

## Etude de l'hydrolyse et des propriétés toxiques vis-à-vis des mitochondries de maïs Texas, d'un insecticide, le méthomyl ou S-méthyl-N [(methylcarbamoyl)oxy] thioacétimidate

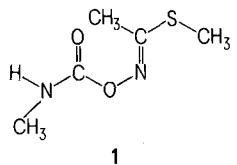
### Study of hydrolysis and toxic properties towards Texas corn mitochondrias of an insecticide, methomyl or S-methyl-N [(methylcarbamoyl)oxy] thioacetimidate

G. Aranda, A. Bervillé, R. Cassini, M. Fétizon et B. Poiret

Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau (France), Station de Pathologie Végétale, Centre National de Recherches Agronomiques, I.N.R.A., F-78000 Versailles (France), et Laboratoire d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., Université Paris-Sud, F-91405 Orsay (France), 2 mai 1980

**Summary.** Methomyl, or S-methyl-N [(methylcarbamoyl)oxy] thioacetimidate, a common insecticide, has been found to be a specific poison of mitochondria of corn with 'Texas' cytoplasm. Its hydrolysis under very mild acidic conditions affords thiomethyl methylthiosulphonate, which strongly inhibits the activity of 'CmS T' and 'N' mitochondria of corn.

Le méthomyl **1** est un insecticide commercial dont la structure est représentée ci-dessous:



C'est le N-méthyl carbamate d'une oxime. Les propriétés insecticides des composés de cette série donnent lieu actuellement à des études approfondies<sup>1</sup>. La toxicité du méthomyl vis-à-vis du cytoplasme Texas a été découverte par Humaydan et Scott<sup>2</sup>. Par la suite Koeppe, Cox et Malone<sup>3</sup> ont montré que la solution commerciale hydro-alcoolique du méthomyl ou 'lannate', provoquait sur les mitochondries isolées de plantes à cytoplasme Texas, les mêmes effets que la toxine de *Helminthosporium maydis* race T.

Nous avons constaté que le 'lannate' avait une toxicité constante alors que celle des solutions de méthomyl technique dans l'eau pure est plus ou moins prononcée selon les préparations. En conséquence, il était nécessaire d'identifier la molécule responsable de la toxicité à partir d'un lot<sup>4</sup> de méthomyl technique cristallisé relativement pur, l'origine de celle-ci pouvant être due à une impureté.

Parmi les différents effets du méthomyl sur les mitochondries isolées, nous avons retenu la stimulation de l'oxydation du NADH pour la mise en évidence de l'activité毒ique. La mesure du coefficient de stimulation de l'oxydation du NADH par les mitochondries représente la plus ou moins grande variation de l'activité toxicique. La méthode de préparation des mitochondries et les techniques expérimentales, en particulier la technique polarographique utilisée pour mesurer la consommation d'oxygène, ont été décrites précédemment<sup>5,6</sup>.

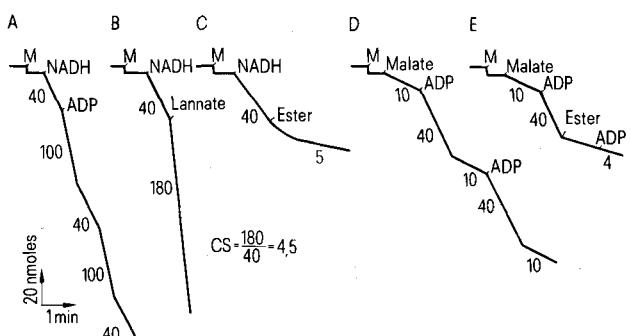
**Résultats et discussion.** Le carbamate commercial purifié par recristallisation du méthanol conduit à un produit qui cristallise en prismes.  $F = 78,5\text{--}79,5^\circ\text{C}$  caractérisé par ses propriétés spectroscopiques. La chromatographie du méthomyl commercial sur gel de silice permet de séparer diverses impuretés toutes inactives (test négatif de l'oxydation du NADH par les mitochondries isolées à partir de maïs à cytoplasme Texas). Le méthomyl obtenu après chromatographie ou recristallisé du  $\text{CH}_3\text{OH}$  en prismes est très actif (tableau).

