

SUR LE STEROL A 26 ATOMES DE CARBONE DE L'ALGUE ROUGE *RHODYMENIA PALMATA**

J. P. FEREZOU, M. DEVYS, J. P. ALLAIS et M. BARBIER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette, France

(Reçu le 2 août 1973. Accepté le 20 septembre 1973)

Key Word Index—*Rhodymenia palmata*; Rhodymeniales; Rhodophyta; red alga; sterols; triterpenes; biosynthesis.

Abstract—Triterpene alcohols and sterols of the red alga *Rhodymenia palmata* have been investigated. Cycloartanol, 31-nor-cycloartanol and the C₂₆ sterol 24-dimethylchola-5,22-diene-3 β -ol (1) have been identified. Feeding experiments have been performed using 1-¹⁴C-acetate, 5-¹⁴C-mevalonic acid or ¹⁴C-methylmethionine. The C₂₇, C₂₈ and C₂₉ sterols incorporate radioactivities but the C₂₆ sterol is unlabelled after each experiment; its possible origin is discussed.

Résumé—Au cours de l'analyse des alcools triterpéniques et des stérols de l'algue rouge *Rhodymenia palmata*, le cycloartanol, le nor-31 cycloartanol, et un stérol à 26 atomes de carbone, le diméthyl-24 choladiène-5, 22 ol-3 β (1) ont été identifiés. Les algues ont été cultivées en présence d'acétate-1-¹⁴C, d'acide mévalonique-5-¹⁴C et de méthionine méthyle-¹⁴C. Une biosynthèse des stérols en C₂₇, C₂₈, C₂₉ est observée mais le stérol en C₂₆ (1) est retrouvé non radioactif après chaque essai; son origine possible est discutée.

INTRODUCTION

LA DÉCOUVERTE de stérols à 26 atomes de carbone chez de nombreuses espèces marines a posé le problème de leur origine biologique. La structure du premier de ces stérols (1) a été établie par Idler *et al.*² puis, par Alcaide *et al.*³ Fryberg *et al.*⁴ en ont réalisé la synthèse. Au cours des dernières années, ce stérol a été identifié chez des Invertébrés marins très divers (voir par exemple⁵⁻⁸). Plus récemment, deux autres stérols en C₂₆ ont été identifiés.^{6,8,9} Cependant, si ces travaux concernent les isolements, structures et synthèses de ces substances, rien n'est encore connu quant à leur origine biologique. Rappelons que le stérol (1) a été identifié à partir d'un phytoplancton marin¹⁰ et que sa présence dans les algues rouges, en particulier dans *Rhodymenia palmata* a été soupçonnée par Idler *et al.*^{2,11,15}

* Partie IX dans la série "Communications sur les stérols en C₂₆". Pour Partie VIII voir. Réf. 1.

¹ METAYER, A. et BARBIER, M. (1973) *Chem. Commun.* 424.

² IDLER, D. R., WISEMAN, P. M. et SAFE, L. M. (1970) *Steroids* **16**, 451.

³ ALCAIDE, A., VIALA, J., PINTE, F., ITOH, M., NOMURA, T. et BARBIER, M. (1971) *Compt. Rend.* **273C**, 1396.

⁴ FRYBERG, M., OEHLSCHLAGER, A. E. et UNRAU, A. M. (1971) *Chem. Commun.* 1194.

⁵ TESHIMA, S. I., KANAZAWA, A. et ANDO, T. (1972) *Comp. Biochem. Physiol.* **41B**, 121.

⁶ KOBAYASHI, M., TSURU, R., TODO, K. et MITSUHASHI, H. (1972) *Tetrahedron Letters* **29**, 2935.

⁷ FEREZOU, J. P., DEVYS M. et BARBIER, M. (1972) *Experientia* **28**, 407.

⁸ ERDMAN, T. R. et THOMSON, R. H. (1972) *Tetrahedron* **28**, 5163.

⁹ VIALA, J., DEVYS, M. et BARBIER, M. (1972) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 3626.

¹⁰ BOUTRY, J. L., ALCAIDE, A. et BARBIER, M. (1971) *Compt. Rend.* **272**, 1022.

¹¹ IDLER, D. R. et WISEMAN, P. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* **38A**, 581.

