

Sécurité et prévention

III - Approche chimique de la toxicologie

A - La toxicochimie organique

André Picot *

■ DÉFINITION DE LA "TOXICOCHIMIE"

La toxicochimie, discipline à l'interface de la chimie et de la toxicologie, permet d'aborder sous l'aspect moléculaire la prévision de la toxicité d'un produit chimique xénobiotique [1].

Étudiant les interactions moléculaires entre les substances xénobiotiques et les cibles biologiques, la toxicochimie nécessite une approche pluridisciplinaire associant la chimie et la toxicologie comme l'indique le schéma 1.

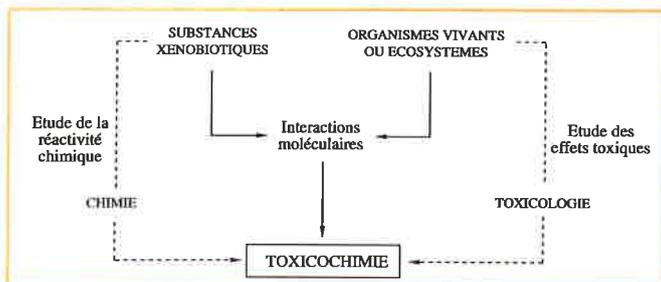


Schéma 1

Conditions de l'expression de la toxicité

Globalement, l'action toxique d'un produit donné, depuis son introduction dans l'organisme (phase d'exposition) jusqu'à l'effet observé (phase toxicodynamique), peut se résumer en trois grandes étapes dans lesquelles la capacité de métabolisation (phase toxicocinétique) joue un rôle essentiel [2] :

- une phase d'exposition durant laquelle le produit xénobiotique se présente sous une forme absorbable (gaz, aérosols, vapeurs, liquides, solides...);
- une phase toxicocinétique qui correspond à l'absorption du produit selon des voies variables suivie de sa redistribution dans l'organisme, en particulier par la voie sanguine. Si le produit n'est pas directement éliminé tel quel, il peut subir une métabolisation enzymatique qui le transforme en un ou plusieurs métabolites hydrosolubles qui sont ultérieurement excrétés;

– une phase toxicodynamique durant laquelle le xénobiotique lui-même : le toxique direct ou le toxique "ultime", provenant soit de l'hydrolyse directe du xénobiotique soit de sa métabolisation (métabolite réactif), interagit avec les cibles biologiques.

A part les toxiques directs qui agissent tels quels (produits corrosifs, irritants, alkylants directs, toxines, toxiques inhibiteurs de systèmes enzymatiques comme l'acide cyanhydrique...), la plupart des composés xénobiotiques nécessitent, pour devenir toxiques, l'intervention d'enzymes de métabolisation [3].

Cette biotransformation, qui est sous la dépendance de facteurs génétiques (révélés par la grande susceptibilité individuelle vis-à-vis des toxiques), peut faire apparaître des entités intermédiaires réactives qui présentent, le plus souvent, une grande affinité pour les électrons (entités électrophiles telles que les cations, les radicaux libres, les molécules neutres électrophiles...) : ce sont les toxiques ultimes. Un cas particulier est celui des composés instables dans l'eau. Ceux-ci, en présence de l'eau cellulaire, ou des milieux biologiques, s'hydrolysent en formant le toxique ultime. Le schéma 2 résume ces différentes possibilités.

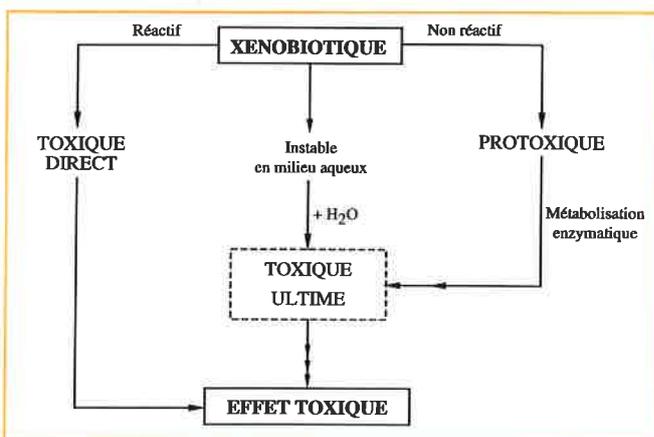


Schéma 2

*UPS 831 Prévention du Risque Chimique, ICSN, CNRS, 91198 Gif sur Yvette Cedex. Tél. : (1) 69.82.30.65. Fax : (1) 69.07.72.47.

Beaucoup de produits organiques sont lipophiles, c'est-à-dire solubles dans les graisses. Leur destinée dans l'organisme est conditionnée par leur capacité à franchir les différentes barrières lipoprotéiques puis à être pris en charge par les systèmes de métabolisation localisés principalement dans les membranes du réticulum endoplasmique lisse.

En règle générale, les produits lipophiles se répartissent dans les organes les plus riches en lipides (phospholipides) de l'organisme (système nerveux, cœur, moelle osseuse...).

Au niveau du système nerveux ces molécules xénobiotiques perturbent la transmission de l'influx nerveux, d'où des phénomènes d'excitation (ébrioité...) puis de dépression (anesthésie, narcose...) pouvant aboutir à la mort.

Il ne semble pas exister de relations évidentes entre la structure chimique d'un xénobiotique donné et sa fixation plus sélective dans un tissu riche en graisse. Il y a dans ce domaine des variations individuelles très importantes. Ainsi, la fixation des solvants lipophiles dans les graisses de soutien varie selon le sexe de l'individu : les femmes (20 % de graisses de soutien en moyenne) retenant plus les produits liposolubles que les hommes (en moyenne 10 % de graisses de soutien).

