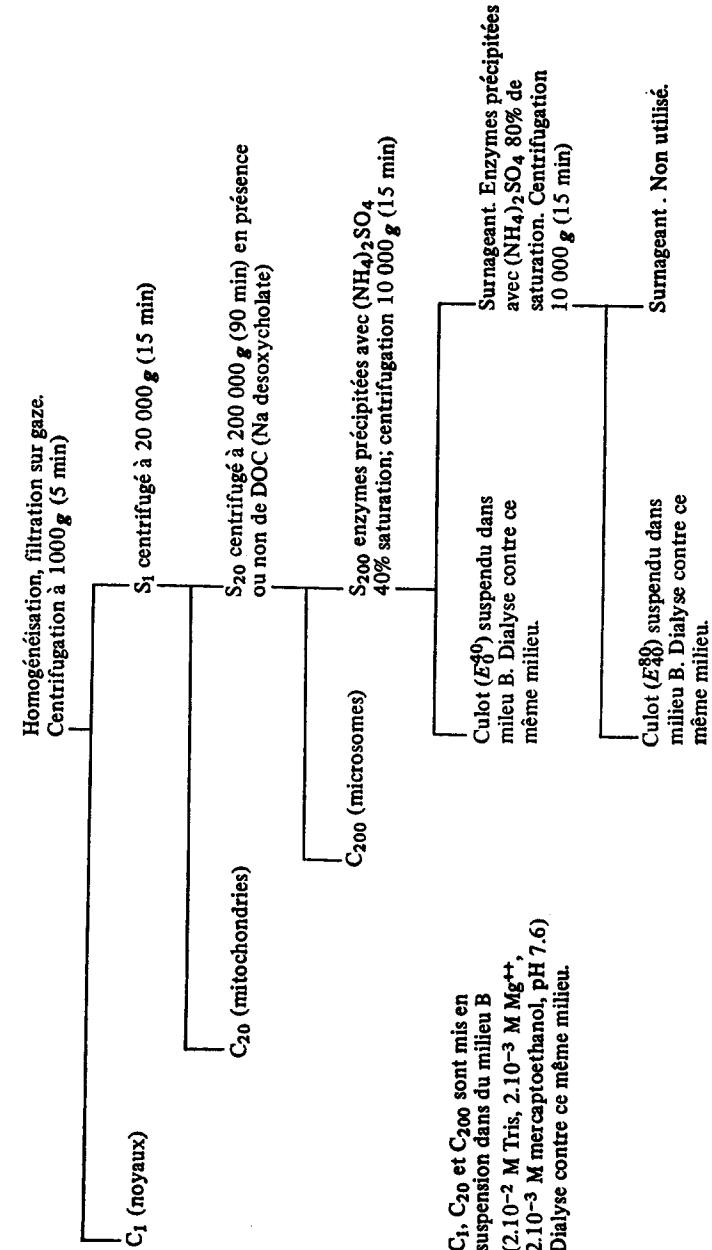
<sup>8</sup> G. POPIAK, *Ciba Found. Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, Churchill, London (1959).

<sup>9</sup> P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Compt. Rend.* 265, 1749 (1967).

<sup>10</sup> N. K. BOARDMAN, R. I. B. FRANCKI et S. G. WILDMAN, *J. Mol. Biol.* 17, 470 (1966).

<sup>11</sup> C. GIGOT, Travaux en cours.

TABLEAU 1. OBTENTION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES



dans plusieurs systèmes chromatographiques. On lui ajoute du squalène non radioactif et on prépare un dérivé: l'hexachlorosqualane. On recristallise ce dernier jusqu'à activité spécifique constante. Pour terminer l'identification, on prépare un dérivé très spécifique: l'époxyde-2:3 de squalène.<sup>12</sup> La radioactivité spécifique de ce dernier est identique à celle de l'hydrocarbure B de départ. L'hydrocarbure B est donc le squalène. L'alcool A est un terpénol, sans doute le farnésol; il migre en effet comme le farnésol dans des conditions qui permettent de distinguer cette substance du géranol et du géranyl-géranol. L'identification définitive de ce produit est en cours.

Notons dès à présent qu'aucun produit postérieur au squalène, dans la chaîne métabolique conduisant aux stérols, n'est décelé. En particulier, ni le cycloarténol, ni l'époxyde-2:3 de squalène ne sont synthétisés.