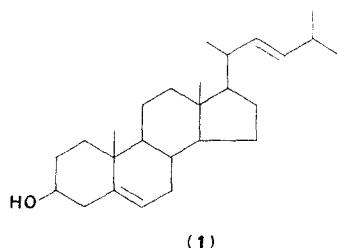
¹² HEILBRON, J. M., PARRY, E. G. et PHIPPS, R. F. (1935) *Biochem. J.* **29**, 1376.

¹³ GIBBONS, G. F., GOAD, L. J. et GOODWIN, T. W. (1967) *Phytochemistry* **6**, 677.

¹⁴ ALCAIDE, A., DEVYS, M. et BARBIER, M. (1968) *Phytochemistry* **7**, 329.

¹⁵ IDLER, D. R. et WISEMAN, P. (1970) *Comp. Biochem. Physiol.* **35**, 679.

Dans une première partie de ce travail, nous avons repris l'analyse des stérols et alcools triterpéniques de cette algue (pour des analyses précédentes voir^{12,14,15}). Les différentes revues parues depuis 1960 sur la biosynthèse des phytostérols (voir par exemple²¹⁻²⁴) témoignent de l'intérêt suscité par ces études; cependant, peu de recherches ont été effectuées concernant les algues.²⁵ Dans le but d'établir une synthèse *de novo* du stérol en C₂₆ (**1**) de *R. palmata*, nous avons d'abord réalisé deux expériences de biosynthèse en utilisant successivement l'acétate-1-¹⁴C et l'acide mévalonique-5-¹⁴C comme précurseurs. Parallèlement, afin de vérifier une hypothèse précédemment émise par Fryberg *et al.*⁴ selon laquelle ce stérol pourrait provenir de la dégradation d'un stérol méthylé en C₂₄, nous avons cultivé *R. palmata* en présence de méthionine-méthyle-¹⁴C; (cette dégradation procéderait par une oxydation des méthyles 26 et 27 suivie d'une double décarboxylation).



RESULTATS

Analyse des stérols et alcools triterpéniques de *Rhodymenia palmata*

Les résultats de ces analyses sont reportés au Tableau 1. Les identifications reposent sur la comparaison des R_f en chromatographie sur couche mince (CCM), des temps de rétention en chromatographie gaz-liquide (CGL)^{16,17} et des spectres de masse des stérols libres ou propionylés, avec ceux d'échantillons authentiques. En accord avec les résultats précédents,¹⁷ il existe une grande proportion de stérols en C₂₇, le plus abondant étant le desmostérol; on constate aussi la présence de cholestérol et de déhydro-22 cholestérol. Les stérols en C₂₈ et C₂₉¹⁴ sont représentés par le fucostérol, le méthylène-24 cholestérol et le brassicastérol.¹⁷ Le stérol en C₂₆ (**1**) a été isolé et identifié. Les R_f de ce stérol et de son propionate en CCM Al₂O₃-AgNO₃ de même que leurs temps de rétention en CGL sont identiques à ceux du stérol (**1**) isolé d'autres invertébrés marins ou obtenu par synthèse.²⁰ Les fragmentations en spectrométrie de masse sont en accord avec les résultats de Idler *et al.*² et de Viala *et al.*^{3,18} En particulier, sur le spectre de masse du stérol libre, l'ion à m/e 300 (M-70) correspond à une fragmentation caractéristique¹⁹ d'un stérol $\Delta_{5,22}$ (rupture C₂₀-C₂₂ avec transfert de H).

¹⁶ PATTERSON, G. W. (1971) *Annal. Chem.* **43**, 1165.

¹⁷ IDLER, D. R. et WISEMAN, P. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* **38A**, 581.

¹⁸ FEREZOU-VIALA, J. (1972) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Orsay.

¹⁹ WYLLIE, S. G. et DJERASSI, C. (1968) *J. Org. Chem.* **33**, 305.

²⁰ METAYER, A. et BARBIER, M. (1973) *Compt. Rend.* **276C**, 201.

²¹ CLAYTON, R. B. (1965) *Quart. Rev.* **19**, 168.

²² GOAD, L. J. (1970) *Natural Substances Formed Biologically from Methylmalonic Acid* (GOODWIN, T. W., ed.). Academic Press, New York.

²³ HEFTMANN, E. (1971) *Lipids* **6**, 128.

²⁴ LEDERER, E. (1969) *Quart. Rev.* **23**, 453.

²⁵ VILLANUEVA, V. R., BARBIER, M. et LEDERER, E. (1964) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1423.

