

RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE MOLÉCULAIRE ET LE POUVOIR INHIBITEUR DES NITRO- ET HALOPHÉNOLS

par

R. H. DE DEKEN

*Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles
et Service de Recherches du C.E.R.I.A., Bruxelles (Belgique)*

INTRODUCTION

Plusieurs auteurs ont mesuré l'activité inhibitrice de dérivés nitrés et halogénés du phénol¹⁻⁵. A notre connaissance, aucune relation n'a pu être établie entre l'activité inhibitrice d'un phénol et sa structure moléculaire. Les travaux de KRAHL^{2, 3} nous ont cependant fait entrevoir une relation entre le pouvoir inhibiteur et la mobilité du proton de la fonction phénol. Ces travaux nous ont incité à faire une étude systématique du pouvoir inhibiteur de nombreux dérivés du phénol⁶.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

La plupart des phénols utilisés étaient des produits Eastman Kodak, purifiés par recristallisation ou distillation sous pression réduite.

Le pouvoir inhibiteur de chaque substance a été mesuré en déterminant les concentrations nécessaires pour inhiber de 50 % les phosphorylations et la fermentation d'une souche pure de levure. Les phosphorylations (estérification d'orthophosphate radioactif ³²P) et la vitesse de fermentation étaient mesurées simultanément par une technique qui est essentiellement celle mise au point par SPIEGELMAN⁷. En voici les détails: Composition des solutions utilisées:

(1) Tampon phthalate acide de potassium — hydroxyde de potassium, de pH 4.5 et 0.05 *M* en phthalate, contenant du phosphate monopotassique de concentration *M*/50.

(2) Milieu nutritif: glucose, 2 g; sulfate de potassium, 1 g; phosphate monopotassique *M*/50, 10 ml.

(3) L'orthophosphate radioactif est mis en solution dans du phosphate monopotassique *M*/50 et la radioactivité ajustée à 250,000 C/m pour 0.1 ml environ.

(4) Chaque phénol est mis en solution dans du phosphate monopotassique *M*/50 et le pH est ajusté à 4.5. La concentration de cette solution est de 22 fois la concentration finale désirée.

Technique opératoire

Des cellules de levure cultivées en anaérobiose et lavées par du tampon au phthalate sont mises en suspension dans ce même tampon, de façon à obtenir 87.7 mg de poids sec de levure par 100 ml de tampon. La vitesse de fermentation est mesurée dans l'appareil de Warburg à 30° C, avec:

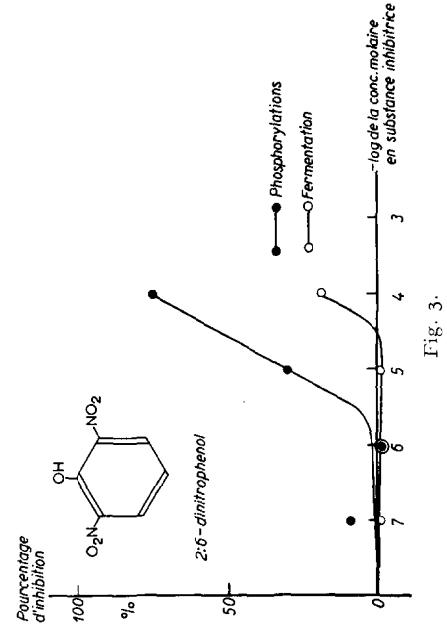
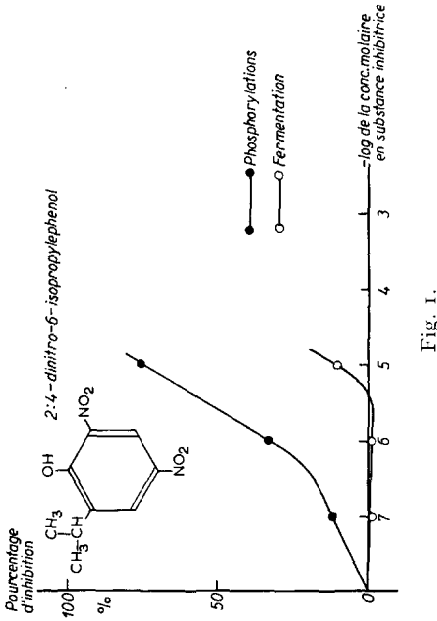
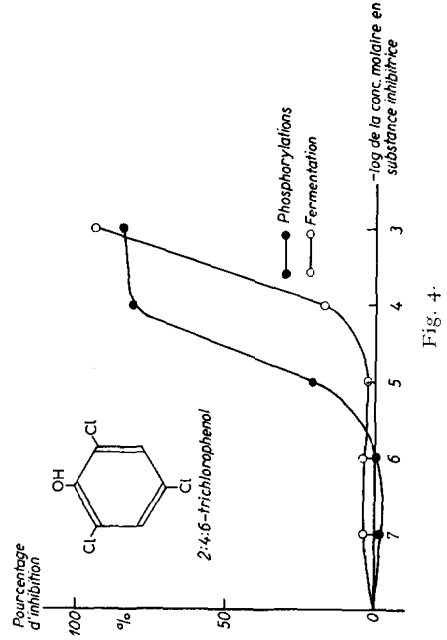
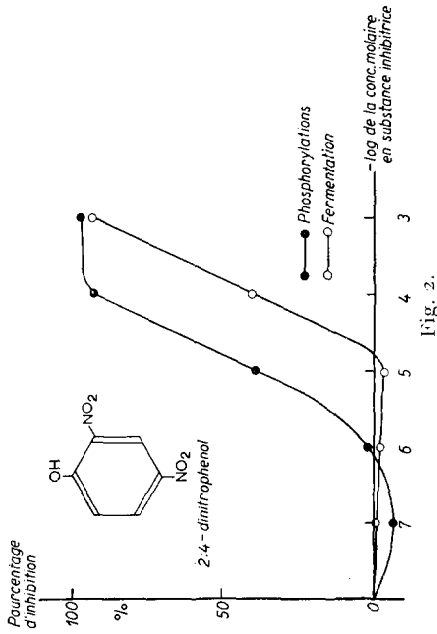
- 1.8 ml de la suspension de levure
- 0.2 ml de milieu nutritif
- 0.1 ml de la solution de phénol testée
- 0.1 ml de la solution d'orthophosphate radioactif.