#### Fraction Subcellulaire Active

L'activité squalène synthétasique de diverses fractions subcellulaires a été comparée (Tableau 2). On voit que:

les enzymes  $E_{40}^{80}$  incubés seuls ne synthétisent que très peu de squalène;  
 les fractions particulaires incubées sans  $E_{40}^{80}$  sont totalement dépourvues d'activité;  
 enfin, lorsque les fractions particulaires sont incubées en présence d'enzymes  $E_{40}^{80}$ , il y a synthèse de squalène et la fraction particulière la plus active est la fraction microsomiale; la quantité de squalène synthétisé par les microsomes est d'environ 4 à 6  $m\mu\text{moles}/\text{mg}$  de protéines.

TABLEAU 2. SYNTHÈSE DU SQUALÈNE *in vitro*. COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ DE DIFFÉRENTES FRACTIONS SUBCELLULAIRES

	Squalène	
	En dpm	En $m\mu\text{moles}/\text{mg}$ de protéines
Microsomes seuls	0	0
$E_{40}^{80}$ seules	2680	0,19
Microsomes + $E_{40}^{80}$	52 090	4,96
Mitochondries + $E_{40}^{80}$	16 900	1,42
Noyaux + $E_{40}^{80}$	10 140	0,80

Les milieux d'incubation comprennent: fractions subcellulaires (environ 0,2 mg d'azote protéique),  $E_{40}^{80}$  (0,2 mg d'azote protéique), ATP 2  $\mu\text{moles}$ , NADH 0,65  $\mu\text{moles}$ , Tris 50  $\mu\text{moles}$ , mercaptoéthanol 2  $\mu\text{moles}$ ,  $Mg^{++}$  4  $\mu\text{moles}$ , nicotinamide 2  $\mu\text{moles}$ , acide mévalonique 2-(<sup>14</sup>C) 1  $\mu\text{c}$ . Volume total 0,5 ml.

Par ailleurs, le Tableau 3 montre que les enzymes  $E_{40}^{80}$  incubés seuls synthétisent du farnésol. Ce produit provient de l'hydrolyse d'une partie du pyrophosphate de farnésyle par une phosphatase contenue dans ces préparations.<sup>13</sup> En effet, si l'on traite l'incubat par HCl N pendant 30 min, tout le pyrophosphate de farnésyle apparaît sous forme de farnésol et de nérolidol.<sup>14</sup> Par ailleurs, le Tableau 3 montre également que le pyrophosphate de farnésyle produit par la fraction soluble peut, après inactivation des enzymes par chauffage à 100°, être utilisé par les microsomes pour former du squalène.

<sup>12</sup> E. E. VAN TAMELEN et T. J. CURPHEY, *Tetrahedron Letters* 121 (1962).

<sup>13</sup> J. CHRISTOPHE et G. POPJAK, *J. Lipid Res.* 2, 244 (1961).

<sup>14</sup> DE W. S. GOODMAN et G. POPJAK, *J. Lipid Res.* 1, 286 (1960).

TABLEAU 3. ACTIVITÉ BIOSYNTHÉTIQUE DES ENZYMES SOLUBLES  $E_{40}^{80}$ 

	$E_{40}^{80}$ seules	$E_{40}^{80*}$	$E_{40}^{80}$ + microsomes†
Farnésol	5,46‡	8,4	1,35
Nérolidol	—	10,2	—
Squalène	0,19	—	1,65

Les conditions d'incubation sont celles indiquées sur le Tableau 2.

\* Traitement de l'incubat pendant 30 min avec HCl N/10.

† Au bout de 30 min d'incubation, le tube est plongé dans de l'eau à 100° pendant 1 min, on refroidit et ajoute des microsomes (0,2 mg). On incube encore pendant 30 min.

‡ En  $\mu$ moles/mg de protéines.

#### Autres Caractéristiques du Système

Lorsque l'on incube des microsomes et des enzymes  $E_{40}^{80}$  soigneusement dialysés contre un tampon ( $2 \cdot 10^{-2}$  M Tris,  $2 \cdot 10^{-3}$  M mercaptoethanol, pH 7,6), on peut montrer (Tableau 4) que le système est totalement dépendant de NADH (ou NADPH) et ATP. Le pH optimal se situe aux alentours de 7,4.

TABLEAU 4. COFACTEURS INDISPENSABLES AU FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME

Système	Squalène	
	En dpm	En $\mu$ moles/mg de protéines
Complet	51 000	3,8
Moins Mg <sup>++</sup>	0	0
Moins Mg <sup>++</sup> + Mn <sup>++</sup>	88 600	8,44
Moins ATP	0	0
Moins NADH*	0	0
Moins NADH + NADPH	37 050	2,75

Les conditions d'incubation sont celles du Tableau 2. Les microsomes et les enzymes  $E_{40}^{80}$  sont dialysés avant incubation.

