

Action anticaroténogène de la diphenylamine chez l'algue *Chlorella rubescens*

La diphenylamine (DPA) inhibe sélectivement la biosynthèse des caroténoïdes chez la bactérie *Mycobacterium phlei*¹. Cette action anticaroténogène de la DPA a été confirmée chez les champignons^{2,3} et les bactéries photosynthétiques^{4,5}. Par contre, chez l'algue *Chlorella vulgaris*, seule une inhibition de croissance a été obtenue⁶.

Nous avons repris la question DPA-algues en utilisant une chlorelle connue pour son pouvoir caroténogène, *Chlorella rubescens* CHOD. et un milieu hétérotrophique propice à la synthèse des caroténoïdes. *Chlorella rubescens* a été cultivée en milieu de DETMER 1/3 enrichi de glucose, avec ou sans (témoins) DPA, réparti dans des ballons phycogènes aérés et éclairés (tubes luminescents), en chambre climatisée à 20°C (installation selon CHODAT et BOCQUET⁷).

Dans de telles conditions et déjà après 3 semaines de culture, une nette inhibition de la composante orange de la pigmentation s'est manifestée chez les algues cultivées en présence de DPA. L'extraction et la chromatographie (MgO-celite) des caroténoïdes ont permis la détection d'un composé à fluorescence gris-vert, ayant les caractéristiques adsorptives et spectrales du phytofluène, dans les cultures traitées à la DPA. Nos premiers résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Cultures de *Chlorella rubescens* CHOD. âgées de 4 semaines

Milieu de DETMER 1/3 + source de C	DPA	Pigmentation: chlorophylles et β -carotène-xanthophylles	Composé fluorescent: phytofluène
Glucose 2% . . .	0	rouge-orange	—
Glucose 2% . . .	1/200 000	jaune-vert	+
Glucose 2% . . .	1/125 000*	vert jaunâtre	+

* Cultures de 12 semaines

Dans les observations faites *de visu*, il n'est apparu aucun effet notoire de destruction photodynamique des cellules de *Chlorella* semblable à celui décrit chez les bactéries photosynthétiques⁸. Signalons cependant que KANDLER et SCHÖTZ⁹ ont observé une photosensibilité chez leur mutant apo-carotène de *Chlorella*. De nouvelles expériences seront nécessaires pour éclaircir ce point en tenant compte du régime auto- ou hétérotrophique des algues apo-caroténoïdes.

Concernant le mode d'action de la DPA, nous avons avancé la possibilité d'une action antioxydante de cette molécule, protégeant les précurseurs polyéniques incolores plus saturés d'une deshydrogénation en polyènes colorés^{1,9}. Dans cet ordre d'idées, nous avons observé que la dissolution de quelques cristaux de DPA dans une solution éthanolique de β -carotène protège le pigment d'une rapide photo-oxydation décolorante. Cette expérience démontre le pouvoir antioxydant direct de la DPA à l'égard du β -carotène. De plus, et fait significatif, la DPA sulfonée (hydrosoluble) s'est montrée inactives, en particulier avec les champignons caroténogènes (expériences inédites avec *Allomyces*). Cela tendrait à prouver que l'effet anticaroténogène de la DPA (hydro- et liposoluble) dépend de la faculté particulière de cette molécule de se concentrer aux interfaces phase aqueuse-phase lipidique du cytoplasme et d'y exercer son action antioxydante.

Or, c'est précisément à ce niveau que la deshydrogénation enzymatique des précurseurs polyéniques doit avoir lieu, préalablement à l'accumulation des produits finals, les caroténoïdes colorés, dans la phase lipidique des chloroplastes ou dans les gouttelettes lipidiques intracellulaires.

Nous remercions M. le Prof. F. CHODAT de ses judicieux conseils et de la libre disposition de ses installations.

G. TURIAN et J.-F. SCHOPFER

Institut de Botanique générale, Université de Genève, le 13 octobre 1959.

Summary

Diphenylamine (DPA) inhibition of carotenoid biosynthesis with concomitant appearance of detectable amounts of the colourless and fluorescent polyene, phytofluene, is reported in *Chlorella rubescens* CHOD.

Preliminary negative results with the hydrosoluble DPA-sulphonic acid suggest that anticarotenogenic activity of the hydro- and liposoluble DPA may well be related to the faculty of this molecule to accumulate at the aqueous-lipidic interphases in the cytoplasm where it would interfere with the enzymatic dehydrogenation of the carotenoid precursors through its noted antioxidant properties.