Atmosphère: azote exempt d'oxygène.

Le ³²P est additionné lorsque le dégagement d'anhydride carbonique est constant; après 30 minutes de fermentation en présence de ³²P, les cellules sont refroidies à 0° C, transvasées quantitativement, et lavées à l'aide de tampon au phthalate, afin d'éliminer le ³²P adsorbé⁸. La radioactivité des cellules est mesurée au compteur de Geiger-Müller.

Lorsque les essais sont effectués à un pH supérieur à 4.5, l'atmosphère manométrique est constituée par de l'azote contenant 5 % de CO₂ en volume et le tampon est additionné de la quantité adéquate de bicarbonate de soude⁹. A pH 4, un tampon au succinate a été utilisé.

Bibliographie p. 502.



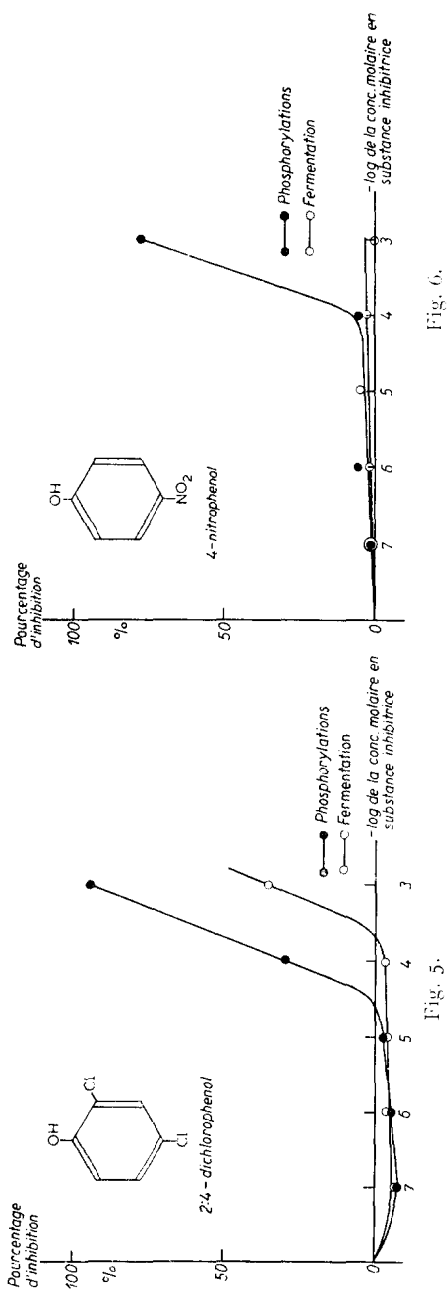


Fig. 6.