\* En l'absence de NADH, il se forme toutefois du pyrophosphate de farnésyle.

TABLEAU 5. EFFET DE CERTAINS CATIONS DIVALENTS SUR LA SYNTHÈSE DE SQUALÈNE

Additions*	Squalène
Nul	100
+ Mn <sup>++</sup>	140†
+ Co <sup>++</sup>	50
+ Cu <sup>++</sup>	50
+ Fe <sup>++</sup>	17
+ Zn <sup>++</sup>	0

\* Au milieu d'incubation contenant déjà 2  $\mu$ moles ( $4 \cdot 10^{-3}$  M) de cations Mg<sup>++</sup>, on ajoute 0,5  $\mu$ mole des cations indiqués ci-dessus.

† Evalué relativement au témoin ne contenant que Mg<sup>++</sup>.

L'influence de cations divalents a été également étudiée (Fig. 1, Tableau 5). Le cation  $Mg^{++}$  est indispensable (dose optimale  $8 \cdot 10^{-3}$  M). Le cation  $Mn^{++}$  est près de deux fois plus actif (dose optimale  $1 \cdot 10^{-3}$  M) et stimule un système contenant déjà le cation  $Mg^{++}$ . Par contre, les autres cations testés n'ont aucun effet activateur sur le système; ils inhibent même un système comprenant déjà le cation  $Mg^{++}$ .

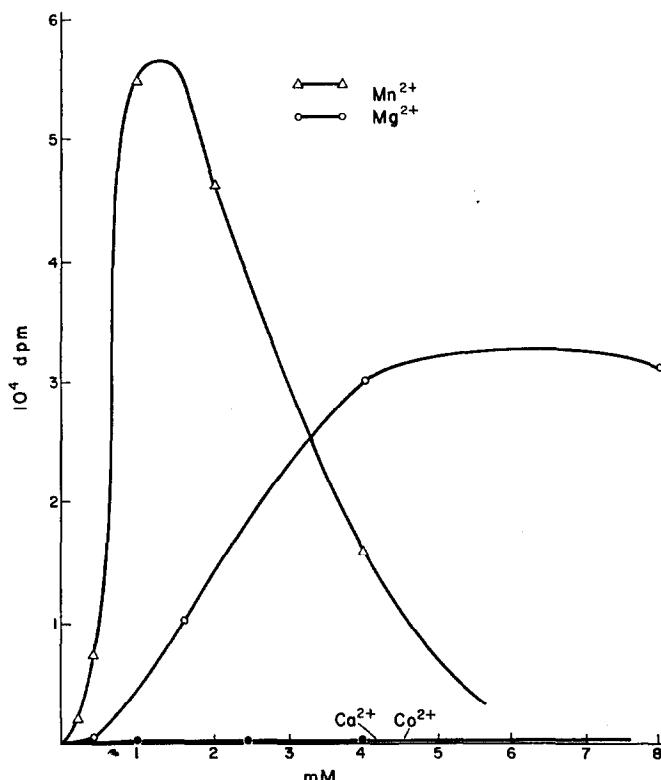


FIG. 1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CATIONS DIVALENTS SUR LA SYNTHÈSE DU SQUALÈNE.

TABLEAU 6. INFLUENCE DE CERTAINS THIOLS SUR LA SYNTHÈSE DE SQUALÈNE

	Squalène
GSH	4,65*
Mercaptoéthanol	4,05
DTE	2,35
Moins thiol	0,13

Les thiols sont ajoutés au milieu d'homogénéisation ( $5 \cdot 10^{-3}$  M).

Les incubations sont effectuées comme décrit dans le Tableau 2.

\* En  $\mu$ moles/mg d'azote protéique microsomial.

Enfin, la présence dans le milieu d'homogénéisation de substances possédant des groupements SH est absolument nécessaire. On voit (Tableau 6) que, parmi trois substances essayées, le glutathion semble être le plus efficace (les différences mises en évidence étant faibles mais significatives).