TABLEAU 1. ANALYSE DES STÉROLIS DE *Rhodymenia palmata*

Stérols	%	R_f^*	$R_T \dagger$	M^+	Principales fragmentations des stérols libres par SM
Desmostérol	56	0,40	1,08	384 351: M-CH ₃ -H ₂ O; 299: M-CH ₃ -C ₅ H ₉ -H 271: M-C ₈ H ₁₅ -2H; 255: M-C ₈ H ₁₅ -H ₂ O.	
Cholestérol	20	0,55	1,00	386 275: M-H ₂ O-C ₇ H ₉ ; 255: M-C ₈ H ₁₇ -H ₂ O	
Fucostérol	13	0,44	1,62	412 314: M-C ₇ H ₁₄ 271: M-C ₁₀ H ₁₉ -2H.	
Méthylène-24 cholestérol	2,3	0,21	1,30	398 314: M-C ₆ H ₁₂ 271: M-C ₉ H ₁₇ -2H.	
Brassicastérol	1,03	0,50	1,10	398 300: M-C ₇ H ₁₃ -H; 271: M-C ₈ H ₁₅ -2H 255: M-C ₉ H ₁₇ -H ₂ O	
Déhydro-22 cholestérol	0,70	0,48	0,95	384 300: M-C ₆ H ₁₁ -H; 271: M-C ₈ H ₁₅ -2H. 255: M-C ₈ H ₁₅ -H ₂ O; 273: M-C ₈ H ₁₅ .	
Diméthyl-24 choladiène-5,22 ol-3 β (1)	0,45	0,48	0,68	370 300: M-C ₅ H ₉ -H; 271: M-C ₇ H ₁₃ -2H; 255: M-C ₇ H ₁₃ -H ₂ O; 273: M-C ₇ H ₁₃ .	
Cycloartanol	1,0	0,90	1,95	428 413: M-CH ₃ ; 410: M-H ₂ O; 395: M-CH ₃ -H ₂ O; 288: M-C ₈ H ₁₅ O-H.	
Nor-31 Cyclo- artanol	0,7	0,85	1,60	414 399: M-CH ₃ ; 396: M-H ₂ O; 381: M-CH ₃ -H ₂ O; 288: M-C ₈ H ₁₅ O-H.	
5 α -Cholestanol 3 β	Traces	0,60	1,02	388 275: M-C ₇ H ₁₇ ; 257: M-C ₇ H ₁₇ -H ₂ O.	

* R_f du stérol libre, CCM Al₂O₃-AgNO₃ (3:1) (CHCl₃ éther de pétrole-Me₂CO 6/3/1).

† Temps de rétention relatif du stérol libre. OV 101, 1,3%; 240°. Référence: temps de rétention du cholestérol: 28 mn.

L'analyse des alcools triterpéniques n'a pas permis de retrouver le cycloartanol précédemment mentionné par Alcaide *et al.*¹⁴ Un mélange de cycloartanol et de nor-31 cycloartanol a été isolé; un ion unique à *m/e* 288 dans le spectre de masse du mélange est caractéristique d'un cyclopropane en 9,19 et de chaînes latérales identiques et saturées; ces deux substances ne diffèrent que par le nombre de leurs méthyles en C₄.

TABLEAU 2a. INCORPORATION DE L'ACÉTATE DE SODIUM-1-¹⁴C DANS LES STÉROLIS DE *Rhodymenia palmata*

Fractions	Poids (mg)	Radioactivité totale (dpm)	Radioactivité spécifique (dpm/mg)
Extrait lipidique		$4,5 \times 10^7$	
Insaponifiable	980	$6,45 \times 10^6$	6430
Stérols totaux	85,5	$3,0 \times 10^5$	3550
1 ^{ère} cristallisation	36,5	$1,35 \times 10^5$	3680
2 ^{ème} cristallisation	23	$8,6 \times 10^4$	3710
Eaux mères	49	$1,65 \times 10^5$	3420

Biosynthèse des stérols de *Rhodymenia palmata*

Acéate de sodium-1-¹⁴C et mévalonate-5-¹⁴C. Les résultats de ces deux expériences sont reportés aux Tableaux 2a, 2b, 2c et 3. Les incorporations observées dans les deux cas