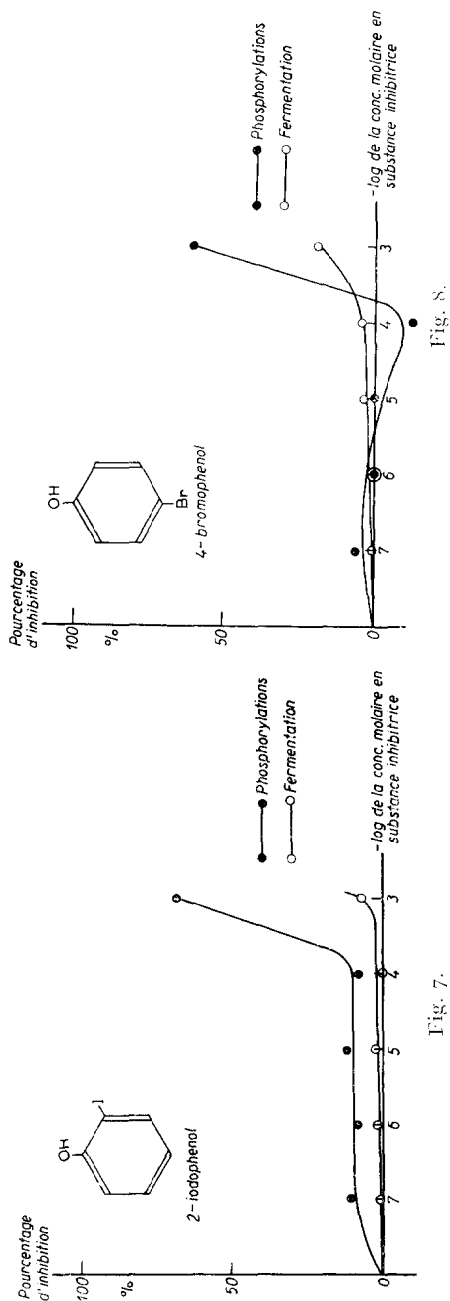
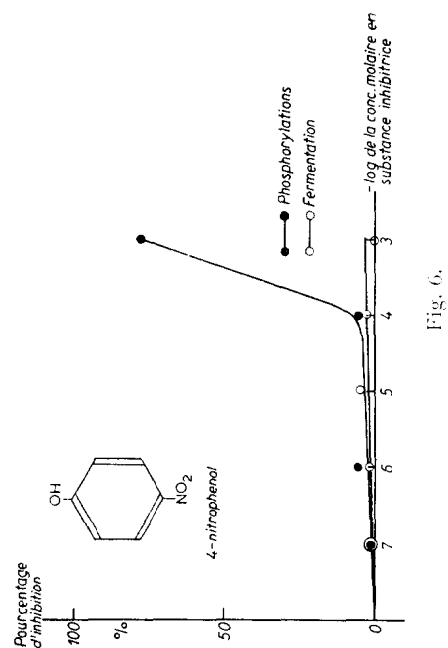
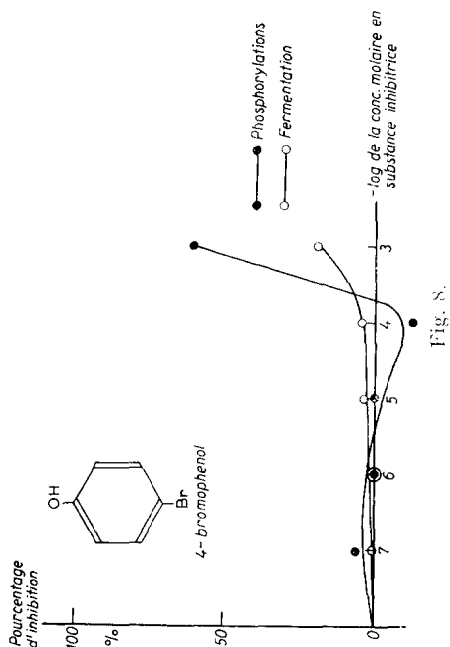


Fig. 8.



