

## INFLUENCE DE DIFFÉRENTS COMPOSÉS CHIMIQUES SUR LA CAROTENOGENÈSE DE *MUCOR HIEMALIS*

R. HERBER, B. MAUDINAS et J. VILLOUTREIX

Laboratoire de Chimie Biologique, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,  
5, rue A. Lebrun, 54-Nancy, France

(Reçu le 25 avril 1972.    Accepté le 7 juin 1972)

**Key Word Index**—*Mucor hiemalis*; Mucoraceae; fungi; inhibition; carotenoids; benzophenone; 4-acetyl-biphenyl; 9-fluorenone.

**Abstract**—A number of 4-substituted benzophenones, 4-acetylbiphenyl and 9-fluorenone totally inhibit the formation of carotenoids.

LA DIPHENYLAMINE a été la première substance chimique connue et la plus largement utilisée pour inhiber la caroténogenèse de nombreux microorganismes.<sup>1,2</sup> Cependant la benzophénone, l'acridine et ses dérivés possèdent aussi des propriétés anticaroténogènes vis-à-vis d'une souche de *Mycobacterium* et une hypothèse basée sur une similitude d'encombrement entre ces molécules d'inhibiteurs et la partie centrale d'une molécule de caroténoïde a été proposée.<sup>3</sup> Elle permet d'envisager une compétition entre ces différentes substances et le phytoène pour l'occupation du site actif de l'enzyme intervenant dans la désaturation du phytoène.

L'action de dérivés du biphenyle sur la caroténogenèse<sup>4</sup> ne semble pas toutefois relever d'un tel processus et ceci nous a conduits à rechercher quelle relation existe entre la structure moléculaire et l'activité anticaroténogène de substances appartenant à différentes familles chimiques.

### RESULTATS

Les essais ont été réalisés avec une souche de *Mucor* (+) proche de *Mucor hiemalis* (Wehmer).

#### *Dérivés du Biphenyle*

Les dérivés aminés, nitrés ou halogénés n'ont aucun effet sur la pigmentation mais ceux possédant des groupements méthyle, méthoxyle ou acétyle sont actifs. L'introduction d'un substituant supplémentaire mais de nature différente de celui préexistant, ne modifie pas en général les résultats ci-dessus sauf si l'on obtient des dérivés qui sont substitués en 2,2' ou en 4,4'. Une modification de l'aromaticité du squelette du biphenyle supprime toute activité: le dicyclohexyle, *p*-cyclohexylphénol, *O*-cyclohexylphénol, 1-phényl-1-cyclohexanol se sont révélés inactifs.

<sup>1</sup> G. TURIAN, *Helv. Chim. Acta* **33**, 1988 (1950).

<sup>2</sup> T. W. GOODWIN, M. JAMIKORN et J. S. WILLMER, *Biochem. J.* **53**, 531 (1953).

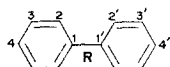
<sup>3</sup> H. C. RILLING, *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 39 (1965).

<sup>4</sup> J. VILLOUTREIX, *Biochem. Biophys. Acta* **40**, 434 (1960).

### Composés à Deux Noyaux Benzéniques Séparés par un Groupe d'Atomes

Si la diphenylamine ( $R = >NH$ ) est également active vis-à-vis de la pigmentation de *Mucor hiemalis*, ses dérivés aminés et la *N*-méthyl-diphenylamine ( $R = >N-Me$ ) n'exercent aucune action sur la caroténogénèse et la 2-carboxydiphenylamine inhibe, de plus, totalement la croissance du champignon. Parmi les dérivés hydroxylés, seule la 4-hydroxy-diphenylamine inhibe la pigmentation avec une efficacité sensiblement identique à celle de la diphenylamine elle-même. La *N*-phénylcyclohexylamine et la dicyclohexylamine qui possèdent respectivement 1 et 2 noyaux entièrement saturés sont rigoureusement sans effet.

TABLEAU 1. ACTION DE DIFFÉRENTS DÉRIVÉS DU BIPHÉNYLE SUR LA CAROTÉNOGÈSE DE *Mucor hiemalis*



Substituant	2	2,2'	Position 3	3,3'	4	4,4'
OH	—	—			×	—
Me	±	±	±	±	+	
OMe				+	+	
CO-Me					+	
COOH		—			×	
NH <sub>2</sub>	—				—	—
NO <sub>2</sub>	—	—			—	—
F	—	—				—
Br						—

— Dérivés inactifs sur la caroténogénèse.

+ Dérivés inhibant totalement la caroténogénèse.