Mis à part quelques xénobiotiques très liposolubles comme les composés organochlorés : dichlorodiphényltrichlorométhane (DDT), hexachlorocyclohexane (HCH), hexachlorobenzène (HCB), polychlorodibenzodioxines (PCDD), polychlorodibenzofuranes (PCDF), ainsi qu'à un degré moindre divers solvants chlorés : dichlorométhane (chlorure de méthylène), trichloroéthylène (trichlo), tétrachloréthylène (perchloréthylène ou perchlo), etc, qui sont stockés partiellement dans les graisses de soutien, la majorité des composés liposolubles sont pris en charge par les systèmes enzymatiques de métabolisation en vue de les transformer en composés plus hydrosolubles [3].

Généralement cette hydrosolubilisation nécessite deux étapes consécutives : une première étape dite de fonctionnalisation fait apparaître sur la molécule de départ un groupe fonctionnel polaire (alcool, phénol, ...). Le métabolite primaire ainsi formé n'est généralement pas assez hydrosoluble et, dans une seconde étape dite de conjugaison ou de transfert, ce métabolite primaire fixe, sur la fonction réactive formée, une petite molécule endogène (acide sulfurique, acide glucuronique), susceptible de donner un sel alcalin hydrosoluble. C'est ce métabolite final qui est excrété par l'intermédiaire des reins dans les urines. Ces métabolites finals qui se retrouvent ainsi dans les urines sont susceptibles d'y être dosés, ce qui permet de déterminer le taux d'élimination urinaire d'un xénobiotique liposoluble ayant pénétré dans l'organisme.

Les relations éventuelles entre la structure d'un xénobiotique donné et sa capacité à être "biotransformé" en métabolites hydrosolubles ne semblent pas évidentes.

Au cours des réactions de détoxification peuvent apparaître des intermédiaires dont la réactivité est suffisamment grande et la durée de vie assez longue pour permettre leur liaison covalente avec les macromolécules cellulaires. Les macromolécules vitales ainsi modifiées peuvent ne plus assurer leur fonction, ce qui peut entraîner une dégradation cellulaire. Selon le type de macromolécule attaquée par ces intermédiaires réactifs, on observe des effets toxiques variables à long terme. Ainsi, la

dégradation des lipoprotéines des biomembranes peut entraîner une nécrose cellulaire.

La modification des glycoprotéines à la surface des membranes peut conduire à l'apparition d'atteintes immunologiques comme les réactions d'hypersensibilité (allergies) immédiates ou retardées. Mais ce sont les atteintes portant sur les acides nucléiques et, en particulier, sur l'ADN qui peuvent être les plus lourdes de conséquence. La modification de l'ADN peut aboutir à une mutation qui, si elle n'est pas éliminée ou si elle est mal réparée, conduit au démarrage d'un processus tumoral.

Si l'atteinte de l'ADN s'effectue durant la période embryonnaire, on peut aboutir à l'apparition de malformations au niveau de la descendance, ce sont les effets tératogènes.

En résumé, l'apparition d'un processus toxique à long terme est variable selon les cibles biologiques atteintes : nécrose cellulaire touchant plus ou moins sélectivement un organe donné, effets immunotoxiques ou génotoxiques, le tout pouvant aboutir à la mort cellulaire.

La prévision de la toxicité des produits xénobiotiques doit donc associer, d'une part, des informations liées à leur "bio-disponibilité" (phase toxicocinétique) et, d'autre part, des données sur l'interaction de l'entité réellement responsable de l'effet toxique ultime avec sa cible (phase toxicodynamique) (schéma 3).

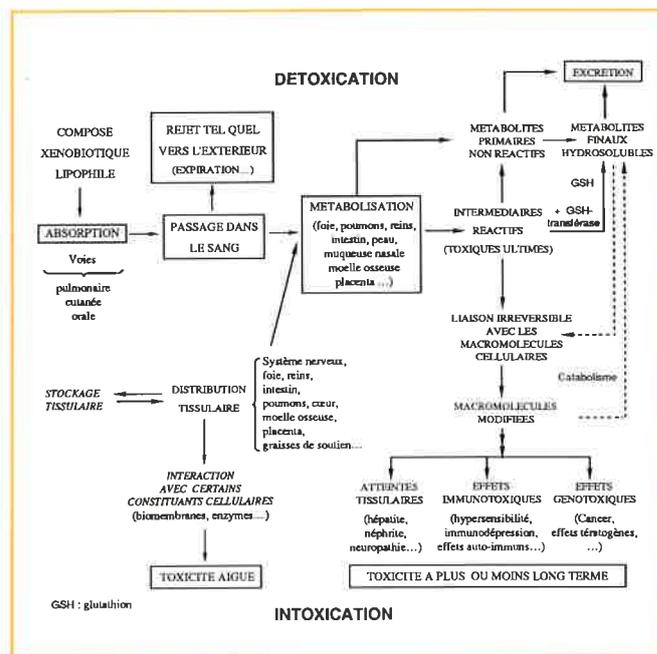


Schéma 3

Notion de "toxicophore"

Une approche relativement simple permettant de rendre compréhensible les relations entre la structure chimique d'une molécule donnée et son activité toxique est de rechercher sur celle-ci la présence ou non d'un toxicophore [1].