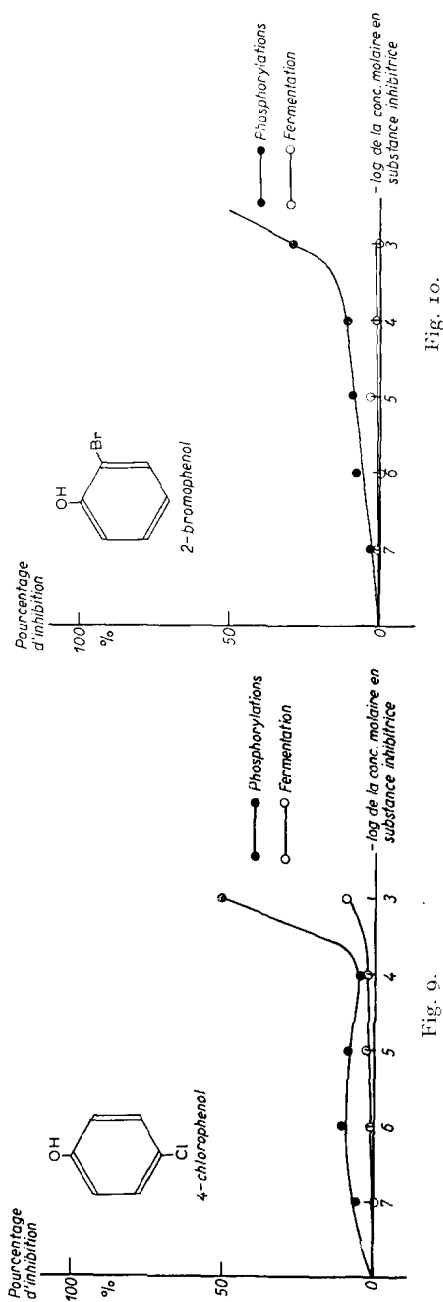
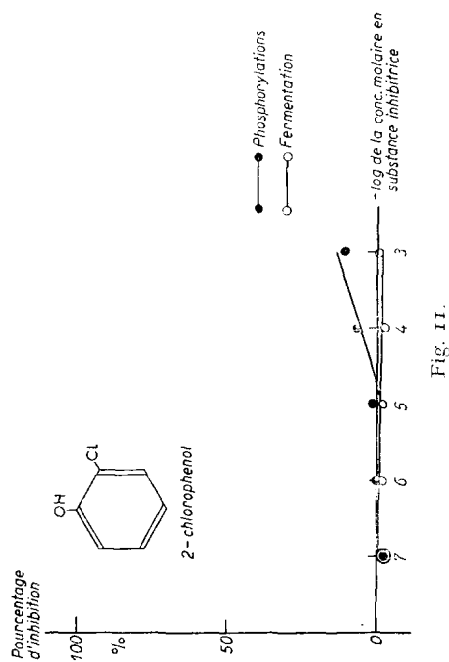
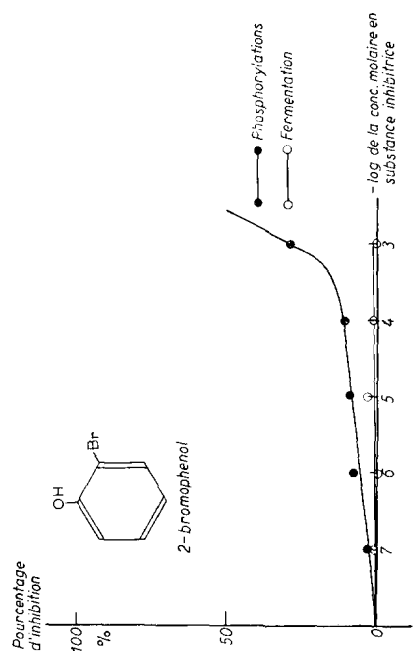


Fig. 10.



L'inhibition de la vitesse de fermentation ($Q_{CO_2}^{N_2}$) déterminée par une concentration donnée d'un phénol est mesurée par comparaison avec le ($Q_{CO_2}^{N_2}$) d'un témoin n'ayant pas reçu le phénol. Le résultat est exprimé en % d'inhibition.

Il en est de même pour les phosphorylations (radioactivité des cellules témoins = 100 %).

Les résultats sont exprimés graphiquement (voir figures): % d'inhibition en fonction de $-\log$ de la concentration de l'inhibiteur. Par interpolation, on détermine les concentrations de phénol inhibant soit les phosphorylations, soit la fermentation à raison de 50 %: ces valeurs sont appelées *concentrations critiques*.

RÉSULTATS

Les résultats sont donnés par le Tableau I: les substances y sont classées par ordre d'activités inhibitrices décroissantes; les pK des principaux dérivés du phénol sont également rapportés. A titre d'exemple, certains résultats sont présentés graphiquement (Figs. 1 à 11).

Le Tableau II rapporte les concentrations critiques du 2:4-dinitrophénol pour différentes valeurs du pH extracellulaire entre pH 4 et 6. Exprimées en molécules non dissociées, les concentrations critiques sont constantes quel que soit le pH: le 2:4-dinitrophénol pénètre donc dans la cellule sous forme de molécule non dissociée, comme on l'a signalé précédemment^{14, 15, 1, 16, 17, 18}.

DISCUSSION

Globalement, le pouvoir inhibiteur est une fonction inverse du pK , avec cette réserve, toutefois, que les substances qui possèdent un pont d'hydrogène intramoléculaire (chélation) sont moins inhibitrices que ne le fait prévoir la valeur de leur pK^* . Les principaux cas appartenant à cette catégorie sont: l'orthonitrophénol qui est beaucoup moins actif que le dérivé para (Fig. 12); parmi les monochlorophénols, c'est le dérivé ortho qui est le moins actif, quoique le plus acide (Fig. 13). De même, l'orthobromophénol est moins inhibiteur que son isomère para; le 2:6-dinitrophénol est moins inhibiteur que le 2:4-, quoique plus acide (Fig. 14). Enfin, le 2:4:6-trichlorophénol est moins actif que son isomère 2:4:5-, quoique ce dernier soit l'acide le plus faible (Fig. 15).