± Dérivés inhibant partiellement la caroténogénèse.

× Dérivés inhibant la croissance.

La benzophénone ( $R = >C=O$ ) s'est révélée très efficace mais toute substitution introduite sur l'un des noyaux entraîne une diminution de l'activité par rapport à la benzo-phénone, ou la supprime totalement: la 4-hydroxybenzophénone conserve encore un certain pouvoir d'inhiber la pigmentation mais la 2,4-dihydroxybenzophénone ainsi que la carboxy-2 et carboxy-2-méthyl-4-benzophénone sont sans effet sur la caroténogénèse.

D'autres dérivés comme l'oxyde de phényle ( $R = -O-$ ), le diphenylméthane ( $R = -CH_2-$ ) sont faiblement inhibiteurs de la pigmentation, alors que le diphenylcarbinol ( $R = >CHOH$ ) ainsi que le 1,1-diphenyléthanol inhibent totalement la synthèse des pigments. Le diphenylsulfure ( $R = -S-$ ) et l'acide 3,3-diphenylpropionique ( $R = >CH-CH_2-COOH$ ) sont totalement dépourvus de toute activité.

### Composés dont les Deux Noyaux Benzéniques sont Séparés par Plus d'un Groupe d'Atomes

Seul le trans-stilbène ( $R = -CH=CH-$ ) s'est révélé actif, toutefois si l'on hydrogène la double liaison centrale (dibenzyle), toute activité disparaît.

### Composés à Noyaux Benzéniques Condensés

Si le naphthalène, l'anthracène, le phénanthrène n'exercent qu'une faible action sur la caroténogénèse, le fluorène provoque une diminution très importante de la quantité de

caroténoïdes formés par le champignon, mais c'est surtout le 9-fluorénol et la 9-fluorénone qui donnent les résultats les plus remarquables.

### Composés à Hétérocycles Azotés

L'inhibition par la pyridine et l'imidazole de la formation des caroténoïdes cycliques<sup>5</sup> nous a incités à étudier l'action de la pyridine et de ses dérivés méthylés ainsi que de différents bipyridyles et dérivés de la pipéridine. Tous ces composés n'ont conduit qu'à des résultats négatifs.

Seule la nicotine à doses très élevées ( $5 \times 10^{-2}$  M) inhibe la pigmentation sans qu'il soit toutefois possible d'observer d'accumulation de caroténoïdes acycliques.<sup>6</sup>

TABLEAU 2. ACTION DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS SUR LA CAROTÉNOGÈSE DE *Mucor hiemalis* (LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN  $\mu\text{g/g}$  DE POIDS DE MYCÉLIUM SEC)

Inhibiteur	Concentration (mol/l., $\times 10^{-4}$ )	Durée de la culture (en jours)	Phytoène ( $\mu\text{g/g}$ )	Autres caroténoïdes ( $\mu\text{g/g}$ )
3,3'-Diméthoxybiphényle	1	7	2313	traces
4-Acétylebiphényle	1	5	2155	—
3-Chloro-4-méthoxybiphényle	3,6	7	2758	traces
1,1-Diphényléthanol	4	6	1215	135
Benzophénone	2,2	5	2609	—
Diphénylcarbinol	5,5	6	2913	—
Stilbène	2,8	12	3160	176
Fluorène	3	5	1960	261
9-Fluorénone	5,5	6	2370	—
9-Fluorénol	5,5	5	1960	traces

En définitive, très peu de composés, malgré le nombre relativement important de substances essayées, se sont révélés efficaces vis-à-vis de la caroténogénèse de *Mucor hiemalis*. Ainsi que le montre le Tableau 2, leur introduction dans le milieu de culture se traduit par un blocage plus ou moins strict de la caroténogénèse au niveau du phytoène dont la quantité est égale ou légèrement supérieure à la quantité totale de pigments formés en absence d'inhibiteur.

### DISCUSSION

Les dérivés du biphényle ont fait l'objet de nombreux travaux consacrés à la relation existant entre leur structure moléculaire et leur activité cancérigène et il semble que la condition impérieuse pour l'apparition d'une activité soit surtout la coplanarité des deux radicaux phényles.<sup>7</sup>

En ce qui concerne l'inhibition de la caroténogénèse il ne semble pas que cette condition présente la même nécessité. La position coaxiale des cycles n'est pas non plus absolument requise. En effet dans la benzophénone les cycles sont inclinés de façon symétrique de  $15^\circ$

<sup>5</sup> L. NINET, J. RENAUT et R. TISSIER, *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1195 (1969).