TABLEAU 2b. INCORPORATION DE L'ACIDE MÉVALONIQUE-5-¹⁴C DANS LES STÉROLS DE *Rhodymenia palmata*

Fractions	Poids (mg)	Radioactivité totale (dpm)	Radioactivité spécifique (dpm/mg)
Extrait lipidique		1.22×10^6	
Insaponifiable	721	3.45×10^5	490
Stérols totaux	250	2.10×10^5	840
1 ^{ère} cristallisation	110	9.45×10^4	855
2 ^{ème} cristallisation	63,7	5.47×10^4	900
Eaux mères	96,8	1.16×10^5	1200

sont comparables (Tableau 2c) alors que la radioactivité présente dans les extraits lipidiques totaux a été 15 fois plus importante avec l'acétate. La radioactivité des stérols a été mesurée après leur isolement (CCM Al_2O_3 - AgNO_3 des stérols libres ou propionyles puis CGL). Toutes les fractions isolées par CCM se sont montrées radioactives. Celle contenant le stérol C_{26} (1) et le déhydro-22 cholestérol a, de nouveau, été fractionnée par CGL préparative; la super-position du chromatogramme et de la courbe des radioactivités mesurées montre que le stérol C_{26} ne présente pas de radioactivité significative. Le Tableau 3 récapitule les diverses radioactivités mesurées dans les stérols isolés.

TABLEAU 2c. RÉSULTATS COMPARATIFS DES DEUX INCUBATIONS

% d'incorporation dans	Expérience mevalonolactone* (%)	Expérience acétate de Na* (%)
L'extrait	0,42	6,5
Les stérols	0,055	0,045

* Valeurs ramenées à 1 Kg d'algues et à une même radioactivité des précurseurs; on suppose que 50% de l'acide DL-mévalonique sont utilisables.

TABLEAU 3. EXPÉRIENCE AVEC L'ACÉTATE DE SODIUM-¹⁴C: RÉPARTITION DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES DIFFÉRENTS STÉROLS

Stérols	Poids (mg)	Radioactivité totale (dpm)	Radioactivité spécifique (dpm/mg)
Stérols totaux	36,6	1.32×10^5	3680
Desmostérol	18,2	4.1×10^4	2100
Cholestérol	6,9	1.8×10^4	2600
Fucostérol	3,8	2.55×10^4	5700
Méthylène-24 cholestérol	2,3	2.4×10^4	11400
Brassicastérol	1,05	2.1×10^3	2060
Déhydro-22 cholestérol	0,22	3.6×10^3	14000
Stérol C_{26} (1)	0,14	*	*

* Radioactivités peu différentes du bruit de fond.

*Méthionine-méthyle*¹⁴C. Les résultats de cette expérience sont reportés au Tableau 4a et la répartition de la radioactivité dans les différents stérols isolés, au Tableau 4b. Le mélange du stérol C_{26} et du déhydro-22 cholestérol a été fractionné comme ci-dessus; les deux substances ne sont pas radioactives.

TABLEAU 4a. RÉSULTATS DE L'INCORPORATION DE LA MÉTHIONINE-MÉTHYLE-¹⁴C DANS LES STÉROLS DE *Rhodymenia palmata*

Fractions	Poids (mg)	Radioactivité totale (dpm)	Radioactivité spécifique (dpm/mg)
Insaponifiable	1710	2.2×10^6	1200
Stérols totaux	282	3.5×10^5	870
1 ^{ère} cristallisation	212	3.2×10^5	1480
2 ^{ème} cristallisation	160	2.4×10^5	1500

TABLEAU 4b. EXPÉRIENCE AVEC LA MÉTHIONINE-MÉTHYLE-¹⁴C; RÉPARTITION DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES DIFFÉRENTS STÉROLS

Stérols	Poids (mg)	Radioactivité totale (dpm)	Radioactivité spécifique (dpm/mg)
Stérols totaux	211,5	$3,15 \times 10^5$	1500
Stérols C ₂₈ , C ₂₉			
Δ ₅ mono-ènes		$6,5 \times 10^4$	
Méthylène-24 cholestérol	12,6	$5,1 \times 10^4$	3600
Fucostérol	20	$4,2 \times 10^4$	2100
Brassicastérol	6	$2,6 \times 10^4$	4350
Déhydro-22 cholestérol	1,1	*	*
Stérol C ₂₆ (I)	0,8	*	*

* Radioactivités peu différentes du bruit de fond.