Le toxicophore peut se reconnaître au fait que toute modulation chimique qu'il va subir modifie ou supprime totalement son activité toxique tandis que son transfert sur une molécule

quelconque a des chances de conférer à cette dernière l'activité toxique. En revanche, les autres modulations chimiques apportées à la molécule ailleurs que sur le toxicophore ne doivent pas altérer l'activité qualitative mais seulement l'intensité d'action.

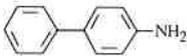
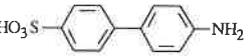
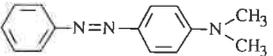
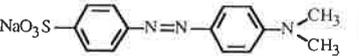
Pour les composés qui nécessitent, pour devenir toxiques, une métabolisation dans l'organisme et que l'on peut qualifier de "protoxiques", on peut ainsi rechercher la présence d'un "protoxicophore" dont l'activation enzymatique conduit ultérieurement à un groupement "toxicophore". Cette notion de toxicophore comme celle de pharmacophore (partie de la molécule porteuse de l'activité thérapeutique), dont elle est un cas particulier, est à interpréter avec la plus grande prudence et il faut se garder de toute généralisation excessive.

A titre d'exemple, l'introduction d'une fonction sulfonique sur le noyau d'une amine aromatique (arylamine) peut supprimer toute activité génotoxique, vraisemblablement en rendant le composé hydrosoluble et donc inaccessible aux enzymes de métabolisation liposolubles [2]. Ainsi le 4-aminobiphényle, cancérigène vésical puissant, est rendu non génotoxique par introduction d'une fonction acide sulfonique en position para [4] (tableau I).

Par contre, dans le cas du 4-diméthylaminoazobenzène ou jaune de beurre, colorant liposoluble mutagène et hépatocancérigène, l'introduction en para d'un groupe acide sulfonique (sous forme de son sel de sodium) conduit à un colorant hydrosoluble, l'hélianthine ou méthyl orange (indicateur coloré) qui présente encore une activité mutagène mais n'est plus cancérigène en expérimentation animale [5] (tableau I).

Ces notions de toxicophore et de protoxicophore, que nous avons proposées en 1984 [1], peuvent permettre, dans une série chimique donnée, une certaine approche des relations entre la structure chimique et la toxicité, en particulier la toxicité à long terme (effets mutagènes, cancérigènes, tératogènes, immunotoxiques ou organotoxiques).

Tableau I

GENOTOXIQUE STRUCTURE	ACTIVITE	
	mutagène (test d'Ames)	cancérigène (expérimentation animale)
 4-Aminobiphényle	+	+
 Acide 4-aminobiphényle-4'-sulfonique	-	-
 4-Diméthylaminoazobenzène (jaune de beurre)	+	+
 4-Diméthylaminoazobenzène-4'-sulfonate de sodium (hélianthine)	+	-

EXEMPLES D'APPLICATION DE LA TOXICOCHIMIE

L'hexane, solvant neurotoxique périphérique et ses produits de remplacement

Parmi les solvants hydrocarbonés de la série des alcanes (hydrocarbures linéaires non ramifiés), il est surprenant de constater que seul l'hexane (composé à 6 atomes de carbone) est doué de propriétés neurotoxiques périphériques puissantes. Cette toxicité se manifeste par une paralysie progressive des membres (polynévrite)[6].

En expérimentation animale, au cours d'intoxication à long terme, on observe une dégénérescence de la partie terminale des nerfs longs, d'où la suppression de la conduction nerveuse (schéma 4).

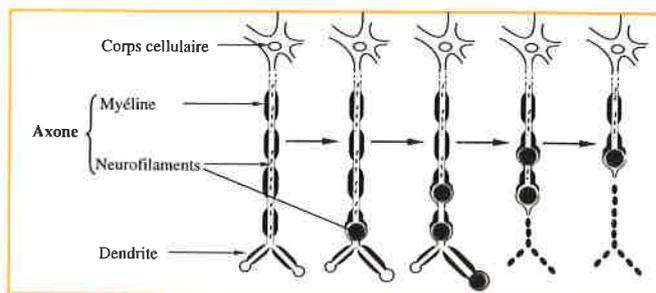


Schéma 4

En comparant les formules développées des alcanes de C5 à C7, on ne peut prévoir que seul l'hexane est un neurotoxique périphérique. C'est donc au niveau de la transformation dans l'organisme de ces composés qu'il faut rechercher une différence [3].

Les alcanes, composés très liposolubles, doivent pour être éliminés de l'organisme subir une métabolisation qui les transforme en composés hydrosolubles (métabolites) que l'on retrouve dans les urines. Classiquement, cette biotransformation s'effectue en deux étapes successives (schéma 3). L'une va, par oxydation sélective de l'avant dernier atome de carbone (position $\omega-1$), transformer l'alcane en un alcool secondaire (alcan-2-ol). Cet alcool, pas assez hydrosoluble pour être éliminé tel quel, nécessite le transfert sur son groupe hydroxyle de petites molécules endogènes très polaires, comme l'acide glucuronique (dérivé du glucose) ou l'acide sulfurique, qui sont au préalable activées sous forme de dérivés phosphorés. Ce sont ces glucuronides et ces sulfates sous forme de sels alcalins que l'on retrouve dans les urines et qui peuvent servir dans certains cas d'indicateurs biologiques d'une intoxication (schéma 5), dosages mis en application dans les techniques de surveillance biologique (biomonitoring).

C'est ainsi que sont éliminés des alcanes comme le pentane, l'heptane et, pour une faible part, l'hexane. En fait, dans le cas de l'hexane, l'hexan-2-ol formé lors de la première étape d'oxydation, au lieu d'être éliminé par conjugaison, est pris en charge par diverses enzymes qui le transforment par l'intermé-

dière de l'hexane-2-one (méthylbutylcétone) en hexane-2,5-dione, métabolite ultime, responsable de la neurotoxicité [6] (schéma 6).

