

# Composition stérolique de l'extrait de *Caulerpa taxifolia* récemment introduite en Méditerranée

*Caulerpa taxifolia*  
Ulvophycées  
Stérols  
Clionastérol  
Chimiotaxonomie

*Caulerpa taxifolia*  
Ulvophyceae  
Sterols  
Clionasterol  
Chemotaxonomy

Robert VALLS <sup>a</sup>, Jacques ARTAUD <sup>a</sup>, Albert ARCHAVLIS <sup>b</sup>, Nardo VICENTE <sup>c</sup> et Louis PIOVETTI <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Analyse et de Valorisation des Biomolécules, Institut Universitaire de Technologie de Marseille, B.P. 552, 13388 Marseille Cedex 13, France.

<sup>b</sup> Centre de Résonance Magnétique Nucléaire, ENSSPICAM, Université d'Aix-Marseille III, B.P. 552, 13397 Marseille Cedex 13, France.

<sup>c</sup> Centre d'Études des Ressources Animales Marines, Université d'Aix-Marseille III, B.P. 552, 13397 Marseille Cedex 13, France.

<sup>d</sup> Laboratoire de Recherches de Chimie Marine des Organométalliques, Université de Toulon et du Var, B.P. 132, 83957 La Garde Cedex, France.

Reçu le 22/10/93, révisé le 11/01/94, accepté le 14/01/94.

## RÉSUMÉ

La composition stérolique de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh (Ulvophycées, Caulerpales), algue verte récemment introduite en Méditerranée, se caractérise par la présence d'un stérol majoritaire, le clionastérol, accompagné de petites quantités de cholestérol, 24-méthyl-cholestérol, 24-méthylène-cholestérol, 24Z-éthylidène-cholestérol. Le clionastérol, présent dans plusieurs autres espèces de *Caulerpa*, peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique du genre.

*Oceanologica Acta*, 1994. 17, 2, 223-226.

## ABSTRACT

Sterolic composition of the lipid extract of *Caulerpa taxifolia* recently introduced in the Mediterranean Sea

The sterolic composition of *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh (Ulvophyceae), a green alga recently introduced in the Mediterranean sea, is characterized by the presence of a major sterol, clionasterol, with small amounts of cholesterol, 24-methyl-cholesterol, 24-methylene-cholesterol, 24Z-ethylidene-cholesterol. The clionasterol present in some other *Caulerpa* species seems to be a chemotaxonomic marker in the genus *Caulerpa*.

*Oceanologica Acta*, 1994. 17, 2, 223-226.

## INTRODUCTION

Le genre *Caulerpa* (ulvophycées, ordre des Caulerpales, famille Caulerpacées) est représenté par environ soixante espèces largement répandues dans les eaux tropicales et subtropicales (Levring *et al.*, 1969). Cinq espèces de

*Caulerpa* vivent en Méditerranée : *C. prolifera* (la plus commune), *C. ollivieri*, *C. racemosa*, *C. mexicana*, *C. flagelliformis* (Meinesz et Hesse, 1991). Depuis 1984, une espèce tropicale, *C. taxifolia* (Vahl) C. Agardh, introduite accidentellement, est signalée sur les côtes méditerranéennes françaises (Meinesz et Hesse, 1991). Son exten-

sion semble importante et exige une étroite surveillance car l'algue est toxique en raison de la présence d'un sesquiterpénoïde acétylénique, la caulerpényne (Paul et Fenical, 1986) et d'aldéhydes terpéniques (Guerrero *et al.*, 1992).

Goad (1976) a montré l'intérêt chimiotaxonomique et phylogénétique de l'étude de la composition stérolique des algues.

Ainsi, les rodophycées sont caractérisées par la présence de cholestérol. Dans certaines espèces ce stérol est accompagné de desmostérol et dans d'autres, mais très rarement, le stérol principal est le 22-déhydrocholestérol. Dans le cas des phéophycées, le fucostérol est le stérol prédominant, souvent associé à des précurseurs biosynthétiques tels que le 24-méthylène-cholestérol.