DISCUSSION

L'isolement du cycloartanol et du nor-31 cycloartanol met en évidence pour la première fois à notre connaissance, ces intermédiaires de la biosynthèse des stérols en C₂₇ chez une algue rouge. A l'issue des expériences utilisant des précurseurs radioactifs, plusieurs conclusions peuvent être avancées concernant la biosynthèse des stérols en C₂₇, C₂₈ et C₂₉ chez *R. palmata*.

L'incorporation de l'acétate est assez peu homogène dans les divers stérols; ce même résultat est retrouvé lorsque l'acide mévalonique est précurseur. Alors que l'on constate une biosynthèse plus importante des stérols abondants (desmostérol, cholestérol, fucostérol) ceux-ci sont cependant spécifiquement peu marqués ce qui est en faveur d'une accumulation. Par contre, deux stérols mineurs, le méthylène-24 cholestérol et le déhydro-22 cholestérol sont spécifiquement plus marqués alors que leur radioactivité totale est faible. Ceci pourrait être un argument en faveur d'un métabolisme plus intense de ces stérols.

L'incorporation du méthyle de la méthionine dans les stérols en C₂₈ et C₂₉ de *R. palmata* montre l'existence de méthylations biologiques des stérols chez ce végétal.¹³

Nous n'avons pas constaté de biosynthèse du stérol en C₂₆ à partir de l'acétate, de l'acide mévalonique, ou de la méthionine. Plusieurs possibilités peuvent être envisagées pour expliquer son origine chez *R. palmata*. Sa biosynthèse peut être lente ou saisonnière; des variations saisonnières des stérols chez les algues ont en effet été observées.¹⁵ On peut envisager une origine exogène de ce stérol: il serait soit formé dans le milieu marin par dégradation d'autres stérols puis accumulé dans l'algue, soit produit par des microorganismes présents sur l'algue (ceux-ci n'ayant pas survécu aux conditions des expériences).

L'ensemble des caractères originaux des stérols à 26 atomes de carbone rend nécessaires de nouvelles expériences afin d'élucider le problème de leur origine.

PARTIE EXPERIMENTALE

Obtention et analyse des stérols. L'algue *R. palmata* a été lavée à l'eau, séchée, extraite par l'éthanol puis par l'éther en extracteur de Soxhlet. Après saponification, les stérols sont précipités par la digitonine. Un premier fractionnement est obtenu par CCM Al_2O_3 - AgNO_3 ; après propionylation, chaque famille de stérols est de nouveau séparée par CCM Al_2O_3 - AgNO_3 .^{18,26} La chromatographie gaz-liquide a été réalisée sur colonne de OV 101 1,3% sur gas chrom Q à 240°. Les spectres de masse ont été mesurés sur des appareils Atlas CH_4 et AEI MS 9.

Biosynthèses. Toutes les expériences ont été effectuées en eau de mer reconstituée en bacs thermostatés à 16° et aérés par air comprimé. Les algues fraîchement reçues ont été triées et lavées. Les cultures ont duré 8 jours. *Acétate-1-¹⁴C.* On a ajouté 0,2 mCi d'acétate de sodium-1-¹⁴C à 50 l. d'eau de mer et utilisé 1,5 kg d'algues (poids humide). *Acide DL-mévalonique-5-¹⁴C.* 2,5 kg d'algues (poids humide) ont été cultivés dans 50 l. d'eau de mer contenant 0,1 mCi d'acide DL-mévalonique-5-¹⁴C. *Méthionine-méthyle-¹⁴C.* 4,5 kg d'algues fraîches ont été mises en culture dans 100 l. d'eau de mer additionnée de 0,5 mCi de méthionine-méthyle-¹⁴C. Les radioactivités sur CCM ont été contrôlées à l'aide d'un appareil Scanner Berthold LB 2720. Les mesures en solution ont été faites avec un compteur à scintillation Nuclear Chicago Mark I équipé d'un standard externe.

Remerciements--Nous remercions le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions le C.E.A., Saclay, pour des subventions ayant permis l'achat des précurseurs radioactifs et la Station Biologique de Roscoff qui nous a fourni les algues. Nous remercions MM. Cosson, Bardey et Varenne qui ont mesuré les spectres de masse sous la direction du Dr. B. C. Das.

²⁶ FEREZOU, J. P. (1973) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle Orsay.