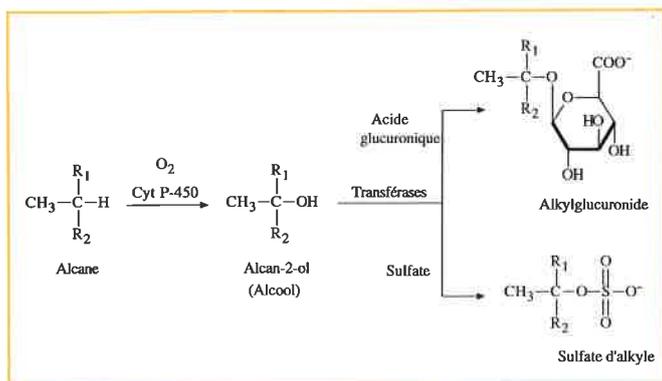


Schéma 5

A titre de comparaison, chez le rat, l'hexane-2,5-dione est 3,3 fois plus neurotoxique que l'hexane-2-one (méthylbutylcétone) et 38 fois plus neurotoxique que l'hexane.

Chez l'homme, l'hexane-2,5-dione est le métabolite principal que l'on retrouve dans le sang et les urines et c'est l'agent responsable des polynévrites observées lors de l'intoxication à long terme par l'hexane ou l'hexane-2-one [6].

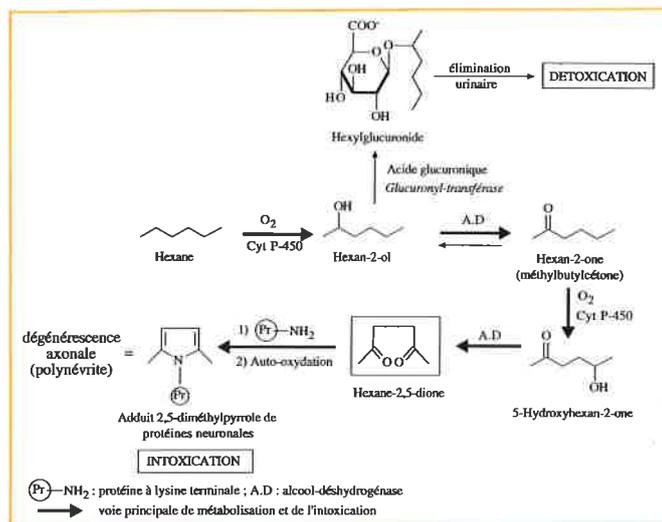


Schéma 6

L'hexane-2,5-dione, comme les autres 1,4-diones, peut réagir selon une réaction de Paal-Knorr avec une fonction amine primaire terminale de certains constituants de la cellule nerveuse (protéines...) en formant un hétérocycle pyrrolique, ce qui peut entraîner une dénaturation de ses structures vitales, vraisemblablement après auto-oxydation (schéma 7).

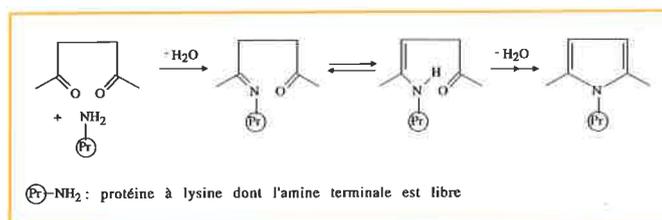


Schéma 7

Cette hypothèse, émise par A. Picot en 1979 [3], a été confirmée en 1981 par l'isolement de protéines de neurofilaments dont les fonctions amines terminales libres des restes lysine sont bloquées sous forme de dérivés pyrroliques [7].

Comme on pouvait le prévoir, le pentane (n = 2) et l'heptane (n = 4) qui ne conduisent pas après métabolisation à des composés 1,4-dicétoniques du type hexane-2,5-dione, ne sont pas des neurotoxiques périphériques.

Cette différence de toxicité provient bien d'une déviation de la métabolisation de l'hexane vers un métabolite neurotoxique qui contient un toxicophore 1,4-dicétonique (schéma 8).

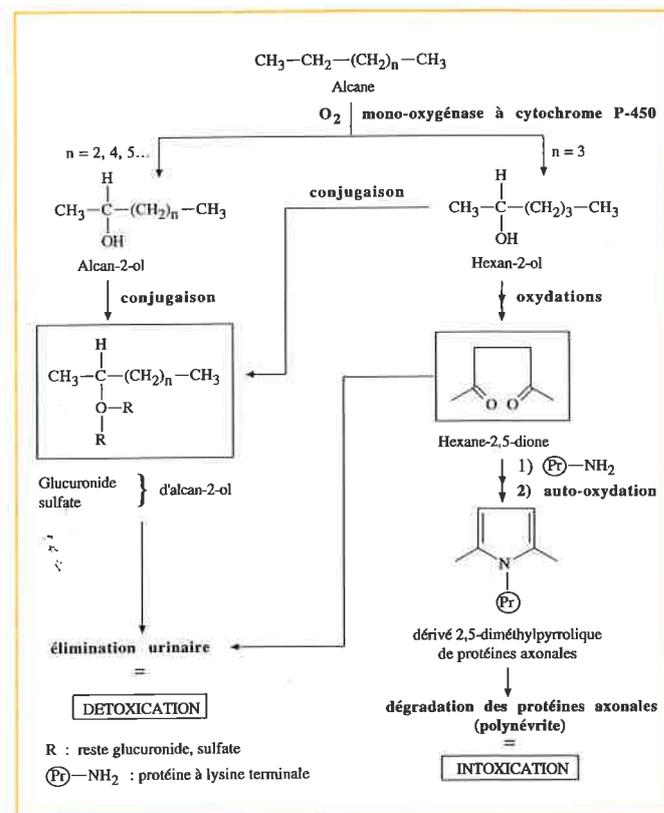
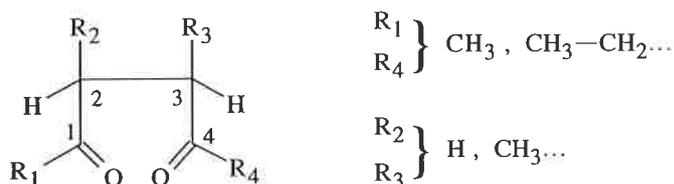