¹ G. TURIAN, *Helv. chim. Acta* 33, 1988 (1950).

² G. TURIAN, *Exper.* 8, 302 (1952).

³ T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* 50, 550 (1952).

⁴ T. W. GOODWIN et H. G. OSMAN, *Biochem. J.* 56, 222 (1954).

⁵ G. COHEN-BAZIRE et R. Y. STANIER, *Nature* 181, 250 (1958).

⁶ T. W. GOODWIN, *Exper.* 10, 213 (1954).

⁷ F. CHODAT et G. BOCQUET, *Arch. Sci. Genève* 8, 214 (1955).

⁸ O. KANDLER et F. SCHÖTZ, *Z. Naturf.* 11b, 708 (1956).

⁹ G. TURIAN, *Physiol. Plantarum* 10, 667 (1957).

On the Conformation of Substituted Cyclopentanones. Rotatory Dispersion and Spectral Data of some Steroidal α -Halocyclopentanones¹

The problem of the conformation of the cyclopentane ring has been the subject of a number of recent investigations²⁻⁴ and the present status is particularly well summarized by BRUTCHER *et al.*⁴. Of special pertinence is the conformation of the cyclopentanone system, since the corresponding α -halo derivatives can be examined by a number of physico-chemical tools, which can offer valuable information on the nature of the C-halogen bond and thence on the conformation of the cyclopentanone ring itself. BRUTCHER⁴, on the basis of infrared, nuclear magnetic resonance and dipole moment studies differentiates between three types of bonds: (i) the classical axial and equatorial bonds, found in the cyclohexane system; (ii) quasi-axial and quasi-equatorial bonds, and (iii) a bisecting bond, which is intermediate between axial and

¹ Paper XXXV in the series *Optical Rotatory Dispersion Studies* by C. D. For the preceding article see N. L. ALLINGER, R. B. HERMANN, and C. DJERASSI, *J. org. Chem.*, in press.

² C. G. LE FEVRE and R. J. W. LE FEVRE, *J. chem. Soc.*, 3549 (1956).

³ K. S. PITZER and W. E. DONATH, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 3213 (1959).

⁴ F. V. BRUTCHER, T. ROBERTS, S. J. BARR, and N. PEARSON, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 4915 (1959) and earlier papers.

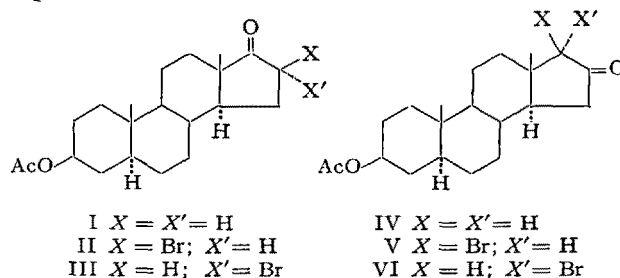
equatorial. The latter type would be found in the α -positions of a planar cyclopentanone and the α -halocamphors were employed⁴ as suitable reference samples for this purpose, since the ring fusion in this molecule requires virtual planarity of the five-membered ring. The evidence employed so far seems to point^{2,4} towards a 'half-chair' conformation of cyclopentanone.

We should now like to present additional evidence bearing on this problem. SHOPPEE *et al.*⁵ have already noted that steroidal ring D ketones would represent excellent test cases since the C/D *trans*-ring fusion requires a fixed conformation of the cyclopentanone ring.

The only bromo ketones of this type, which are known^{5,6} are the 16 β -bromo (II) and 16 α -bromo (III) derivatives of 5 α -androstan-3 β -ol-17-one acetate (I) and their infrared and optical rotatory dispersion⁷ data (Table) show that the 16 α - and 16 β -bromo substituents occupy bisectonal bonds. Considerably more significant are the hitherto undescribed epimeric 17-bromo-16-ketones (V, VI) since in these substances, the two bonds should be non-equivalent. The 17 α -bromo isomer VI has now been prepared⁸ in pure form (m. p. 168–172°C) by bromination (carbon tetrachloride solution) of the enol acetate of 5 α -androstan-3 β -ol-16-one acetate (IV) followed by chromatographic separation on alumina. The relevant infrared, ultraviolet, and optical rotatory dispersion⁹ data are collected in the Table. The predominant product, 17 α -bromo-5 α -androstan-3 β -ol-16-one acetate (VI) should – according to the 'half-chair' form⁴ – exhibit quasi-axial character. This is borne out by the infrared shift (8 cm⁻¹) which is smaller⁴ than the bisectonal value (12–14 cm⁻¹) and especially by the rotatory dispersion curve. The first extremum of its negative Cotton effect shows a bathochromic shift of 36 m μ as compared to the trough of the parent ketone (IV), a behavior qualitatively reminiscent¹⁰ of axial α -bromo cyclohexanones. Furthermore, if the 'axial α -haloketone'¹⁰ is also applicable¹¹ to cyclopentanones, then a 17 α -bromo substituent would be expected to make a positive rotatory contribution and this is clearly the case here. Similar conclusions can also be derived from the reported¹² spectral and rotatory dispersion shifts of 17-acetoxy-16-keto steroids.