TABLEAU 7. RECRYSTALLISATION JUSQU'À RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE CONSTANTE DE L'HEXACHLOROSQUALANE

Rechristallisation	Hexachlorosqualane (dpm/mg)
1 <sup>ère</sup>	580
2 <sup>ème</sup>	320 $\pm$ 25
3 <sup>ème</sup>	370 $\pm$ 25
4 <sup>ème</sup>	325 $\pm$ 25

Les cristallisations sont effectuées dans l'acétone.<sup>22</sup>

#### DISCUSSION

Nous avons ainsi obtenu un système acellulaire qui synthétise *in vitro* du squalène. Ce système est constitué d'une phase particulaire (microsomes) et d'une phase soluble (enzymes  $E_{10}^{30}$ ). La synthèse de pyrophosphate de farnésyle a lieu dans la phase soluble; quant à la synthèse du squalène à partir de pyrophosphate de farnésyle, elle a lieu au niveau des microsomes. La synthèse de squalène à partir d'acide mévalonique est dépendante d'un apport d'ATP, de NADH (ou de NADPH) et d'un cation divalent ( $Mn^{++}$  étant plus actif que  $Mg^{++}$ ). Le pH optimal de la transformation est de 7,4. L'ensemble de ces résultats montre que les conditions requises pour la synthèse *in vitro* de squalène avec un système acellulaire extrait de tissus de tabac cultivés *in vitro* sont voisines de celles mises en jeu avec un système acellulaire de foie de rat.<sup>8</sup> Elles sont par contre différentes de celles décrites par Graebe avec un homogénat de pois<sup>15</sup> et de Porter et coll. avec des plastes de carotte.<sup>16</sup> Graebe a en effet démontré que des préparations enzymatiques extraites d'un surnageant post-microsomial ( $S_{200}$ ) sont douées d'activité squalène-synthétasique. Ces préparations sont en outre, très nettement stimulées par une fraction particulaire sédimentant à 20 000 g (mitochondries et chloroplastes). De même, Porter et coll. ont décrit un système enzymatique extrait de plastes de carotte capable de convertir le pyrophosphate de farnésyle en squalène. Comme l'ont suggéré récemment Goodwin et coll.,<sup>17</sup> deux sites de synthèse de squalène pourraient exister dans les cellules végétales: l'un cytoplasmique (réticulum endoplasmique) et l'autre plastidique. En outre, les deux squalène-synthétases se comporteraient de manière assez différente: la squalène-synthétase cytoplasmique serait en effet très fermement associée au réticulum endoplasmique,<sup>18</sup> tandis que la squalène-synthétase plastidiale serait relativement facile à solubiliser.<sup>15, 16</sup>

L'impossibilité de dépasser le stade du squalène dans la biosynthèse *in vitro* des stérols constitue probablement un phénomène général dans les systèmes acellulaires de plantes

<sup>15</sup> J. E. GRAEBE, *Phytochem.* **7**, 2003 (1968).

<sup>16</sup> D. A. BEELER, D. G. ANDERSON et J. W. PORTER, *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 26 (1963).

<sup>17</sup> D. R. THRELFALL, W. T. GRIFFITH et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **103**, 831 (1967).

<sup>18</sup> G. KRISHNA, H. W. WHITLOCK, D. H. FELDBRUEGGE et J. W. PORTER, *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 200 (1966).

supérieures. Cependant, la synthèse d'un triterpène pentacyclique, la  $\beta$ -amyrine, par un système acellulaire de pois, a été rapportée par Nes et coll.<sup>19</sup> Enfin Ponsinet et Ourisson<sup>20</sup> ont décrit la synthèse de triterpènes tétracycliques (cycloarténol, euphol, lanostérol, etc.) avec des latex bruts d'euphorbes.

On pouvait se demander si ce blocage de la chaîne biosynthétique concerne l'ensemble des enzymes situés après le squalène ou seulement la squalène-2:3-époxydase. Nous avons récemment préparé biosynthétiquement de l'époxyde-2:3 de squalène marqué au  $^{14}\text{C}$  et l'avons incubé en présence de microsomes de tissus de tabac cultivés *in vitro*. Du ( $^{14}\text{C}$ ) cycloarténol a pu être obtenu; par contre, aucune autre substance (méthyl-4 stérols, stérols) n'a pu être décelée.<sup>21</sup> Ces résultats suggèrent que, dans notre système, une certaine classe d'enzymes oxydatifs ne fonctionnent pas (la squalène 2:3-époxydase et les hydroxylases mises en jeu dans les déméthylation en 4 et en 14 des triterpènes). Ces enzymes font probablement partie de la classe des oxydases à fonctions multiples microsomiales<sup>22</sup> et une étude détaillée du mode de fonctionnement de ces dernières s'impose.