Par contre, les eaux mères ou la solution de méthomyl technique dans l'eau présentent un taux de stimulation inférieur. En conséquence, la toxicité vis-à-vis du cytoplasme Texas n'est pas due à des impuretés du méthomyl technique.

Etant donné la possibilité d'une isomérie géométrique  $E \rightleftharpoons Z$  du carbamate **1**, celui-ci étant représenté sous la

forme Z, il est vraisemblable que la toxicité du méthomyl soit en relation avec l'équilibre précédent. Sachant que la proportion des formes syn et anti d'une oxime est fortement modifiée par traitement acide, le méthomyl technique a été dissous dans une solution chlorhydrique à 10% pendant 3 h à température ordinaire. Après extraction de la manière habituelle, le méthomyl recristallisé du méthanol fournit 2 espèces cristallines, des prismes (MP) et des fines aiguilles (MA). Le même traitement en solution chlorhydrique à 50 °C pendant 3 h fournit uniquement, après recristallisation, du méthomyl sous forme de longues aiguilles.  $F = 78,5\text{--}79,5^\circ\text{C}$ . Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  en solution dans le  $\text{CDCl}_3$  avec le TMS pour référence interne, des 2 variétés cristallines sont superposables. RMN  $^1\text{H}$  (ppm) 2,20 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{S}$ ), 2,85 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{NH}$ ,  $J = 5\text{ Hz}$ ), 6,0 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{NH}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (ppm) 17,3 (q,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 22,7 (s,  $\text{CH}_3\text{S}$ ), 31,4 (q,  $\text{CH}_3\text{NH}$ ), 159,1 (s, C=N), 164,6 (s, C=O). (s=singulet, d=doublet, m=multiplet et q=quartuplet).

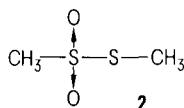
Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  en solution dans le DMSO d<sub>6</sub>, à température ordinaire, ne permettent pas de mettre en évidence un équilibre géométrique ou une quelconque



Inhibition de l'oxydation du malate et du NADH par des mitochondries de jeunes plantes de maïs variété F<sub>7</sub> en présence de l'ester thiométhylique de l'acide méthane sulfonique **2**. Tracés A et D: Témoin montrant la capacité de phosphorylation des mitochondries M. Tracé B: Stimulation de l'oxydation du NADH par le méthomyl **1**. Tracés C et E: Inhibition par l'ester **2**. Conditions expérimentales: Mannitol 300 mM, tampon phosphate 10 mM (pH 7,2), KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM et SAB 0,1% (g/ml). Concentration finale des réactifs: tracés A, B et C - NADH 1,5 mM, ADP 150  $\mu\text{M}$ . En B la concentration en méthomyl est 4,1 mM. Tracés D et E: malate 30 mM, ADP 225  $\mu\text{M}$ . En C et D la concentration en ester thiométhylique de l'acide méthane sulfonique est  $2,6 \cdot 10^{-5}$  M. Les nombres le long des tracés indiquent les intensités de consommation d'oxygène en nmole/min/mg de protéines. Environ 4 mg de protéines de la fraction mitochondriale (M) sont utilisés pour les tracés A, B et C et 6 pour les tracés D et E. L'addition d'ADP, courbe E, est un artifice destiné à visualiser l'inhibition.

isomérie conformationnelle du groupe N-méthylamide. La dissolution ou la recristallisation du méthomyl sous forme d'aiguilles (MA) fournit des prismes (MP) qui correspondent en conséquence à l'espèce cristalline la plus stable. Les 2 variétés cristallines du carbamate ont la même activité sur les mitochondries Texas: elles stimulent l'oxydation du NADH (tableau). Par contre, les eaux mères de recristallisation ainsi que la solution chlorhydrique inhibent complètement l'activité oxydative et phosphorylante des mitochondries du maïs, qu'elles proviennent ou non de plantes à cytoplasme Texas. Il est donc vraisemblable que l'hydrolyse du méthomyl fournit un composé fortement inhibiteur de l'activité des mitochondries.