<sup>6</sup> C. D. HOWES et P. P. BATRA, *Biochem. Biophys. Acta* **222**, 174 (1970).

<sup>7</sup> J. C. ARCOS et M. ARCOS, dans *Fortschritte der Arzneimittelforschung* (edited by E. JUCKER), p. 407, Birkhäuser, Basel (1962).

environ par rapport au plan formé par le groupement carboxyle et les deux axes des noyaux.<sup>8</sup> De même l'angle  $C_{ar}-N-C_{ar}$  de la diphenylamine varie de 108 à 113°.<sup>9</sup>

Les essais effectués avec des dérivés du biphenyle ou de la diphenylamine dont un des noyaux est hydrogéné ont montré que la présence de 2 noyaux aromatiques est indispensable pour observer une activité. L'éloignement des cycles ne peut toutefois varier que dans d'étroites limites.

Il semble bien cependant que la conjugaison entre les noyaux représente une condition essentielle pour l'activité, C'est ainsi que le dibenzyle est sans effet sur la pigmentation du champignon alors que le stilbène est actif. En ce qui concerne la diphenylamine, le doublet de l'azote joue plus ou moins le rôle de la double liaison du stilbène alors que, dans le diphenylsulfure ou l'oxyde de phényle, les atomes de soufre et d'oxygène empêchent toute conjugaison entre les deux cycles.<sup>10</sup>

Jusqu'à présent seule la structure initiale des inhibiteurs a été prise en considération dans l'étude de leur activité. Or nous avons pu observer que même dans le cas des substances les plus actives, celles-ci subissaient des transformations au cours de la croissance du champignon. C'est ainsi que la 9-fluorénone est réduite en 9-fluorénol avec un rendement de 98 %, le 4-acétylbiphenyle et la benzophénone sont réduits en l'alcool correspondant. La diphenylamine en revanche subit une hydroxylation conduisant principalement à la 4-hydroxydiphenylamine. Tous ces produits de transformation possèdent une activité anticaroténogène égale à celle de la substance initiale.

Il n'en est cependant pas toujours ainsi: le 2-hydroxybiphenyle est métabolisé par *Mucor hiemalis* en 2,5-dihydroxybiphenyle et en 2-hydroxybiphenyle glucoside<sup>11</sup> qui sont inactifs sur la caroténogénèse du champignon. Le 2-hydroxybiphenyle inhibe cependant la pigmentation des levures,<sup>4</sup> mais aucune transformation n'a été mise en évidence dans ce cas.

De plus ces substances capables d'inhiber la synthèse des caroténoïdes semblent intervenir également dans d'autres métabolismes, comme cela a déjà été démontré chez les bactéries<sup>12</sup> et ne possèdent pas une spécificité aussi étroite que beaucoup d'auteurs ont voulu leur reconnaître.<sup>13</sup>

## EXPERIMENTALE

La composition du milieu de culture est la suivante: glucose 20 g;  $KH_2PO_4$  1,5 g;  $MgSO_4$  0,5 g;  $NH_4NO_3$  1,5 g;  $(NH_4)_2SO_4$  1,5 g; leucine 0,5 g; asparagine 0,5 g; vitamine B1 0,25 mg pour un litre d'eau. L'inhibiteur est introduit stérilement dans le ballon au moment de l'ensemencement. Les cultures se font à température ambiante, l'aération étant assurée par un barbotage d'air. Au bout de 5 à 6 jours de culture, la masse mycélienne est séparée du milieu par filtration et les pigments sont extraits après broyage du mycélium et chromatographiés sur colonne d'alumine.<sup>14</sup> Les produits de transformation des inhibiteurs sont extraits du milieu de culture et séparés par chromatographie sur couche mince de Kieselgel G.<sup>11</sup> Ils sont identifiés par spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire.

<sup>8</sup> R. N. JONES, *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 2217 (1945).

<sup>9</sup> M. ARONEY et R. J. W. LE FEVRE, *J. Chem. Soc.* 3600 (1960).

<sup>10</sup> J. IYER et A. CASADEVALL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **7**, 2355 (1969).

<sup>11</sup> R. HERBER, M. LEPAGE, M. PIERFITTE et J. VILLOUTREIX, *C.R. Soc. Biol.* à paraître.

<sup>12</sup> K. Y. CHO, W. A. CORPE et M. R. J. SALTON, *Biochem. J.* **93**, 26c (1964).

<sup>13</sup> J. A. OLSON et H. KNIZLEY, *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 138 (1962).

<sup>14</sup> E. CASSUTO et J. VILLOUTREIX, *Biochim. Biophys. Acta* **136**, 459 (1967).