La composition stérolique des ulvophycées est beaucoup plus complexe et variée que celle des rhodophycées et des phéophycées (Patterson, 1971). Ainsi, les algues vertes peuvent contenir des stérols aussi divers que le clionastérol, le clérostérol, le chondrillastérol, le poriférostérol, le 28-isofucostérol, l'ergostérol, le cholestérol... Les siphonales et les caulerpales présentent une composition stérolique contrastée. Le clérostérol (24(S)-éthyl-cholestadiène-5, 25-ol-3 $\beta$ ) est le stérol caractéristique du genre *Codium* tandis que le clionastérol (24(S)-éthyl-cholestène-5-ol-3b) prédomine dans *Bryopsis plumosa*, *B. muscosa*, *Halimeda incrassata*, *H. tuna*, *Udotea petiolata* (Doty et Aguillar-Santos, 1970). La littérature indique des compositions stéroliques diverses pour le genre *Caulerpa*. De Napoli *et al.* (1982) trouvent du clionastérol dans *C. prolifera* de Méditerranée, tandis que Doty et Aguillar-Santos (1970) concluent à la présence de  $\beta$ -sitostérol (24(R)-éthyl-cholestène-5-ol-3 $\beta$ ) dans quatre espèces de *Caulerpa* tropicales : *C. lamourouxii*, *C. lentillifera*, *C. racemosa*, *C. sertularioides*. Il faut souligner également la mise en évidence du clionastérol chez *Caulerpa taxifolia* de la côte indienne (Bheemasankara Rao et Pullaiah, 1981).

Nous décrivons dans cet article la composition stérolique de *Caulerpa taxifolia*, récemment introduite en Méditerranée. Ce travail a été entrepris avec un double objectif : 1) compléter l'étude des stérols dans le genre *Caulerpa*, et si possible dissiper quelques incohérences rencontrées dans la littérature au niveau de ces composés ; 2) vérifier si la composition stérolique de l'algue n'était pas affectée par son adaptation à son nouveau milieu.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

*Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh a été récoltée, en avril et en juin 1992, sur les côtes méditerranéennes françaises (cap Martin) à une profondeur de 10 m.

### Étalons

Les stérols étalons sont commerciaux : cholestérol, stig-mastérol, sitostérol (Fluka, Buchs, Suisse) ou préparés au

laboratoire à partir d'algues dans des travaux précédents : 24-méthylène-cholestérol (*Laminaria digitata*), clionastérol (*Halimeda tuna*), clérostérol (*Codium bursa*), 28-isofucostérol (*Ulva rigida*). Le campestérol provient de la fraction stérolique d'une huile de colza (*Brassica napus*).

### Extraction et purification des stérols

19,08 g de *C. taxifolia* triée, lavée et séchée à l'étuve ventilée à 40°C sont extraits au Soxhlet par du dichlorométhane. 688 mg d'extrait sont saponifiés par 10 ml de potasse éthanolique 2M pendant une heure. Le mélange réactionnel placé dans 20 ml d'eau est extrait par quatre fois 20 ml d'éther diéthylique. La phase étherée lavée et séchée est fractionnée par CLHP sur une colonne semi-préparative de silice (5  $\mu$ m, L = 25 cm,  $\Phi_{int}$  = 1 cm) à l'aide d'un mélange hexane/acétate d'éthyle (2/3, v/v) ; (pompe : Merck L6000, 3 ml.min<sup>-1</sup> ; détection : réfractomètre Biscoff RI 8110). La fraction stérolique est purifiée dans les mêmes conditions à l'aide d'un mélange hexane/acétate d'éthyle (1/4, v/v).

### Dosage des stérols totaux

Les stérols totaux sont dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur colonne de silice (Pioveti *et al.*, 1991) à l'aide de 2-méthyl-butane-2-ol utilisé comme étalon interne. L'éluant est le mélange binaire hexane/acétate d'éthyle (3/1, v/v).

### Acétylation de la fraction stérolique

10 mg de stérols sont traités à température ambiante pendant 12 h par 2 ml d'un mélange anhydride acétique/pyridine (1/1, v/v).

### Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des stérols

Les stérols acétylés sont analysés par CPG (appareil Delsi) sur une colonne capillaire de DB1 (JW) (L = 30 m,  $\Phi_{int}$  = 0,32 mm,  $e_f$  = 0,25  $\mu$ m) (injecteur à aiguille); températures injecteur, détecteur, four respectivement 280°C, 300°C, 300°C ; gaz vecteur : dihydrogène P = 0,8 bar.

### Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du <sup>13</sup>C ont été enregistrés sur un appareil Bruker AMX-400 dans le deutérochloroforme. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

## RÉSULTATS

*C. taxifolia*, traitée par du dichlorométhane, donne un extrait (6,5 % p/p de l'algue sèche) qui est saponifié par de

la potasse éthanolique. L'insaponifiable (3,6 % p/p de l'extrait) est fractionné puis purifié par chromatographie liquide. La teneur en stérols totaux déterminée par CLHP (Pioveti *et al.*, 1991) est de 1 109 mg.kg<sup>-1</sup> d'algue sèche. La fraction stérolique purifiée par CLHP est acétylée avant d'être analysée par chromatographie gaz-liquide. Le chromatogramme obtenu révèle la présence d'un stérol principal accompagné de quatre stérols mineurs. L'identification est réalisée par comparaison des temps de rétention relatifs ( $t_{RR}$ /acétate de cholestérol) à ceux de composés étalons (tab. 1).