Par chromatographie sur gel de silice des eaux mères, nous avons isolé à partir de 20 g de méthomyl, 200 mg d'un liquide nauséabond correspondant à la formule brute  $C_2H_6O_2S_2$ , d'après l'analyse centésimale et le spectre de masse: (30, 45, 47, 63, 79, 81 et  $m^+ = 126$ ). Les spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  comportent respectivement 2 singulets à 2,70 et 3,30 ppm et 2 quadruplets à 18,4 et 49,0 ppm qui correspondent à 2 méthyles. La réaction du chlorure de méthane sulfonyle avec le méthylmercaptopan dissous dans une solution de soude fournit avec un mauvais rendement l'ester thiométhylique de l'acide méthane sulfonique 2:



Ce composé présente des propriétés spectroscopiques en accord avec celles décrites par ailleurs<sup>7,8</sup>: elles sont rigoureusement superposables à celles qui correspondent au produit obtenu par hydrolyse du méthomyl.

Ce produit, qu'il soit d'origine synthétique ou en provenance du méthomyl, inhibe complètement les mitochondries d'origine végétale à la concentration de  $2,6 \times 10^{-5}$  mole  $l^{-1}$ . Pour les mitochondries de maïs, ce produit à la concentration de  $1 \times 10^{-5}$  mole  $l^{-1}$ , diminue le contrôle respiratoire (RCR) de 40% et réduit de 20% le coefficient de stimulation de l'oxydation du NADH induit par 10  $\mu$ l de lannate, soit 2000  $\mu$ g de méthomyl dans 3 ml de milieu réactionnel (figure).

Les propriétés antimicrobiennes de ce thioester ont déjà été signalées<sup>9</sup>. Par ailleurs, il ne présente pas de propriété

Produits testés	Activité sur mitochondries race T		
	1	2	3
Lannate commercial	5,24	4,08	2,86
Méthomyl récupéré à partir de la solution de lannate et redissous dans le $CH_3OH$	5,00	2,88	2,65
Méthomyl technique recristallisé du $CH_3OH$ , puis redissous dans le $CH_3OH$ en pavés prismatiques (MP) en aiguilles (MA)	4,60 4,55	3,00 3,90	3,35 3,70

Les conditions expérimentales exactes des différentes mesures sont décrites dans la figure 1. Les données numériques correspondent aux coefficients de stimulation CS des différents produits testés; elles traduisent l'oxydation du NADH par les mitochondries isolées à partir de plantes à cytoplasme Texas (tracé B, figure). Elles correspondent toutes à une même concentration de méthomyl, soit 2000  $\mu$ g dans 3 ml de milieu réactionnel. Elles ont été obtenues pour trois préparations différentes (1) (2) et (3) de mitochondries en tenant compte de leur vieillissement respectif. On remarquera la dispersion des résultats au sein d'une même préparation et entre les différents lots de mitochondries. La maîtrise du problème posé par la dispersion de ces mesures est actuellement en cours de résolution.

mutagène<sup>10</sup> à l'inverse de l'ester éthylique de l'acide méthane sulfonique.

