

SYNTHÈSE D'UN DERIVÉ DU METHOMYL MARQUÉ AU
 ^{14}C AVEC UNE PHOTOAFFINITÉ POTENTIELLE POUR
 LE SITE RECEPTEUR DES MITOCHONDRIES TEXAS

G. ARANDA, M. HERBERT^{**} et L. PICHAT^{**}

Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique
 91128 PALAISEAU Cedex, France .

^{**} Service des Molécules Marquées, C.E.N. SACLAY
 91191 GIF-sur-YVETTE, Cedex, France .

^{**} Directeur de Recherche au CEA

S u m m a r y

SYNTHESIS OF A LABELLED DERIVATIVE OF METHOMYL WITH POTENTIAL AFFINITY FOR
 THE BIOLOGICAL ACTIVE SITE OF MITOCHONDRIAS TEXAS

The Grignard reagent from 1-chloro-4-methoxy butane was carbonated with $^{14}\text{CO}_2$ giving [carboxyl ^{14}C]-5-methoxy pentanoic acid . Yield : 80 % . Specific activity : 24,3 mCi/mole . Treated with dry hydrogen bromide in acetic acid, the latter gave [carboxyl ^{14}C]-5-bromopentanoic acid which was condensed with diphenylphosphoryl azide leading to 5-bromobutyl [carbonyl ^{14}C] isocyanate . Without isolation, the latter was reacted with methylthioacetoxy hydroxamate giving [carbonyl ^{14}C] S-methyl-N [(4-azidobutyl carbamoyl) oxy] thioacetimidate with an overall yield of 15,7 %/ $^{14}\text{CO}_2$ and a radiochemical purity of 99,8 % . Specific activity : 23,7 mCi/mole .

I N T R O D U C T I O N

La variété de maïs dénommée Texas est caractérisée par un gène mitochon-

Key words : Mitochondrias Texas, Methomyl, Specific activity, Synthesis,
 N-butylazido derivative, Synthesis labelled analogue .

drial qui lui confère la stérilité mâle (cytoplasme Texas, mâle stérile ou T) . Il est très sensible à l'action d'un champignon phytopathogène tel que *Helminthosporium maydis*, espèces Nisikado et Miyake race T ou HMT . Les phytotoxines produites par HMT ont été isolées et purifiées : elles présentent la même spécificité que HMT vis-à-vis du cytoplasme mâle stérile Texas (1) . De nombreux arguments suggèrent que la mitochondrie est le siège de l'action toxique provoquée par HMT (2) .

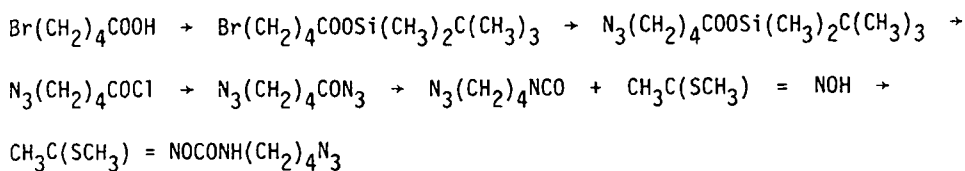
Un insecticide tel que le Méthomyl 1 ou thioacétimide de S-méthyl-N (méthylcarbamyloxy (Figure) présente les caractéristiques toxiques de HMT aussi bien pour la plante (3) que pour la mitochondrie (4) . Bien que la sélectivité et la toxicité soient moindres que celles des toxines de HMT, elles sont suffisamment élevées pour permettre des études biochimiques d'autant plus que la synthèse et la purification du méthomyl ne présentent pas de difficulté .