Nous avons constaté que la fraction microsomiale isolée est très hétérogène et qu'elle est constituée de ribosomes libres et d'une fraction membranaire; cette dernière est constituée probablement de vésicules ergastoplasmiques qui, dans le cas de préparations extraites de tissus de foie de rat<sup>23</sup> peuvent être séparées en plusieurs classes de subfractions morphologiquement et biochimiquement définies. Il semblerait qu'en fonction de ces connaissances récentes sur la structure du réticulum endoplasmique, le problème de la détermination du site intracellulaire de la biosynthèse des stérols se pose d'une manière nouvelle.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Produits Chimiques et Éléments Marqués

L'ATP, le NADH, le NADPH sont des produits Boehringer (Mannheim). Le DOC (désoxycholate), le GSH sont des produits Merck (Darmstadt), le DTE et le Tris sont des produits Sigma (U.S.A.).

La mévalolactone-2- $^{14}\text{C}$  (5, 48  $\mu\text{c}/\mu\text{mole}$ ) provient du Radiochemical Center (Amersham). La mévalolactone est traitée par une quantité calculée de KOH de manière à obtenir un pH d'environ 11; on laisse pendant 1 hr à la température ambiante et on ajoute de l'HCl pour neutraliser l'excès de KOH puis du tampon Tris, HCl pH 7,4. La radioactivité des préparations obtenues est de 50  $\mu\text{c}/\text{ml}$ .

### Matériel Végétal

Les cultures de tissus de Tabac anergiées utilisées au cours de ce travail ont été décrites précédemment.<sup>4</sup> Cette souche ne contient pas de chlorophylle dans nos conditions de culture.

### Préparation des Fractions Subcellulaires

L'ensemble du processus est schématisé dans le Tableau 1. Les tissus sont homogénéisés dans leur poids d'un milieu A ( $2, 5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$  saccharose,  $4, 10^{-3} \text{ M}$   $\text{Mg}^{++}$ ,  $5, 10^{-3} \text{ M}$  GSH,  $1, 10^{-1} \text{ M}$  Tris, pH 7,5). On utilise un homogénéiseur du type Elvehjem-Potter. L'homogénat est filtré sur gaze. Le filtrat est centrifugé à 1000 g (5 min, Servall); on obtient le culot C<sub>1</sub> et un surnageant S<sub>1</sub>. S<sub>1</sub> est centrifugé à 20 000 g (15 min, Servall); on obtient un culot C<sub>20</sub> et un surnageant S<sub>20</sub>. Ce dernier est centrifugé à 200 000 g pendant 90 min (Spinco Beckman, modèle F, rotor 50-1) en présence ou non de DOC. Le surnageant S<sub>200</sub> est séparé du culot de microsomes. Les fractions particulières ainsi préparées sont mises en suspension dans un milieu B ( $2, 10^{-2} \text{ M}$  Tris,  $2, 10^{-3} \text{ M}$   $\text{Mg}^{++}$ ,  $2, 10^{-3} \text{ M}$  Et SH, pH 7,6) de manière à obtenir une concentration d'environ 1 mg/ml

<sup>19</sup> E. CAPSTACK, N. ROSIN, G. A. BLONDIN et W. R. NES, *J. Biol. Chem.* **240**, 3258 (1965).

<sup>20</sup> G. PONINET et G. OURISSON, *Phytochem.* **6**, 1235 (1967).

<sup>21</sup> R. HEINTZ et P. BENVENISTE, *Phytochem.* sous presse.

<sup>22</sup> H. S. MASON, T. YAMANO, J. C. NORTH, Y. HASHIMOTO et P. SAKAGISHI, *Oxidases and Related Redox Systems*, Vol. II, p. 879, John Wiley, New York (1965).

<sup>23</sup> F. DECLOTRE et J. CHAUVEAU, *FEBS Letters*, **2**, 227 (1969).

en azote protéique. Les déterminations d'azote protéique sont effectuées d'après la méthode de Lowry et coll.<sup>24</sup>

#### Préparation des Enzymes $E_{40}^{50}$ (Tableau 1)

Au surnageant post-microsomial (100 ml), on ajoute 28 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40 % de saturation); le précipité obtenu est centrifugé à 10 000 g (15 min). Le culot est dissous dans du tampon B. Au surnageant, on ajoute du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  jusqu'à 80 % de saturation; après centrifugation à 10 000 g (15 min) du précipité, on obtient un deuxième culot que l'on dissout dans le même tampon. La solution obtenue est dialysée pendant 12 hr contre du tampon B. La concentration en azote protéique des préparations obtenues est d'environ 1 mg/ml.