The results cited so far are consistent with the half-chair conformation of the cyclopentanone ring. It is pertinent to mention that our results summarized in the Table indicate that ultraviolet spectral measurements¹³ may not always represent a conclusive criterion in the cyclopentanone series. Thus the ultraviolet bathochromic shift (16.5 to 23 m μ) for an α -bromocyclopentanone of the bisectonal type is unexpectedly larger than that exhibited (17 m μ)

by a quasi-axial α -bromo ketone (VI), while the anticipated¹⁰ reverse relationship is shown by the rotatory dispersion data.



J. FISHMAN* and C. DJERASSI**

*Sloan-Kettering Institute for Cancer Research New York
and **Department of Chemistry, Stanford University, Stanford (California), January 4, 1960.

Zusammenfassung

Die optische Rotationsdispersion sowie das Infrarot- und Ultraviolett-Absorptionsspektrum von mehreren α -Bromderivaten der 16-Keto- und 17-Ketosteroiden wurde gemessen. Die Schlussfolgerungen aus Rotationsdispersion und Infrarotanalyse stimmen gut überein, es scheint jedoch, dass die Verschiebungen im Ultraviolett zur Bestimmung der Orientierung eines Halogenatoms in α -Bromocyclopentanonen nicht in allen Fällen gebraucht werden können.

⁵ C. W. SHOPPEE, R. H. JENKINS, and G. H. R. SUMMERS, J. chem. Soc., 3048 (1958).

⁶ J. FAJKOS, Chem. Listy 48, 1800 (1954); 49, 1218 (1955); J. Chem. Soc., 3966 (1959).

⁷ C. DJERASSI, *Optical Rotatory Dispersion: Applications to Organic Chemistry* (McGraw Hill Book Co., New York 1960).

⁸ J. FISHMAN, to be published.

⁹ The rotatory dispersion results are reported in terms of the first extremum of the Cotton effect and as pointed out in Chap. 8 of ref. ⁷, the wavelength differences between the parent ketone and its α -substituted derivative permit direct comparison with the corresponding ultraviolet absorption measurements (see also ref. ¹²).

¹⁰ C. DJERASSI and W. KLYNE, J. Amer. chem. Soc. 79, 1506 (1957). – C. DJERASSI, J. OSIECKI, R. RINIKER, and B. RINIKER, J. Amer. chem. Soc. 80, 1216 (1958).

¹¹ That this appears to be the case is indicated by A. LARDON, H. P. SIGG, and T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 42, 1462–1463 and Fig. 1 (1959).

¹² C. DJERASSI, O. HALPERN, V. HALPERN, O. SCHINDLER, and C. TAMM, Helv. chim. Acta 41, 250, especially Table 4 (1958).

Substance	I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CCl}_4}$ (cm ⁻¹)	$\Delta \nu$ (cm ⁻¹)	U.V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (m μ)	$\Delta \lambda$ (m μ)	R.D. first extremum $\lambda_{\text{MeOH}}^{\text{MeOH}}$ (m μ)	R.D. $\Delta \lambda$ [α] (m μ)
Camphor	1744		289.5		310	+ 2000°
3 α -Bromocamphor	1758	14	306	16.5	335	+ 1970°
17-Ketone (I)	1743		293		315	+ 2700°
16 β -Bromo-17-ketone (II)	1755	12	316 ^a	23	341.5	+ 2097°
16 α -Bromo-17-ketone (III)	1755	12	316 ^a	23	341.5	+ 1290°
16-Ketone (IV)	1746		299		314	- 4782° ^b
17 α -Bromo-16-ketone (VI)	1754	8	316	17	350	- 525°

^a When measured in methanol solution, the maximum occurred at 314–315 m μ . ^b The free alcohol was used for this determination. All measurements were conducted in our laboratories except for the infrared (ref. ⁴) and ultraviolet (ref. ¹³) data of camphor and 3 α -bromocamphor.