

STRUCTURE DE TROIS NOUVEAUX "BOTRYOCOCCENES" SYNTHETISES PAR UNE SOUCHE
DE BOTRYOCOCCUS BRAUNII CULTIVEE EN LABORATOIRE.

P. METZGER^{*} et E. CASADEVALL

Laboratoire de Chimie Bioorganique et Organique Physique - ERA CNRS 685
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris 11, rue P. et M. Curie - 75231 PARIS CEDEX 05 -

Abstract - The unicellular alga *Botryococcus braunii* consists of two species that are distinguished on the structure of the hydrocarbons they yield : long unbranched alkadienes and trienes or acyclic triterpenes (botryococcenes). The structures of three botryococcenes : $C_{30}H_{50}$, $C_{31}H_{52}$ and $C_{32}H_{54}$, isolated from a cultured strain, are reported.

La publication récente de la structure d'un hydrocarbure en C_{36} produit par l'algue *Botryococcus braunii* (1), nous incite à rapporter les résultats que nous avons obtenus relatifs à la structure d'autres hydrocarbures synthétisés par cette algue. Quelques précisions sur la souche qui les produit sont également rapportées.

L'algue unicellulaire *B. braunii* se caractérise par des teneurs élevées en hydrocarbures. Elle a été observée dans la nature sous deux formes, l'une verte, l'autre rouge. A partir de prélèvements effectués en milieu naturel, il a été montré que cette algue synthétise deux types d'hydrocarbures.

- hydrocarbures linéaires non ramifiés, C_nH_{2n-2} et C_nH_{2n-4} n impair de 25 à 31.

- hydrocarbures ramifiés polyinsaturés, "botryococcènes", de formule générale C_nH_{2n-10} , $30 \leq n \leq 37$.

Il a été suggéré que ces composés seraient successivement produits par l'algue à des stades différents de sa croissance : diènes et triènes dans une phase verte de croissance active, botryococcènes dans une phase rouge de repos physiologique (2).

Des analyses ultérieures réalisées à partir de matériel récolté sur le terrain, semblaient cependant indiquer que la nature des hydrocarbures ne serait pas liée à l'état physiologique de l'algue (3). Mais la présence d'alcadiènes à l'état de composants mineurs par rapport aux "botryococcènes" pouvait signifier, soit que le métabolisme de l'algue subissait une modification, soit que les populations n'étaient pas homogènes.

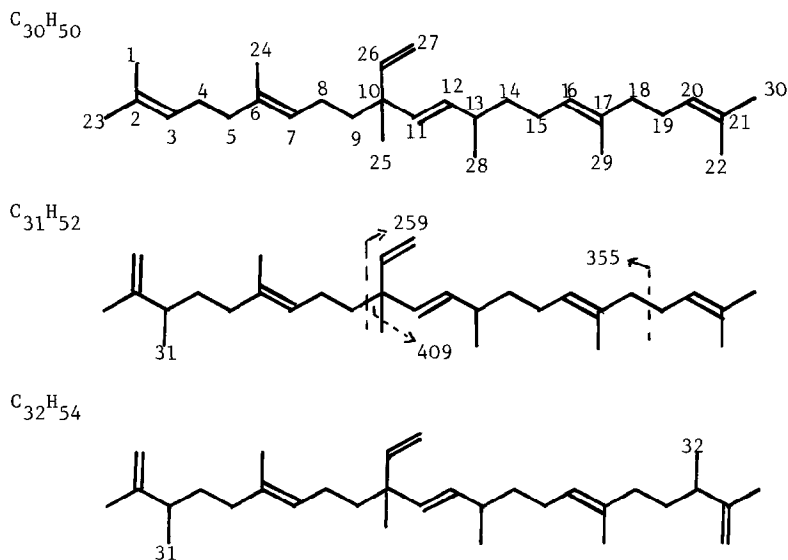
A partir d'échantillons de cette algue récoltés dans diverses zones géographiques (4), nous avons pu isoler et mettre en culture plusieurs souches. L'analyse des hydrocarbures produits en culture par chacune de ces souches a permis d'observer la production pour une souche donnée, à différents stades de son développement, d'un seul type d'hydrocarbures. Il n'y a pas de modification du métabolisme de l'algue qui serait fonction de son état physiologique et qui se traduirait par la production successive de deux types différents d'hydrocarbures. Il semble donc que le nom de *Botryococcus braunii* recouvre deux espèces morphologiquement voisines, sinon identiques, qui se différencient par le type d'hydrocarbures qu'elles

produisent. Disposant d'une souche synthétisant des Botryococcènes en culture (il s'agit à notre connaissance de la première fois que cela est obtenu), nous avons extrait et purifié ces hydrocarbures et déterminé leur structure.