#### Incubations

Aux fractions particulaires obtenues comme il a été décrit plus haut (0,2 mg) on ajoute des enzymes  $E_{40}^{50}$  (0,2 mg) et 0,125 ml de milieu C ( $4 \cdot 10^{-1}$  M Tris, EtSH  $2 \cdot 10^{-2}$  M,  $2 \cdot 10^{-2}$  M nicotinamide,  $3,2 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{Mg}^{++}$ ,  $1,6 \cdot 10^{-2}$  M ATP,  $5 \cdot 10^{-3}$  M NADH (ou NADPH), 3,  $2 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{K}^+$  pH 7,6). Le volume total est de 0,52 ml. On ajoute l'acide mévalonique  $2 \cdot 10^{-4}$  C (1  $\mu\text{c} = 0,16 \mu\text{moles}$ ) et on incube pendant 1 hr à 30° dans un incubateur New-Brunswick. Les incubations sont arrêtées par addition d'un volume d'acétone.

#### Traitements Analytiques des Incubats

On ajoute à chaque tube du squalène (0,8 mg) et du farnésol (0,8 mg) et on chromatographie directement le milieu d'incubation en couche mince de silice (silice G Merck, Darmstadt); on séche soigneusement la plaque grâce à un courant d'azote. On effectue une migration dans un système cyclohexane, acétate d'éthyle 85/15 v/v. Le squalène et le farnésol ajoutés comme entraîneurs sont repérés par projection de chlorhydrate de berbérine (sol. éthanolique 0,1 %) et visualisation à la lumière u.v. (340 nm). La répartition de la radioactivité sur le chromatogramme est déterminée grâce à un lecteur Berthold. Les substances radioactives sont élues de l'adsorbant et la radioactivité de l'élut est mesurée grâce à un compteur Packard 314-E.

#### Identification du Squalène

Le pic de radioactivité obtenu au lecteur Berthold est superposable à la bande de squalène entraîneur rendue visible en lumière u.v. par aspersion à la berbérine; le squalène est extrait de la silice et rechromatographié en couche mince (une migration, cyclohexane/acétate d'éthyle 100/0 v/v). La bande obtenue après révélation ( $R_f = 0,45$ ), nettement distincte des esters de stérols ( $R_f = 0,10$  et des hydrocarbures saturés ( $R_f = 0,75$ ), est superposable au pic unique de radioactivité obtenu. On prépare l'hexachlorosqualane<sup>25</sup> et on recristallise ce dérivé jusqu'à radioactivité constante.

#### Epoxyde-2:3 de Squalène

Au squalène obtenu lors d'une incubation (environ 170 000 dpm) on ajoute 10 mg de squalène non radioactif. On chromatographie soigneusement le mélange comme indiqué plus haut. La radioactivité spécifique du squalène ainsi purifié est de 4450 dpm/ $\mu\text{mole}$ . Le squalène dissous dans le THF (tetrahydrofurane) aqueux (THF/H<sub>2</sub>O 100/5 v/v) et on ajoute 10 mg de N-bromosuccinimide dissoute dans le même solvant (volume total 0,5 ml). On laisse réagir pendant 1 hr à 0°. On chromatographie directement le mélange réactionnel en couche mince (cyclohexane, acétate d'éthyle 85/15 v/v). La bromohydrine obtenue ( $R_f = 0,45$ ) se sépare du squalène n'ayant pas réagi ( $R_f = 0,8$ ). Elle est traitée par 1 ml d'une solution méthanolique de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5 %) pendant 5 hr. On chromatographie directement en couche mince (cyclohexane, acétate d'éthyle 90/10, v/v). L'époxyde-2:3 de squalène ( $R_f = 0,45$ ) est extrait de la silice. Sa radioactivité spécifique est de 4760 dpm/ $\mu\text{mole}$ .

**Remerciements**—Nous remercions Madame P. Schmitt et Mademoiselle P. Fund pour leur excellente collaboration technique.

Ce travail a été entrepris dans le cadre de la R.C.P. No. 34 du C.N.R.S., intitulée: "L'utilisation des tissus végétaux cultivés *in vitro* pour l'étude des produits naturels". Il a également bénéficié d'une subvention du C.E.A., Division de Biologie.

<sup>24</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

<sup>25</sup> I. M. HEILBRON, E. D. KAMM et W. M. OWENS, *J. Chem. Soc.* **1630** (1926).