Schéma 8

On peut considérer une 1,4-dione comme le toxicophore responsable de la neurotoxicité périphérique de l'hexane et des différents métabolites intermédiaires qui aboutissent à l'hexane-2,5-dione.



"Toxicophores" 1,4-dione

La mise en évidence de relations structure-activité toxique est particulièrement intéressante dans la série des 2,4-diones.

En prenant pour référence la neurotoxicité périphérique de l'hexane-2,5-dione, l'expérimentation chez le rat a permis de quantifier le pouvoir neurotoxique de quatre homologues méthylés de l'hexane-2,5-dione (tableau II).

Tableau II

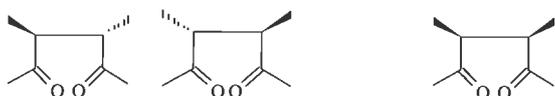
Hexane-2,5-diones	Formules développées	Neurotoxicité
Hexane-2,5-dione		1
3-Méthylhexane-2,5-dione		3,5
3,4-Diméthylhexane-2,5-dione		2,3
3,3-Diméthylhexane-2,5-dione		0

Si l'adjonction d'un méthyle en position 3 sur l'hexane-2,5-dione augmente sensiblement (3,5 fois) la neurotoxicité périphérique, l'addition de deux méthyles, respectivement en position 3 et 4, accroît de plus de 20 fois (23 fois) cet effet. Dans ce dernier cas on observe chez le rat une paralysie totale des membres en 4 semaines. L'étude histologique des neurones des nerfs longs (sciatique...) ainsi touchés montre que ce sont les zones du neurone situées près du corps cellulaire qui subissent des altérations structurales, ce qui contraste avec l'atteinte distale observée avec l'hexane-2,5-dione (schéma 4).

Comment expliquer cet accroissement de la neurotoxicité observée expérimentalement avec ces deux homologues méthylés de l'hexane-2,5-dione ? L'étude cinétique de la réaction de Paal-Knorr entre des amines primaires et diverses hexane-2,5-diones substituées montre une nette augmentation de la vitesse de formation de pyrroles dans le cas de la 3,4-diméthylhexane-2,5-dione (accélération due à l'effet inducteur +I apporté par les deux groupes méthyles).

De même in vivo, la formation de dérivés du diméthyl-2,5-pyrrole doit être favorisée dans le cas de la 3,4-diméthylhexane-2,5-dione, augmentant de ce fait l'effet neurotoxique observé.

Par ailleurs, la vitesse de formation du 2,3,4,5-tétraméthylpyrrole est plus rapide avec le racémique (±)-3,4-diméthylhexane-2,5-dione qu'avec la méso-3,4-diméthylhexane-2,5-dione. Ceci est en accord avec l'apparition chez le rat de paralysie des nerfs longs trois fois plus rapidement avec les isomères du racémique qu'avec l'isomère méso.



(±)-3,4-Diméthylhexane-2,5-dione Méso-3,4-diméthylhexane-2,5-dione
(les plus neurotoxiques)

L'absence d'action neurotoxique périphérique avec la 3,3-diméthylhexane-2,5-dione peut s'interpréter par l'impossibilité de former un noyau pyrrole, s'il n'y a pas au moins un hydrogène sur le carbone en position 3. La formation d'une énamine sur le carbone 1 est envisageable à partir de l'imine intermé-

diaire, mais les étapes ultérieures ne peuvent pas aboutir à un noyau pyrrole, comme dans le cas des composés possédant un hydrogène libre en position 3 (schéma 9).

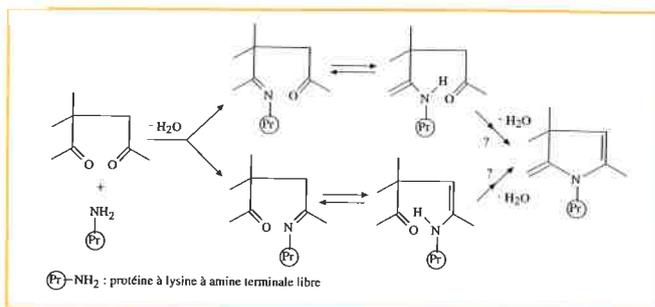


Schéma 9

Tous ces résultats mettent en évidence qu'en plus du groupe dicétonique en 2,5, il est nécessaire qu'une l'hexane-2,5-dione substituée possède sur ses carbones 3 et 4 au moins un hydrogène libre pour pouvoir former un noyau pyrrole. Ainsi la 3,4-diméthylhexane-2,5-dione, en présence d'une amine primaire forme facilement un composé de type 2,3,4,5-tétraméthylpyrrole comme l'indique le schéma 10.