L'extraction et la purification des hydrocarbures produits ont été réalisées comme déjà décrit pour une souche àalcadiènes (5). Les différents hydrocarbures de l'extrait ont été caractérisés par CPV-Masse en utilisant l'ionisation chimique (NH_3) et l'ionisation par impact électronique. Les hydrocarbures ont été séparés par HPLC sur colonne à phase inverse C_{18} phase mobile acétone-acétonitrile 40-60. Les spectres RMN ont été enregistrés à 60 MHz pour le proton, 25,17 MHz pour le ^{13}C , solvant CDCl_3 .

L'analyse CPV-Masse a montré que cette souche produisait et accumulait trois hydrocarbures : $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ (M^+ 410), $\text{C}_{31}\text{H}_{52}$ (M^+ 424), $\text{C}_{32}\text{H}_{54}$ (M^+ 438) dont les proportions relatives à 20 jours de culture sont respectivement 7 - 10 - 83, représentant 31 % du poids sec de l'algue. Comme cela a déjà été observé (3), cette algue produit également du squalène (maximum 1 % du poids sec à 10 jours de culture), mais, contrairement aux hydrocarbures caractéristiques de cette algue, il ne s'accumule pas, étant vraisemblablement métabolisé en stérols via l'époxy-squalène (6).

L'analyse des spectres RMN ^1H apporte quelques informations structurales. Ainsi dans la région 0,90 - 2,60 ppm, on note la présence de signaux de groupes méthyls vinyliques (\neq 1,60 ppm) et non vinyliques (0,9 - 1,1 ppm), de protons méthiniques et méthyléniques allyliques (1,7 - 2,6 ppm). La région des protons oléfiniques est tout aussi complexe, cependant plusieurs types de protons peuvent être distingués : $\text{RR}'\text{C}=\text{CH}_2$ 4,60 ppm ; $\text{RHC}=\text{CH}_2$ 4,80 et 4,90 ppm ; $\text{RCH}_3\text{C}=\text{CHR}''$ 5,10 ppm ; $\text{RCH}=\text{CHR}'$ 5,23 ppm ; $\text{RCH}=\text{CH}_2$ 5,86 ppm. Le signal des protons méthyléniques terminaux $\text{RR}'\text{C}=\text{CH}_2$ est absent sur le spectre de l'hydrocarbure en C_{30} . L'intégration des spectres du C_{31} et du C_{32} montrent par contre qu'un et deux motifs de ce type sont respectivement présents dans ces deux hydrocarbures.



Structure des trois hydrocarbures et fragmentation du $\text{C}_{31}\text{H}_{52}$

N° des carbones	C ₃₀ H ₅₀	C ₃₁ H ₅₂	C ₃₂ H ₅₄
1	17,68	109,31	109,35
2	131,21	150,09	150,01
3	124,36	40,74	40,74
4	26,72	33,37	33,38
5	39,71	37,54	37,52
6	134,65	134,97	134,91
7	124,67 *	124,70 <i>f</i>	124,61 §
8	23,11	23,13	23,13
9	41,29	41,36	41,38
10	42,02	42,01	42,01
11	135,78	135,81	135,81
12	133,70	133,70	133,71
13	36,67	36,75	36,77
14	37,36	37,44	37,45
15	25,79	25,83	25,84
16	124,77 *	124,80 <i>f</i>	124,49 §
17	134,65	134,63	134,91
18	39,71	39,73	37,52
19	26,72	26,76	33,38
20	124,36	124,60	40,74
21	131,21	131,20	150,01
22	17,68	17,68	109,35
23	25,69	18,97	18,96
24	15,95	15,90	15,97
25	23,51	23,58	23,58
26	146,72	146,71	146,70
27	111,06	111,07	111,09
28	21,16	21,14	21,15
29	15,95	15,98	15,97
30	25,69	25,68	18,96
31		19,67	19,68
32			19,68

**f* § Ces attributions peuvent être inversées.

Dans le tableau sont rapportés les déplacements chimiques ^{13}C ; pour une plus grande facilité de comparaison, la numérotation des carbones n'est pas conventionnelle. Les assignations des carbones ont été réalisées à partir des spectres enregistrés en condition d'off-résonance, d'irradiation sélective des protons, et par application d'agent de déplacement pour oléfines : Agfod-Yb(fod)₃ (7). Elles ont été également basées sur celles des carbones du squalène (8) et du botryococcène C₃₄ (9), ainsi que sur les effets de substituants (10).

Le grand nombre de "botryococcènes" isomères produits par cette algue pourrait résulter d'une isomérisation liée, soit à la position des doubles liaisons, soit à la stéréochimie cis ou trans de ces mêmes doubles liaisons.