Le stérol principal est un 24 $\xi$ -éthyl-cholestérol (clérostérol, clionastérol ou  $\beta$ -sitostérol) accompagné de petites quantités de cholestérol, 24-méthylène-cholestérol, 24 $\xi$ -méthyl-cholestérol et 24Z-éthylidène-cholestérol. La chromatographie phase gazeuse ne permettant pas de conclure sur la nature exacte du 24 $\xi$ -éthyl-cholestérol, son spectre RMN <sup>13</sup>C a été enregistré ainsi que ceux d'étalons de clionastérol et de  $\beta$ -sitostérol. Le tableau 2 rassemble l'ensemble des résultats.

Tableau 1

Composition stérolique de *Caulerpa taxifolia* : <sup>a</sup>sous forme acétate ; <sup>b</sup> $t_{RR}$ /acétate de cholestérol sur colonne de DB<sub>1</sub>.

*Sterolic composition of Caulerpa taxifolia: <sup>a</sup>as acetate; <sup>b</sup> $t_{RR}$ /cholesterol acetate on DB<sub>1</sub> column.*

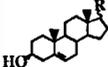
Stérols <sup>a</sup>	Noyau	Chaîne latérale R	$t_{RR}$ <sup>b</sup>	mg/kg Algue sèche
Cholestérol			1,00	11
24-méthylène-cholestérol			1,24	24
24 $\xi$ -méthyl-cholestérol			1,26	18
clionastérol			1,55	1042
24(Z)-éthylidène-cholestérol			1,60	14
$\beta$ -sitostérol			1,55	---
clérostérol			1,55	---

Tableau 2

RMN <sup>13</sup>C du clionastérol et du  $\beta$ -sitostérol : <sup>a</sup>100,3 MHz ; <sup>b</sup>25,16 MHz.

<sup>13</sup>C NMR spectra of clionasterol and  $\beta$ -sitosterol: <sup>a</sup>100.3 MHz; <sup>b</sup>25.16 MHz.

CARBONES	DÉPLACEMENTS CHIMIQUES EN PPM (SELON WRIGHT <i>et al.</i> , 1958) <sup>b</sup>		DÉPLACEMENTS CHIMIQUES EN PPM (SELON LES RÉSULTATS DE CE TRAVAIL) <sup>a</sup>	
	<sup>a</sup> Clionastérol	$\beta$ -sitostérol	Clionastérol	$\beta$ -sitostérol
C-1		37,31		37,29
C-2		31,57		31,67
C-3		71,69	71,85	71,80
C-4		42,25		140,78
C-5		140,76		121,73
C-6		121,59		121,73
C-7		31,92		31,94
C-8		31,92		50,17
C-9		50,17		50,17
C-10		36,51		36,53
C-11		21,11		21,11
C-12		39,81		39,81
C-13		42,33		42,32
C-14		56,79		56,79
C-15		24,32		24,33
C-16		28,26		28,27
C-17		56,11		56,08
C-18		11,87		11,88
C-19		19,40		19,41
C-20	36,29		36,30	36,18
C-21		18,82	18,85	18,81
C-22		33,95	33,95	33,98
C-23	26,43		26,42	26,12
C-24	46,07		46,10	45,87
C-25	28,98		28,98	29,18
C-26	19,07		19,00	19,84
C-27	19,62		19,62	19,06
C-28		23,09	23,05	23,10
C-29		12,32	12,34	12,00

<sup>a</sup>100,3 MHz ; <sup>b</sup>25,16 MHz.

## DISCUSSION

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du 24 $\xi$ -éthyl-cholestérol montre l'existence de deux carbones éthyléniques (C-5 : 140, 78 ppm et C-6 : 121,74 ppm), ce qui permet d'éliminer l'hypothèse de la présence du clérostérol qui en possède quatre. De plus, l'étude des déplacements chimiques des carbones permet de préciser la configuration du carbone C-24 (Akihisa, 1989) : l'examen des valeurs montre qu'il ne peut s'agir du  $\beta$ -sitostérol, car les déplacements chimiques obtenus diffèrent de ceux d'un échantillon étalon de  $\beta$ -sitostérol. Il s'agit donc du clionastérol, en raison notamment de l'identité des déplacements chimiques des carbones C-20 et C-23 à C-27 par rapport à ceux de la littérature (Wright *et al.*, 1978), et à ceux trouvés pour un étalon de clionastérol que nous avons isolé d'*Halimeda tuna* [chlorophycée (Fattorusso *et al.*, 1980)]. Les variations de déplacements chimiques des carbones de la chaîne latérale résultent uniquement de la différence de configuration du carbone C-24 existant entre les deux composés.