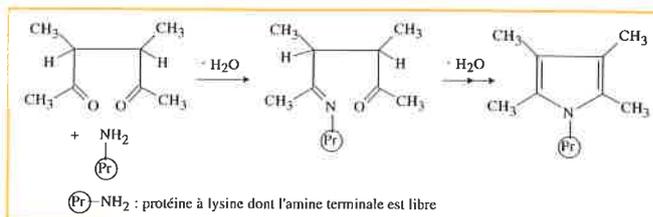


Schéma 10

Il est probable que la neurotoxicité périphérique observée avec l'hexane-2,5-dione et ses dérivés méthylés en 3 et diméthylés en 3,4 procède par des mécanismes similaires. Ceux-ci doivent faire intervenir la formation par réaction de Paal et Knorr d'un 2,5-diméthylpyrrole à partir de la fonction amine libre d'une lysine terminale des protéines neuronales.

L'étude du mécanisme de la réaction de Paal-Knorr entre l'hexane-2,5-dione, ou ses produits de substitution, et une amine primaire semble privilégier la formation rapide d'un hémiaminal (carbinolamine) qui se cycliserait dans une étape lente en 2,5-dihydroxypyrrolidine substituée. Cette dernière se déshydrate en énamine puis finalement en 2,3-diméthylpyrrole 3,4-disubstitué (schéma 11).

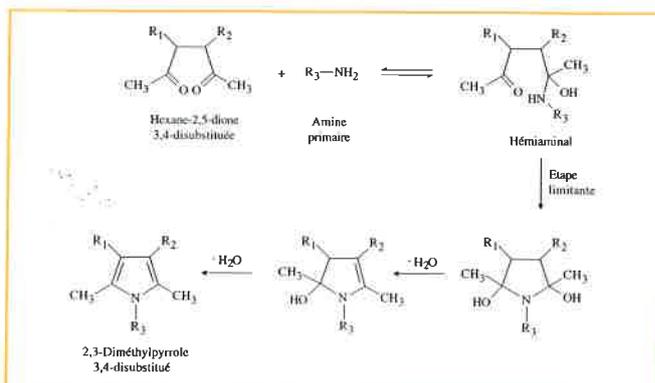


Schéma 11

Un tel mécanisme permet d'expliquer la cyclisation plus facile des isomères du racémique par rapport à l'isomère méso dans la série de la 3,4-diméthylhexane-2,5-dione.

Il faut remarquer que les pyrroles substitués ainsi formés sont très sensibles aux réactions d'auto-oxydation dont certaines peuvent in vivo participer aux réactions de pontage entre les neurofilaments et à l'apparition de pigments orangés au niveau des neurones traités par l'hexane-2,5-dione.

Dans la famille des composés dicarboxylés, des 1,2-diones (α -diones) aux 1,5-diones (δ -diones), seules les 1,4-diones (γ -diones) sont capables de former avec les amines primaires des hétérocycles stables, en l'occurrence un pyrrole. Ce sont aussi les seules diones qui sont des neurotoxiques périphériques (tableau III).

Tableau III

Dicétones	a	b	g	d
Structure				
Neurotoxicité	-	-	+	-

Ainsi l'heptane-2,5-dione et l'octane-3,6-dione présentent chez le rat une neurotoxicité similaire à celle observée avec l'hexane-2,5-dione. Selon l'hypothèse du toxicophore, il est probable que la nonane-2,5-dione et la nonane-3,6-dione soient aussi des neurotoxiques périphériques (tableau IV).

Tableau IV

Hexane-2,5-dione	Heptane-2,5-dione	Octane-3,6-dione
Nonane-2,5-dione	Nonane-3,6-dione	

En résumé, dans cette approche toxicochimique, pour être un bon toxicophore capable de provoquer des neuropathies périphériques il est indispensable que l'enchaînement 1,4-dicétonique possède au moins un atome d'hydrogène sur chacun des carbones (en 2 et 3) situés entre les deux groupes carbonyles.

L'étude expérimentale de la neurotoxicité périphérique de l'hexane-2,5-dione et de ses dérivés méthylés montre qu'il est parfois possible d'établir certaines relations entre la structure de composés, dans une famille déterminée, possédant un toxicophore caractéristique et une toxicité spécifique.

Mais dans la pratique, comment mettre en application ces concepts théoriques ?

L'exemple de la recherche d'un solvant de remplacement pour l'hexane qui est un neurotoxique périphérique chez l'homme est tout à fait caractéristique.

Dans le choix d'un solvant de remplacement, il est indispensable de prendre en compte les critères physico-chimiques, en particulier la volatilité. Celle-ci en effet joue un rôle primordial dans l'inflammabilité d'une substance donnée.

Dans le cas des alcanes, composés hydrocarbonés très inflammables, il est préférable de sélectionner comme solvant de remplacement de l'hexane ($E_b = 69^\circ\text{C}$ sous 760 mm) plutôt l'heptane ($E_b = 98,5^\circ\text{C}$ sous 760 mm) que le pentane ($E_b = 36^\circ\text{C}$ sous 760 mm) qui est lui très volatil.

Les essences spéciales comme les éthers de pétrole dont certains contiennent beaucoup d'hexane (essence C...) sont à déconseiller.

Il faut remarquer que la cyclisation de l'hexane en cyclohexane ($E_b = 80,7^\circ\text{C}$ sous 760 mm) supprime toute neurotoxicité périphérique.

Dans le milieu du travail, le remplacement de l'hexane peut facilement être entrepris.