La comparaison des déplacements chimiques que nous avons obtenus, avec ceux rapportés pour un C₃₄ (8) et un C₃₆ (10) montrent la permanence d'une stéréochimie trans pour la double liaison 11-12 : en effet les carbones allyliques 10 et 13 devraient résonner à champ beaucoup plus faible (-6 ppm) dans le cas d'une stéréochimie cis (11).

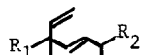
Quelques précisions sur ces structures sont fournies par les spectres de masse : perte du groupe méthyle situé sur le carbone quaternaire saturé (M-15), coupure de la liai-

liaison allylique par rapport à deux doubles liaisons dans le C_{30} et le C_{31} (M-69), c'est-à-dire perte d'une unité isoprène. La présence d'un ion m/e 259 sur le spectre de l'hydrocarbure C_{31} conduit à admettre que le groupe méthyle supplémentaire par rapport au C_{30} n'est pas situé sur la chaîne la plus longue attachée au carbone quaternaire central.

Des caractéristiques communes apparaissent à partir de la comparaison des structures de ces trois hydrocarbures et de celles d'un C_{34} et d'un C_{36} rapportées dans la littérature (1, 9) :

- Le squelette carboné du botryococcène C_{30} est commun à tous ; ces hydrocarbures sont donc des triterpènes plus ou moins méthylés.

- La double liaison 11-12 a une stéréochimie trans et le motif central :



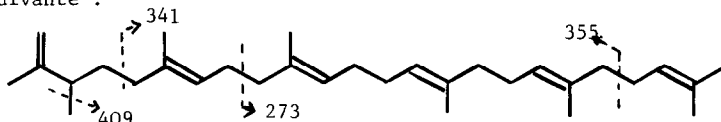
se retrouve dans tous ces hydrocarbures, les méthylations ne prenant place que sur les quatre unités isopréniques terminales (R_1 et R_2).

Les structures d'autres hydrocarbures, $C_{34}H_{58}$, $C_{36}H_{62}$ et $C_{37}H_{64}$, actuellement en cours de détermination présentent les mêmes caractéristiques. C'est pourquoi contrairement aux appellations de quelques auteurs (1, 9), nous préférons attacher le terme de "botryococcènes" à l'ensemble des composés de cette famille, dont le chef de file serait le composé en C_{30} . Les homologues supérieurs en dériveraient par méthylations successives.

En dépit de conditions de culture demeurées strictement identiques, nous avons observé, après un an de maintien en laboratoire, une variation dans le nombre des hydrocarbures produits par cette souche à "botryococcènes". A côté des trois hydrocarbures que nous venons de décrire, un nouvel hydrocarbure en C_{34} décrit dans la littérature sous le nom d'isobotryococcène (3), est synthétisé. Il semble donc que cette souche soit susceptible d'une certaine variabilité.

Références et note

- 1) M.N. GALBRAITH, L. W. HILLEN and L.V. WAKE, *Phytochem.*, **22**, 1441 (1983).
- 2) A.C. BROWN, B.A. KNIGHTS and E. CONWAY, *Phytochem.*, **8**, 543 (1969).
- 3) L.V. WAKE and L.W. HILLEN, *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **32**, 353 (1981).
- 4) E. CASADEVALL, P. METZGER, C. LARGEAU et A. COUTE, *Compte rendu du Colloque sur la Valorisation des végétaux Aquatiques*, Bordeaux, Novembre (1982).
- 5) C. LARGEAU, E. CASADEVALL, C. BERKALOFF and P. DHAMELINCOURT, *Phytochem.*, **19**, 1043 (1980)
- 6) Les index de rétention rapportés au squalène sont les suivants : $C_{30}H_{50}$ -0,74, $C_{31}H_{52}$ -0,81 $C_{32}H_{54}$ -0,88. Un deuxième hydrocarbure en $C_{31}H_{52}$ (index de rétention 1,11) a été détecté à l'état de trace. En première analyse le spectre de masse serait en accord avec la structure suivante :



L'existence, à côté des botryococcènes, de dérivés méthylés du squalène, si elle se vérifie, souligne l'aptitude particulière de cette algue à effectuer des méthylations.

- 7) T.J. WENZEL and R.E. SIEVERS, *Anal. Chem.*, **53**, 393 (1981).
- 8) F.J. WEIGERT, M. JAUTELAT and J.D. ROBERTS, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 1152 (1968).
- 9) R.E. COW, A.K. BURLINGAME and D.M. WILSON, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* p. 284 (1973).
- 10) J.B. STOTHERS, ^{13}C NMR spectroscopy, Academic Press, New-York (1972).
- 11) J. BUS and D.J. FROST, *Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas*, **93**, 213 (1974).
P.E. PFEFFER, F.E. LUDDY, J. UNRUH and J.N. SCHOOLERY, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **54**, 380 (1977).

(Received in France 4 July 1983)