Par ailleurs, la spécificité de l'activité biologique a été reliée sans ambiguïté à la conformation moléculaire du Méthomyl : l'isomère géométrique Z est biologiquement actif uniquement vis-à-vis du maïs à cytoplasme Texas (5) . Les synthèses des différents dérivés du Méthomyl conduisent toujours à l'isomère géométrique Z, unique ou du moins largement prédominant (6) (7) (8) . La substitution directe dans la molécule de Méthomyl par la fonction azido photosensible n'est pas envisageable étant donné la perturbation qu'elle entraînerait pour la délocalisation électronique . Cette modification entraîne en effet une diminution importante de l'activité biologique (6) (8) . Par contre, une étude récente montre que l'activité biologique spécifique est une fonction croissante de la lipophilicité, c'est ainsi que le dérivé N-butyl $R_3 = (CH_2)_3CH_3$ présente la même activité que le parent Méthomyl, à une concentration 100 fois inférieure (9) . Sachant que l'étude des interactions entre phospholipides et les protéines de certaines membranes biologiques a été conduite avec succès par l'emploi d'acides gras divers ω azido (10), il est possible d'envisager la synthèse d'un composé porteur d'une fonction butylazido susceptible d'une photoaffinité pour le site récepteur mitochondrial qui pourrait être un polypeptide particulier du cytoplasme Texas (11) .

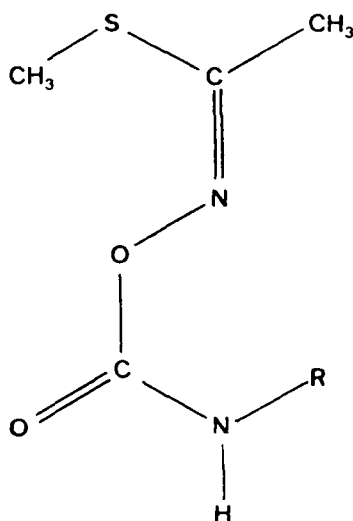
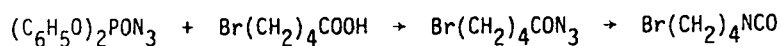
R E S U L T A T S

La synthèse des composés 2 et 3 (Figure 1) a été entreprise suivant les voies suivantes qui utilisent l'acide bromo-5 valérique :

1/ Action de l'isocyanate de azido-4-butyle sur le thioacetoxy-hydroxamate de méthyle



2/ Action directe de l'acide bromo-5 valérique sur le diphenylphosphoroazide et le thioacetoxy-hydroxamate de méthyle (12)

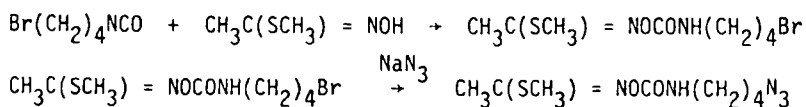


1 R = CH₃

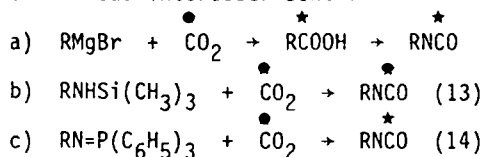
2 R = (CH₂)₄Br

3 R = (CH₂)₄N₃

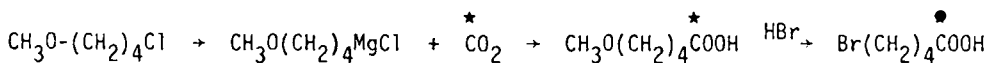
Figure 1



Le carbamate 3 étant rigoureusement spécifique vis-à-vis des mitochondries T, il est intéressant d'envisager la synthèse de son équivalent radioactif au ^{14}C en utilisant des isocyanates. La méthode la plus simple est celle qui utilise du $^{14}\text{CO}_2$ marqué au ^{14}C . Les synthèses utilisant le principe de la carbonatation susceptibles de nous intéresser sont :



Les méthodes b) et c) conduisent aux isocyanates après une transformation thermique peu compatible avec la fonction azido potentiellement explosive. Après diverses tentatives infructueuses dans l'exploration des voies b) et c), nous avons retenu la carbonatation du magnésien correspondant au méthoxy-1 chloro-4 butane qui conduit à l'acide méthoxy-5-valérique (15), lequel traité par HBr fournit l'acide bromo-5 valérique :



Ce dernier conduit ensuite au carbamate 3 suivant les voies 1 ou 2. La carbonatation du magnésien ($4,0 \times 10^{-3}$ moles) est réalisée à partir de 100 mCi de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$. On obtient finalement 0,630 g d'acide bromé cristallisé, jaunâtre d'activité spécifique égale à 24,3 mCi/mmole.