Le pentane, l'heptane ou le cyclohexane sont de bons substitués mais il faut tenir compte des conditions climatiques lors de leur utilisation (le pentane est à déconseiller dans les pays chauds, tandis que le cyclohexane qui cristallise facilement à basse température doit être additionné d'une petite quantité de méthylcyclohexane afin de diminuer le point de congélation du mélange).

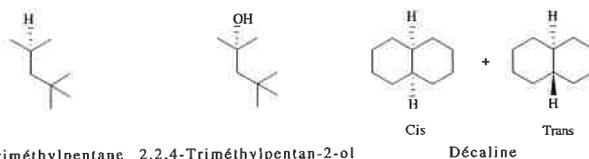
D'autres facteurs doivent aussi intervenir dans les critères de choix : coût, facilité d'approvisionnement ...

Les alcanes néphrotoxiques

En expérimentation animale, chez le rat mâle, l'exposition à des mélanges d'hydrocarbures saturés renfermant des alcanes ramifiés (isoparaffines) entraîne l'apparition d'atteintes rénales particulières (dégénérescence des tubes contournés avec dépôts hyalins de nature protéique) [10]. L'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane) et divers cyclanes comme la décaline provoquent aussi spécifiquement chez le rat mâle des atteintes rénales identiques [11].

Aucune corrélation entre la structure de ces alcanes et les propriétés néphrotoxiques observées chez le rat mâle (et non chez le rat femelle) n'a été jusqu'à présent mise en évidence. Eventuellement, elle pourrait faire intervenir des voies de métabolisation entraînant l'accumulation dans les tubules rénaux de métabolites ultimes, qui s'associeraient avec une protéine rénale : l' α -2 microglobuline ou α -2 μ globuline qui est spécifique du rat mâle [11] (schéma 12).

Dans le cas de l'iso-octane, c'est le 2,2,4-triméthylpentan-2-ol, le métabolite principal, qui forme un complexe avec l' α -2 μ globuline.

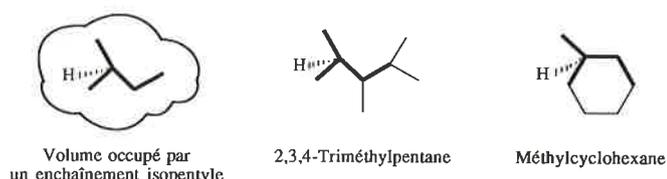


Chez des travailleurs en contact avec des produits pétroliers, des atteintes rénales (glomérulo-néphrites, cancers...) ont été décrites sans qu'aucune corrélation précise avec la nature des composés, éventuellement néphrotoxiques, n'ait pu être jusqu'à présent établie [11f,11g].

Néanmoins des études préliminaires de relations structure-activité [11f,11g] semblent indiquer que la capacité d'associa-

tion (réversible) de ces structures avec l' α -2 μ globuline dépend, pour une part, d'interactions hydrophobes (nécessité d'une région hydrophobe occupant l'espace d'un enchaînement isopentylique) et, d'autre part, d'interactions de type "pont hydrogène" (liaison forte avec le 2,2,4-triméthylpentan-2-ol).

Expérimentalement, d'autres hydrocarbures, aliphatiques comme le 2,3,4-triméthylpentane ou cycliques comme le méthylcyclohexane, entraînent chez le Rat mâle l'apparition de dépôts hyalins de nature protéique ce qu'une approche structure-activité simplifiée avait pu prédire [11f].



Avec l'exemple des alcanes doués de propriétés néphrotoxiques, on peut mesurer la difficulté d'établir des relations simples entre la structure chimique et une activité toxique donnée. Ainsi, en expérimentation animale, l'espèce, le sexe, les facteurs nutritionnels, etc., interviennent parfois de façon prépondérante, surtout au niveau de la biotransformation d'un xénobiotique. Dans ces conditions, toute extrapolation se fera avec beaucoup de prudence, même dans une série analogue.