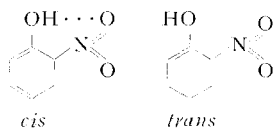


Fig. 12.

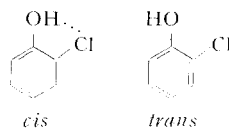


Fig. 13.

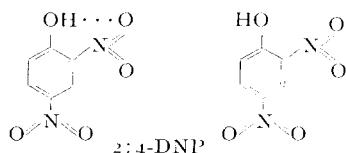
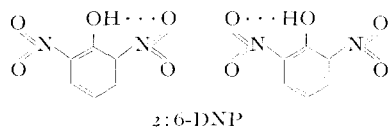


Fig. 14.

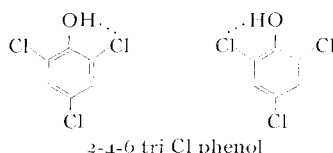
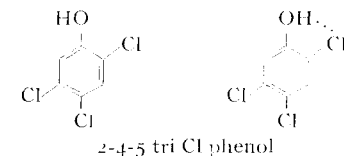


Fig. 15.

* Au sujet de la liaison d'hydrogène, voir PAULING¹⁹ et les travaux de WULF *et al.*²⁰.

TABLEAU I

Nom de la substance	Concentrations critiques inhibant les phosphorylations (en M/l)	Concentrations critiques inhibant la fermentation (en M/l)	Valeurs des pK			
			(10)	(11)	(12)	(13)
2:4-dinitro 6-éthyle phénol	$1.2 \cdot 10^{-6}$	—			4.55	
2:4-dinitro 6-isopropyle phénol	$2.5 \cdot 10^{-6}$	—			4.60	
2:4-dinitro 6-méthyle phénol	$4 \cdot 10^{-6}$	$5.5 \cdot 10^{-5}$			4.40	
2:4:5-trichlorophénol	$1.1 \cdot 10^{-5}$	—				
2:4-dinitrophénol	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-4}$	4.0			
2:6-dinitrophénol	$2.8 \cdot 10^{-5}$	—	3.7			
2:4:6-trichlorophénol	$2.9 \cdot 10^{-5}$	$2.8 \cdot 10^{-4}$		6.42		
2:4-dichlorophénol	$2 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-3*}$		7.75		
para nitrophénol	$4.3 \cdot 10^{-4}$	—	7.01			
ortho iodophénol	$6 \cdot 10^{-4}$	—				
para bromophénol	$7.2 \cdot 10^{-4}$	—				
ortho nitrophénol	$7.2 \cdot 10^{-4}$	—	7.12			
para chlorophénol	$1 \cdot 10^{-3}$	—		9.18		
méta nitrophénol	$1 \cdot 10^{-3}$	—	8.0			
ortho bromophénol	$2.7 \cdot 10^{-3*}$	—	8.42			
acide salicylique	$5.7 \cdot 10^{-3*}$	—				13.0
méta chlorophénol	$1 \cdot 10^{-2*}$	—		8.86		
ortho chlorophénol	—	—		8.49		
2:3:5-triméthyle phénol	—	—				
2:4-dinitro 6-carboxyle phénol (ac. dinitrosalicylique)	—	—			7.20	
acide picrique**	—	—	0.80			
para aminophénol	—	—				
phénol	—	—	9.77			

* Valeurs obtenues par extrapolation.

** L'acide picrique, totalement dissocié à pH 4.5, n'est pas inhibiteur, ne pouvant pénétrer dans la cellule sous cette forme.

TABLEAU II

CONCENTRATIONS CRITIQUES DU 2:4-DINITROPHÉNOL POUR DIFFÉRENTES VALEURS DU pH

pH	Concs. critiques d'inhibition des phosphorylations		Concs. critiques d'inhibition de la fermentation	
	en M/l	en M non dissociées/l	en M/l	en M non dissociées/l
4.0	$7.6 \cdot 10^{-6}$	$3.8 \cdot 10^{-6}$	$6.6 \cdot 10^{-5}$	$3.3 \cdot 10^{-5}$
4.5	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$3.8 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^{-4}$	$3.8 \cdot 10^{-5}$
5.0	$3.6 \cdot 10^{-5}$	$3.3 \cdot 10^{-6}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-5}$
5.5	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$3.6 \cdot 10^{-6}$	$7.3 \cdot 10^{-4}$	$2.2 \cdot 10^{-5}$
6.0	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$3.4 \cdot 10^{-6}$	—	—
Moyennes:		$3.6 \cdot 10^{-6}$		$3.0 \cdot 10^{-5}$

L'acide dinitrosalicylique est également le siège d'une forte liaison d'hydrogène: à ce sujet, voir la note ci-dessous.