100 mg de cet acide recristallisé du mélange chlorure de méthylène/pentane, fournissent 79 mg que l'on mélange à 192 mg d'acide γ bromovalérique froid. En suivant le premier mode opératoire, on obtient, après deux chromatographies rapides sous pression d'azote, 25 mg du carbamate 3 de pureté radioactive égale à 98,6 % avec une activité spécifique de 4,2 mCi/mmole.

0,530 g de l'acide bromé précédent fournissent, selon la deuxième voie d'accès, après deux chromatographies rapides sous pression d'azote, deux fractions pesant 56 et 83 mg auxquelles correspondent respectivement les puretés ra-

diachimiques de 96,4 et 99,8 %. L'activité spécifique de la deuxième fraction est égale à 23,7 mCi/mole .

Par ailleurs, le Méthomyl 1 a été directement obtenu à partir du thio-acétoxy-hydroxamate de méthyle et d'isocyanate de méthyle $\text{CH}_3\overset{\star}{\text{NCO}}$ généré à partir du chlorure d'acétyle marqué au ^{14}C et de triméthylsilylazide en une seule opération (16) .

Partie Expérimentale

Le (^{14}C) carbonate de baryum est fourni par le Centre d'Etudes Nucléaires de SACLAY, France .

Les radiochromatogrammes ont été mesurés sur un appareil intégrateur BERTHOLD . La mesure des radioactivités est déterminée par BREMSSTRALUNG du ^{14}C . Les radioactivités spécifiques ont été mesurées par spectrométrie de masse sur un appareil ATLAS CH.7 . La pureté radiochimique a été vérifiée par chromatographie sur plaques de gel de silice HF.254 avec lecture sur appareil BERTHOLD et/ou par autoradiographie . L'identité des carbamates marqués a été assurée par spectrométrie de masse sur un appareil ATLAS CH.7 par comparaison avec des échantillons de 1, 2 et 3 non radioactifs . Les données spectroscopiques de ces derniers correspondent aux spectres I.R. (film), de R.M.N. du ^1H et du ^{13}C . Ces derniers réalisés dans le chloroforme deutérié avec 1 % de TMS pour référence interne ont été enregistrés respectivement sur des appareils VARIAN T.60 et CFT.20 . Les chromatographies rapides ont été effectuées sur un appareil JOBIN-YVON .

Synthèse du N-(bromo-4 butyle)carbamate 2 et du N-(azido-4 butyle)carbamate 3

$1,20 \times 10^{-2}$ mole de diphénylphosphoroazide $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_2\text{PON}_3$ (3,30 g) sont dissous sous atmosphère d'azote dans 15 ml de benzène anhydre avec $1,25 \times 10^{-2}$ mole de $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ (1,26 g) . A température ordinaire, on ajoute sous vive agitation 10^{-2} mole d'acide bromovalérique (1,81 g) dissous dans 10 ml de benzène .

Le lendemain matin, la solution benzénique est portée à l'ébullition pen-

dant 1 heure . Un spectre I.R. de la solution obtenue indique la présence de l'absorption 2270 cm^{-1} correspondant à l'isocyanate et l'absence de l'absorption 1720 cm^{-1} relative à la fonction acide carboxylique . A température ordinaire, on ajoute ensuite 10^{-2} mole de thioacétohydroxamate de méthyle $\text{CH}_3\text{C}(\text{SCH}_3)=\text{NOH}$ (1,050 g) dissous dans 6 ml de chlorure de méthylène redistillé sur P_2O_5 . 24 heures plus tard, après addition de 100 ml d'éther éthylique, un lavage avec 10 ml d'une solution de soude à 6 %, 3 lavages à l'eau, séchage sur K_2CO_3 , départ des solvants sous vide, on récupère 3,25g d'une huile que l'on chromatographie sur gel de silice H . Avec le mélange éther éthylique/pentane, 1/3, on élue 0,122 g de l'oxime initiale ; avec le mélange 3/1, on élue 2,10 g d'une huile incolore qui correspond au carbamate 2 . Rendement = 84 % par rapport à l'oxime utilisée .