*Méthane sulfonate de thiométhyle  $CH_3SO_2SCH_3$  synthétique.* Du méthylmercaptopan est condensé à la température du bain de glace dans une solution de soude, obtenue par dissolution de 4 g de NaOH dans 30 ml d'eau. 1 h plus tard, 3 ml de chlorure de méthane sulfonyle sont ajoutés goutte à goutte sous agitation magnétique. Après retrait du bain de glace, l'agitation est maintenue pendant 15 h. Après neutralisation avec du  $HNaCO_3$  solide, la solution aqueuse est extraite 2 fois avec 50 ml de  $CH_2Cl_2$ . La phase organique est lavée à l'eau pure jusqu'à neutralité, séchée sur  $K_2CO_3$ . On obtient une huile nauséabonde formée essentiellement de diméthyl disulfure que l'on élimine par distillation. Le résidu de la distillation est chromatographié sur plaques de silice HF 254 avec l'acétate d'éthyle pour éluant. On obtient finalement 200 mg d'une huile incolore nauséabonde, aux propriétés spectroscopiques identiques à celles décrites pour le méthanethiol sulfonate de méthyle<sup>7,8</sup>, lui-même obtenu par ailleurs à partir de diméthyl disulfure<sup>11</sup>.

Analyse centésimale:

Trouvé	% C = 19,27	H = 4,96	O = 24,96	S = 50,53
Calculé $C_2H_6O_2S_2$	19,05	4,76	25,4	50,79
IR ( $CCl_4$ ) $cm^{-1}$ :	1300, 1125 et 945.			
RMN $^1H$ ( $CDCl_3 + 1\% TMS$ ):	2,70 ppm (s), $CH_3-S$ ; 3,30 ppm (s) $CH_3-SO_2$			
RMN $^{13}C$ ( $CDCl_3 + 1\% TMS$ ):	18,4 ppm (q), $CH_3-S$ ; 49,0 ppm (q), $CH_3-SO_2$ .			

*Conclusion.* Le méthomyl utilisé comme insecticide est毒ique vis-à-vis du maïs à cytoplasme Texas. Un certain nombre de carbamates obtenus par modification structurale du méthomyl présentent également cette propriété toxique. L'étude de la corrélation activité/structure est actuellement en cours.

L'hydrolyse du méthomyl dans l'eau acidulée fournit une faible quantité de méthane sulfonate de thiométhyle 2, agent antibactérien puissant qui inhibe complètement les mitochondries d'origine végétale même pour des concentrations voisines de  $10^{-5}$  mole  $l^{-1}$  (maïs T et N, blé). Bien que ce produit n'ait pas été isolé à partir du 'lannate' ou d'une solution de méthomyl dans l'eau pure, ses propriétés imposent la prudente utilisation de ces dernières. En effet, il est vraisemblable que, placé dans des conditions naturelles après utilisation comme insecticide, le méthomyl puisse engendrer le méthane sulfonate de thiométhyle.

Par contre, le méthomyl purifié facilite l'étalonnage de l'activité des mitochondries, non seulement variable dans le temps, mais différente d'une préparation à une autre.

- C. E. Hatch, J. org. Chem. 43, 3953 (1978).
- H. S. Humaydan et E. W. Scott, Hort. Sci. 12, 312 (1977).
- D. E. Koeppe, J. K. Cox et C. P. Malone, Science 201, 1127 (1978).
- Nous remercions la Société Dupont de Nemours de nous avoir fourni le lot de méthomyl.
- A. Berville, A. Labib, H. Thiellement et B. Kouame, Annls Amél. Pl. 26, 607 (1976).
- A. Berville, in: Plant Mitochondria, p. 427. Ed. G. Ducet and C. Lance. Elsevier, North Holland and Biomedical Press, 1978.
- R. V. Norton, G. M. Beverly et I. B. Douglass, J. org. Chem. 32, 3645 (1967).
- G. R. Pettit, I. B. Douglass et R. E. Hill, Can. J. Chem. 42, 2357 (1964).
- S. S. Block, J. P. Weidner et A. Walsh, Chem. Abstr. 73, 65315 (1970).
- A. Cornu, communication personnelle.
- M. D. Bentley, I. B. Douglass et J. A. Lacadie, J. org. Chem. 37, 333 (1972).