Le pouvoir inhibiteur est donc fonction de la *mobilité vraie* du proton de la fonction phénol.

Comme dans les travaux de GALE²¹ relatifs à l'inhibition du métabolisme de l'acide glutamique par les dérivés du triphénylméthane, la liposolubilité de la molécule est un facteur important pour sa pénétration dans la cellule. On remarque, en effet, que les dérivés du 2:4-dinitrophénol portant un groupe alkyle en position 6 sont tous plus actifs

que le 2:4-dinitrophénol, malgré une élévation progressive du pK . L'ordre des activités est le suivant: $C_0 < C_1 < C_2 > C_3$. Il y a sans doute compétition entre les conséquences de la liposolubilité et de l'augmentation de pK .

On remarque, de même, que, à pK égal, un halophénol est plus inhibiteur qu'un nitrophénol ou, inversement, à pouvoir inhibiteur égal (même concentration critique), le phénol halogéné possède un pK plus élevé que le nitrophénol. Ainsi, l'orthoiodophénol (pK 8.25) est plus inhibiteur que le métanitrophénol (pK 8), tandis que le 2:4:6-trichlorophénol (pK 6.42) est aussi inhibiteur que le 2:6-dinitrophénol (pK 3.7). De même, le 2:4:5-trichlorophénol ($pK > 6.5$) a le même pouvoir inhibiteur que le 2:4-dinitrophénol (pK 4). Enfin, l'orthonitrophénol, le parachlorophénol et le métanitrophénol ont des activités du même ordre de grandeur malgré le pK nettement plus élevé du parachlorophénol. Or, d'une façon générale, tous les halophénols sont beaucoup plus liposolubles que les dérivés nitrés. Le Tableau III présente quelques données quantitatives à ce sujet et montre que, tant à pK qu'à structure égale, les phénols halogénés sont beaucoup plus liposolubles que les nitrophénols.

TABLEAU III
SOLUBILITÉ D'HALO- ET NITROPHÉNOLS DANS LE TOLUÈNE À 20 °C¹²
EN g 100 ml DE SOLVANT SATURÉ

Substance	pK	Solubilité
méta nitrophénol	8.0	1.65
2:4-dichlorophénol	7.75	72.5
2:4-dinitrophénol	4.0	5.15
ortho iodophénol	lég. > 8	> 100

(Valeurs déterminées par spectrophotométrie ultra-violette)

Les résultats de ce travail laissent supposer que c'est la molécule non dissociée qui est effectivement inhibitrice à l'intérieur de la cellule. Le Tableau IV montre, en effet, que la chélation n'est nullement une entrave à la pénétration des phénols dans la cellule: les phénols chélatés sont, en effet, nettement plus liposolubles que leurs isomères. Le pont d'hydrogène est donc une entrave au pouvoir inhibiteur lui même, ce qui implique que c'est la molécule non dissociée qui est inhibitrice. Les phénols agissent donc probablement dans une zone cytoplasmique de faible pH, telle que celle définie par CONWAY^{23,24}.

TABLEAU IV
SOLUBILITÉS DES ISOMÈRES ortho-, méta- ET para NITROPHÉNOL²² (EN g 100 g DE SOLVANT)

Solvant	Isomère ortho	Isomère méta	Isomère para	Rapport des solubilités ortho/para	Constante diélectrique du solvant
Eau	0.33 à 40.0 °C	3.02 à 40.0 °C	3.28 à 40.0 °C	0.10	81.1 à 18 °C
Alcool méthylique	11.83 à 15.5 °C	—	240.45 à 14.0 °C	0.05	31.2 à 20 °C
Alcool éthylique	34.31 à 23.1 °C	183.77 à 23.4 °C	193.78 à 26.0 °C	0.17	25.8 à 20 °C
Acétone	398.97 à 26.1 °C	223.43 à 25.0 °C	220.8 à 24.6 °C	1.73	21.5 à 20 °C
Ether éthylique	138.79 à 21.9 °C	143.67 à 23.5 °C	131.18 à 24.1 °C	1.05	4.368 à 18 °C
Chloroforme	99.68 à 15.5 °C	—	2.99 à 14.0 °C	33.0	5.2 à 18 °C
Toluène	45.28 à 15.5 °C	—	1.13 à 14.0 °C	40.0	2.39 à 21 °C
Benzène	148.3 à 20.1 °C	1.83 à 12.0 °C	0.96 à 20.1 °C	154.4	2.288 à 18 °C
Tétrachlorure de carbone	40.42 à 15.5 °C	—	0.05 à 14.0 °C	808.4	2.246 à 18 °C
Sulfure de carbone	47.59 à 15.5 °C	—	0.05 à 14.0 °C	951.8	2.61 —

CONCLUSIONS

Le pouvoir inhibiteur des dérivés du phénol est une fonction de la mobilité du proton; la chélation, étant une entrave à la mobilité du proton, diminue le pouvoir inhibiteur.