Le clionastérol est donc le stérol majoritaire de *C. taxifolia* et *C. prolifera*. La composition trouvée est voisine de celle de *C. prolifera*, seule espèce de *Caulerpa* méditerranéenne à avoir été étudiée au niveau des stérols. Les quatre espèces de *Caulerpa* étudiées par Doty et Aguillar-Santos (1970) contiennent très probablement du clionastérol et non du  $\beta$ -sitostérol comme cela a été indiqué par ces auteurs. En effet, la technique analytique utilisée dans leur étude (C.C.M.) ne permet pas de distinguer les deux

épimères. De plus, le  $\beta$ -sitostérol, caractéristique de la plupart des phanérogames terrestres et marines (Iatrides *et al.*, 1983), n'a jamais été rencontré dans les algues. Les stérols des algues sont caractérisés par une configuration S du carbone C-24, tandis que ceux des plantes supérieures ont principalement une configuration R (Patterson, 1971).

En conclusion, le clionastérol est le stérol principal de *C. taxifolia* nouvellement implantée en Méditerranée et il est associé à de petites quantités de cholestérol, 24-méthylcholestérol, 24-méthylène-cholestérol et 24Z-éthylidène-cholestérol.

Ces résultats nous amènent à penser que le  $\beta$ -sitostérol trouvé dans quatre *Caulerpa* tropicales par Doty et Aguillar-Santos (1970) est en réalité du clionastérol. D'autre part, l'adaptation de l'algue dans son nouveau milieu ne semble pas avoir affecté sa composition en composés stéroliques. Le clionastérol est également le stérol majoritaire d'un spécimen récolté sur la côte indienne (Bheemasankara Rao et Pullaiah, 1981). Cela conforte notre idée que ce composé pourrait être utilisé comme marqueur chimiotaxonomique du genre *Caulerpa*.

## Remerciements

Cette recherche a été financée par un contrat européen CEE DGXI LIFE.

## RÉFÉRENCES

- Akihisa T. (1989). *Analysis of sterols and other biologically significant sterols*, W.D. Nes and E.J. Parish, éditeurs. Academic Press, San Diego, USA, 251 pp.
- Bheemasankara Rao C. and C. Pullaiah (1981). Chemical Examination of Marine Algae of Visakhapatnam Coast : Constituents of *Caulerpa taxifolia*. *Indian J. Chem.*, **21B**, 264-265.
- De Napoli L., S. Magno, L. Mayol et E. Novellino (1982). Sterol Composition of Some Mediterranean Green Algae. *Phytochemistry*, **21**, 1993-1994.
- Doty M.S. et G. Aguillar-Santos (1970). Transfer of Toxic Alga Substances in Marine Food Chains. *Pacif. Sci.*, **24**, 3, 331-355.
- Fattorusso E., S. Magno et L. Mayol (1980). Sterols of Mediterranean Chlorophycées. *Experientia*, **36**, 1137-1138.
- Goad L.J. (1976). *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, vol. III, D.C. Malins and J.R. Sargent, éditeurs. Academic Press, New York, USA, 213 pp.
- Guerrero A., A. Meinesz, M. D'Ambrosio et F. Pietra (1992). Isolation of Toxic and Potentially Toxic Sesqui- and Monoterpenes from the Tropical Green Seaweed *Caulerpa taxifolia* Which Has Invaded the Region of Cap Martin and Monaco. *Helvet. chim. Acta*, **75**, 689-695.
- Iatrides M.C., J. Artaud et N. Vicente (1983). Composition en stérols de végétaux marins méditerranéens. *Oceanologica Acta*, **6**, 1, 73-77.
- Levring T., H. Hoppe et O.J. Schmid (1969). *Marine algae*. Cram de Gruyter, Hamburg, Germany, 128 pp.
- Meinesz A. et B. Hesse (1991). Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanologica Acta*, **14**, 4, 415-426.
- Patterson G.W. (1971). The distribution of sterols in algae. *Lipids*, **6**, 120-127.
- Paul V.J. et W. Fenical (1986). Chemical defense in tropical green algae, Order Caulerpales. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **34**, 157-169.
- Piovetti L., P. Deffo, R. Valls et G. Peiffer (1991). Determination of Sterols and Diterpenoids from the Brown Algae (Cystoseiraceae). *J. Chromatogr.*, **588**, 99-105.
- Wright J.L.C., A.G. Mc Innes, S. Shimizu, D.G. Smith, J.A. Walter, D. Idler et W. Khalil (1978). Identification of C<sub>24</sub> alkyl epimers of marine sterols by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.*, **56**, 1898-1903.