La voie de synthèse qui utilise l'isocyanate de bromo-4 butyle conduit au carbamate 2 avec un rendement identique après chromatographie .

1,945 g de 2 est dissous dans de l'éthanol aqueux obtenu à partir de 13,5 ml d'alcool et 1,50 ml d'eau, en présence de 1 g d'azide de sodium . Cette solution est portée à l'ébullition pendant 4 h . Après refroidissement et addition de 50 ml de chlorure de méthylène, la solution est filtrée plusieurs fois sur célite, puis distillée sous vide . Après addition de 50 ml de chlorure de méthylène, 3 lavages avec 5 ml d'eau, la solution est séchée sur K_2CO_3 . Après départ du solvant, on obtient une huile incolore homogène en chromatographie sur couche mince après trois éluions successives, éluant : éther éthylique . Rendement quantitatif .

Les carbamates 2 et 3 présentent des R_f égaux à 0,26-0,27 difficilement discernables . Ils ne recristallisent pas quels que soient les solvants et les tentatives réalisées .

Données spectroscopiques des carbamates 2 et 3

Les spectres infra-rouges sont caractérisés, entre autres, par les absorptions $3400-3350$, 2945 , 1730 , 1510 , 1240 cm^{-1} et par l'absorption à 2110 cm^{-1} relative à la fonction azide . Les données de la R.M.N. sont résumées dans le Tableau I .

Tableau I - R.M.N. du ^1H et du ^{13}C des carbamates 2 et 3 dans le CDCl_3 avec 1 % de TMS pour référence interne

R. M. N. du ^1H (ppm)	R. M. N. du ^{13}C (ppm)
1,80 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$)	22,4 et 29,8
2,22 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$)	13,4 et 154,8
<u>2</u> 2,37 (s, 3H, CH_3S)	18,9
3,30 (m, 4H, CH_2Br et CH_2N)	33,2 et 40,2
6,10 (m, 1H, NH)	160,7 (NHC=O)
<hr/>	
1,67 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$)	26,2 et 27,1
2,22 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$)	13,5 et 154,9
<u>3</u> 2,38 (s, 3H, CH_3S)	19,0
3,30 (m, 4H, CH_2NH et CH_2N_3)	40,6 et 51,1
6,10 (m, 1H, NH)	160,8 (NHC=O)

Synthèse des carbamates 2 et 3 à partir de l'acide bromo-5 valérique (1-carboxyle ^{14}C)

$1,50 \times 10^{-3}$ mole d'acide bromé (272 mg) d'activité spécifique : 6,98 mCi/mole est dissoute sous N_2 dans 3 ml de DMF anhydre, en présence de 4×10^{-3} moles d'imidazole (272 mg) et 2×10^{-3} moles du chlorure de diméthylterbutyle silyle (302 mg). L'agitation est maintenue 18 h à température ordinaire. Après addition de 3 ml d'eau, l'ester silylique est extrait avec un mélange de 25 ml d'éther éthylique et 25 ml de pentane. Après 3 lavages avec 3 ml d'eau, la solution organique est filtrée sur MgSO_4 . Après distillation des solvants sous vide et séchage en présence de P_2O_5 , l'huile récupérée (379 mg) est dissoute sous N_2 dans 3 ml de DMF en présence de 3×10^{-3} moles de N_3Na (195 mg) sous agitation magnétique pendant 2 h 15. La solution est portée ensuite à 70° pendant 3 h 15. Le lendemain matin l'ester silylique est récupéré de la manière