D'autres facteurs jouent sur la pénétration du phénol dans la cellule: le pH extracellulaire a une influence considérable, puisque les phénols ne pénètrent dans la cellule que sous la forme de molécules non dissociées; une liposolubilité élevée du dérivé favorise également sa pénétration.

Dans chaque cas le pouvoir inhibiteur mesuré est la résultante de ces facteurs.

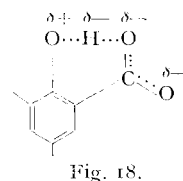
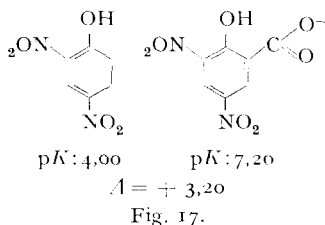
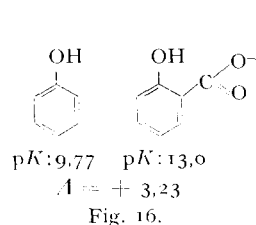
Il semble, d'après les résultats obtenus, que la forme moléculaire effectivement inhibitrice à l'intérieur de la cellule soit la molécule non dissociée.

Ces lois sont à la fois valables pour l'inhibition des phosphorylations et de la fermentation.

Note

Les acides salicylique et *o-p* dinitrosalicylique ont un comportement particulier. Le pK de leur fonction phénol est exceptionnellement élevé: 13,0 pour l'acide salicylique, soit 3,23 unités plus haut que le phénol (Fig. 16); l'acide dinitrosalicylique a un pK de 7,20 soit une élévation de 3,20 unités par rapport au pK du 2:4-dinitrophénol (Fig. 17). A notre connaissance, aucune explication n'a été fournie jusqu'à présent à ce sujet. Nous pensons que ce phénomène est le résultat de la proximité de la charge négative de l'ion carboxyle, charge qui provoque une rétention du proton phénolique. Ce cas est donc semblable à celui des acides α -aminés, dont le pK de la fonction amine (NH_3^+ , acide faible) est d'environ deux unités plus élevé que le pK de la fonction amine de l'ester éthylique correspondant²⁵. Toutefois dans le cas de l'acide salicylique et de ses dérivés, l'écart de pK encore plus grand est sans doute dû à la disposition spatiale des groupes hydroxyle et carboxyle qui est telle qu'une liaison d'hydrogène extrêmement solide peut s'établir. On peut considérer que le proton est retenu par deux liaisons ioniques à peu près équivalentes, ce qui est schématisé par la Fig. 18. Le comportement du proton peut être comparé à la seconde dissociation d'un biacide.

Au point de vue des activités biologiques, le pK de 7,20 et la très forte liaison d'hydrogène annulent le pouvoir inhibiteur de l'acide dinitrosalicylique. Par contre le caractère légèrement inhibiteur de l'acide salicylique est surprenant et il est possible qu'il soit la conséquence du pouvoir bactéricide de l'acide salicylique, comparable à celui de l'acide benzoïque.



Nous exprimons toute notre reconnaissance à Mr. le Professeur J. M. WIAME pour l'intérêt témoigné à ce travail et les discussions fécondes qui ont facilité son élaboration.

Nous remercions le Dr. M. E. KRAHL qui nous a aimablement procuré la plupart des dérivés phénoliques utilisés au cours de ce travail. Les dérivés alkylés du 2:4-dinitrophénol ont été synthétisés par Mr. A. HALLEUX à qui nous adressons nos remerciements.

Nous remercions l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.) et le "Fonds National de la Recherche Scientifique" dont l'aide a permis la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

L'inhibition des phosphorylations et de la fermentation de la levure occasionnée par de nombreux dérivés nitrés et halogénés du phénol a été mesurée.

Les influences qu'exerce la structure moléculaire sur l'activité inhibitrice ont été dégagées.

Le pouvoir inhibiteur est fonction de la mobilité du proton: un pK bas est favorable, tandis qu'une chélation avec un substituant du noyau placé en ortho affaiblit l'activité inhibitrice.

Deux autres facteurs jouent sur la pénétration des molécules dans la cellule: un pH extracellulaire faible est favorable puisque les phénols pénètrent sous la forme de molécules non dissociées et une liposolubilité élevée du dérivé facilite également sa pénétration.

L'inhibition mesurée est la résultante de ces facteurs.

SUMMARY

The inhibition of the phosphorylations and the fermentation of yeast resulting from the action of numerous nitro- and halophenols was measured.

The relations existing between molecular structure and biological activity are outlined.

The inhibition power is a function of the mobility of the proton: a low pK is favourable, whereas chelation with a ring substituent in ortho position weakens the inhibitory activity.

Two other factors act on the penetration of the molecules into the cell: a low extracellular pH is favourable, since the phenols penetrate as undissociated molecules, and a high liposolubility of the derivate also facilitates its penetration.

The measured inhibition is the resultant of these factors.

ZUSAMMENFASSUNG

Die von zahlreichen nitrierten und halogenierten Derivaten des Phenols verursachte Hemmung der Phosphorylierungen und der Gärung der Hefe wurde gemessen.

Der von der molekularen Struktur ausgeführte Einfluss auf die hemmende Wirkung wurde erläutert.

Die Hemmungsfähigkeit hängt von der Beweglichkeit des Protons ab: ein niedriges pK ist ihr günstig, währenddessen eine Chelation mit einem Substituent des Ringes in Orthostellung die hemmende Wirkung abschwächt.

Zwei andere Faktoren wirken auf das Eindringen der Moleküle in die Zelle: ein schwaches extrazelluläres pH ist günstig, da die Phenole in der Form nicht dissoziierter Moleküle eindringen, und eine hohe Fettlöslichkeit des Derivats begünstigt auch seine Eindringung.

Die gemessene Hemmung ist die Resultante dieser Faktoren.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. FIELD, A. W. MARTIN AND S. M. FIELD, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 53 (1935) 314.
- ² G. H. A. CLOWES AND M. E. KRAHL, *J. Gen. Physiol.*, 20 (1936) 145.
- ³ M. E. KRAHL AND G. H. A. CLOWES, *J. Gen. Physiol.*, 20 (1936) 173.
- ⁴ C. M. SUTER, *Chem. Revs.*, 28 (1941) 269.
- ⁵ R. J. CROSS, J. V. TAGGART, G. A. COVO AND D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 655.
- ⁶ R. H. DE DEKEN, *Arch. Int. Physiol.*, 60 (1952) 184.
- ⁷ ELLIOT JUNI, M. D. KAMEN, J. M. REINER AND S. SPIEGELMAN, *Arch. Biochem.*, 18 (1948) 387.
- ⁸ M. D. KAMEN AND S. SPIEGELMAN, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, XIII (1948) 151.
- ⁹ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS AND J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Pub. Co., Minneapolis, 1949, p. 27.
- ¹⁰ L. PAULING, *The Nature of the Chemical Bond*, 2nd Ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., 1948, p. 206.
- ¹¹ J. W. MURRAY AND N. E. GORDON, *J. Am. Chem. Soc.*, 57 (1935) 110.
- ¹² R. H. DE DEKEN, Résultats non publiés.
- ¹³ C. D. HODGMAN (Ed.-in-chief), *Handbook of Chemistry and Physics*, 30th Ed., Chem. Pub. Co., Cleveland, 1947.
- ¹⁴ J. FIELD, A. W. MARTIN AND S. M. FIELD, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 31 (1933) 56.
- ¹⁵ J. FIELD, A. W. MARTIN AND S. M. FIELD, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 4 (1934) 405.
- ¹⁶ A. W. MARTIN AND J. FIELD, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 36 (1937) 375.
- ¹⁷ A. TYLER AND N. H. HOROWITZ, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 23 (1937) 369.
- ¹⁸ M. E. KRAHL AND G. H. A. CLOWES, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 11 (1938) 21.
- ¹⁹ L. PAULING, *The Nature of the Chemical Bond*, 2nd Ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., 1948, pp. 150, 318.
- ²⁰ O. R. WULF *et al.*, cité dans *Nature of the Chemical Bond*, (1948) 320 et 323.
- ²¹ E. F. GALE AND P. D. MITCHELL, *J. Gen. Microbiol.*, 1 (1947) 299.
- ²² SEIDELL, *Solubilities of organ. compounds*, 3e Ed. Vol. II.
- ²³ E. J. CONWAY AND MARY DOWNEY, *Biochem. J.*, 47 (1950) 347.
- ²⁴ E. J. CONWAY AND MARY DOWNEY, *Biochem. J.*, 47 (1950) 355.
- ²⁵ E. J. COHN AND J. T. EDSALL, *Proteins, Amino-acids and Peptides*, Reinhold Pub. Corp. N.Y., 1943, p. 99.

Reçu le 4 février 1955