précédente après addition de 4 ml d'eau . La phase organique est lavée 3 fois avec 4 ml d'eau, séchée sur $MgSO_4$, distillée sous vide . Les dernières traces de solvant étant éliminées sous un courant d'azote, l'huile récupérée est dissoute sous N_2 dans 5 ml de chlorure de méthylène, distillée sur P_2O_5 en présence de 2 gouttes de DMF . A la température du bain de glace, nous ajoutons 0,20 ml de chlorure d'oxalyle par l'intermédiaire d'une seringue . La solution est maintenue à 0° pendant 18 h . Le solvant et les réactifs étant distillés sous vide, on récupère le chlorure d'acide cristallisé jaunâtre, que l'on dissout dans 5 ml de benzène anhydre . On ajoute ensuite, sous N_2 à température ordinaire, 0,40 ml de l'azide de triméthylsilyle, goutte à goutte . 2 heures plus tard, la solution est portée à l'ébullition pendant 30 minutes . Après départ du solvant, sous vide, le résidu jaunâtre obtenu est redissous dans 5 ml de chlorure de méthylène distillé sur P_2O_5 et 0,40 ml de triéthylamine . A cette solution, on ajoute en une seule fois $1,50 \times 10^{-3}$ mole de thioacétoxy-hydroxamate de méthyle (158 mg) . L'agitation magnétique de la solution est maintenue pendant 24 h . Après départ des solvants sous vide, l'huile résiduelle est chromatographiée deux fois sur gel de silice Merck 60.H avec un mélange acétate d'éthyle/pentane, 45/55, la progression de la chromatographie étant suivie par l'intermédiaire d'une cellule U.V. . On récupère finalement 25 mg d'un échantillon caractérisé par une activité spécifique de 4,2 mCi/mole dont la pureté radiochimique est égale à 98,6 % .

Le deuxième voie d'accès décrite précédemment est nettement plus satisfaisante : le meilleur échantillon (83 mg) étant caractérisé par une pureté radiochimique de 99,8 % .

Remerciements

L'un de nous (G.A.) remercie vivement la Direction du C.E.N. de SACLAY pour son hospitalité et Mr P. DONIE pour son accueil chaleureux .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 . PAYNE G.A., KNOCHE H. W., KONO Y. and DALY J.M.

- Physiol. Plant Pathol., 16, 227 (1980) .
- 2 . GREGORY P., EARLE E.D. and GRACEN V.E.
Host Plant Resistance to Pests (Hedin, P.A., ed.)
A.C.S. Symposium Series N° 62, p. 90, American Chemical Society, Washington
(1977) .
- 3 . HUMAYDAN H.S. and SCOTT E.W.
Hort. Sci., 12, 312 (1977) .
- 4 . KOEPPE D.E., COX J.K. and MALONE C.P.
Science, 201, 1127 (1978) .
- 5 . ARANDA G., GAUVRIT C., CESARIO M., GUILHEM J., PASCARD C. et TRAN HUU DAU
M.E. ; Phytochem., 22, 243 (1983) .
- 6 . ARANDA G., BERVILLE A., CASSINI R., FETIZON M. et POIRET B.
Experientia, 37, 112 (1981) .
- 7 . ARANDA G., FETIZON M. et POIRET B.
Experientia, 39, 396 (1983) .
- 8 . GAUVRIT C. et ARANDA G.
Phytochem., 22, 33 (1983) .
- 9 . ARANDA G. et GAUVRIT C.
Résultats non publiés .
- 10 . CHAKRABARTI P. et KHORANA H.G.
Biochemistry, 14, 5021 (1975) .
- 11 . FORDE B.G., OLIVER R.J.C. et LEAVER C.J.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 75, 3841 (1978) .
- 12 . SHIORI T., NINOMIYA K. et YAMADA S.
J. Am. Chem. Soc., 94, 6203 (1972) .
- 13 . BREEDERVELD H.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 81, 276 (1962) .
- 14 . a) MOLINA P., ALAJARIN M. et ARQUES A.
Synthesis, p. 596 (1982) .
b) LASZLO P. et POLLA E.
Tetrahedron Letters, p. 4651 (1984) .

- 15 . PICHAT L., BARET C., AUDINOT M., HERBERT M. et LAMBIN J.
Radioisotope Conference, 1, 245 (1954), Oxford, Butterworth Scientific
Publication, London .
- 16 . ARANDA G., FETIZON M.
Résultats non publiés .