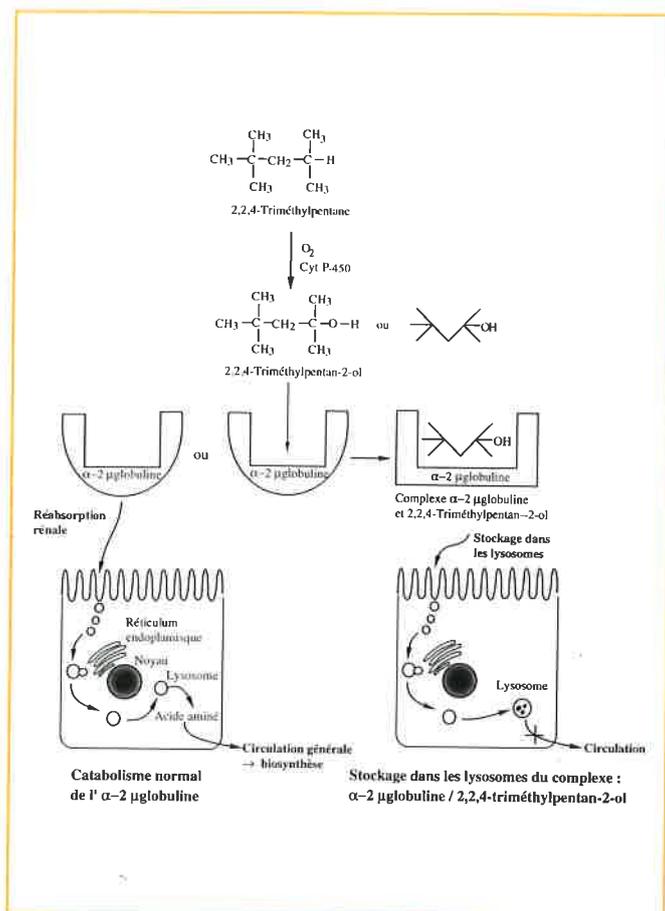


Schéma 12

La benzidine, cancérigène vésical et ses produits de remplacement

La benzidine est l'un des produits les mieux connus parmi les amines aromatiques, famille qui constitue les matières premières de base de la synthèse des colorants azoïques (les colorants à l'aniline) [13]. Ainsi, la benzidine est le produit de base de plus de 250 colorants, mais actuellement son utilisation est soumise à de sévères réglementations dans de nombreux pays, en particulier aux États-Unis et son usage industriel tend à diminuer.

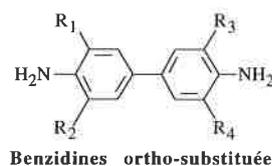
Dans les laboratoires, la benzidine est encore utilisée comme réactif de révélation : en chimie (détection de l'eau oxygénée, du chlore, des cyanures, des sulfates, des sucres...), en biochimie (révélation des peroxydases...), en clinique (révélation des traces de sang...). Même certaines manipulations de travaux pratiques mettent en œuvre des révélations à la benzidine ou à ses dérivés (o-dianisidine, o-tolidine...) [14].

Or, il s'agit de l'un des cancérigènes humains les plus redoutables rencontrés dans les laboratoires. Comme d'autres amines aromatiques (2-naphtylamine, 4-aminobiphényle, o-tolidine...), la benzidine peut amener après des temps de latence très variables (de quelques mois à 15-20 ans ou plus) à l'apparition d'un cancer de la vessie particulièrement dramatique.

Son mode d'action est encore imparfaitement connu et semble procéder par divers mécanismes variables selon le lieu de métabolisation. Au niveau de la vessie, des systèmes enzymatiques à activité peroxydasiq (peroxydases ou cyclo-oxygénase du métabolisme de l'acide arachidonique) oxydent l'un des atomes d'azote de la benzidine selon un mécanisme de type radicalaire (oxydation à un seul électron) [15].

Le premier intermédiaire de type cation-radical s'oxyde ultérieurement en entités réactives (diimines, nitrénium...) suspectées d'être responsables de la formation de liaisons covalentes solides avec les macromolécules (ADN...) des cellules épithéliales de la vessie, début du processus d'initiation de la cancérogénèse (schéma 13).

En encombrant suffisamment l'accès aux deux atomes d'azote de la benzidine, on peut envisager de perturber suffisamment l'accès des enzymes impliquées dans l'oxydation de ceux-ci et ainsi d'empêcher la formation des intermédiaires réactifs responsables de la toxicité.



L'adjonction d'un seul substituant sur chacun des noyaux aromatiques (R_1 et $R_3 = CH_3, OCH_3, Cl, NH_2...$) ne supprime pas l'activité génotoxique, les produits sont encore mutagènes et cancérigènes. Par contre, l'addition de deux substituants de part et d'autre des atomes d'azote, comme dans le cas de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) supprime l'activité mutagène et cancérogénèse tout en préservant sa capacité de détection des peroxydases ou des produits à activité peroxydasiq (cytochrome P-450...) [16] (tableau 5).

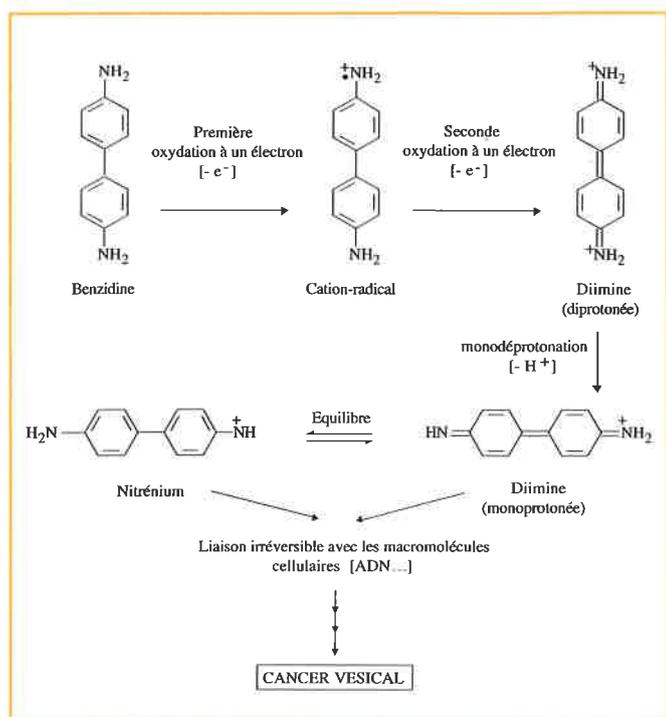


Schéma 13

Afin de préciser si l'encombrement autour des atomes d'azote est une condition suffisante pour supprimer l'activité génotoxique, des analogues tétrahalogénés en position ortho-ortho'

Tableau V

COMPOSE	ACTIVITE MUTAGÈNE	ACTIVITE CANCÉROGÈNE	DETECTION DES PEROXYDASES (sensibilité)
 Benzidine	+	++	++
 Ortho-tolidine	+	++	+++
 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine	-	-	+++

ont été synthétisés, leur activité mutagène testée [17] et des voies de bioactivation proposées (schéma 14).

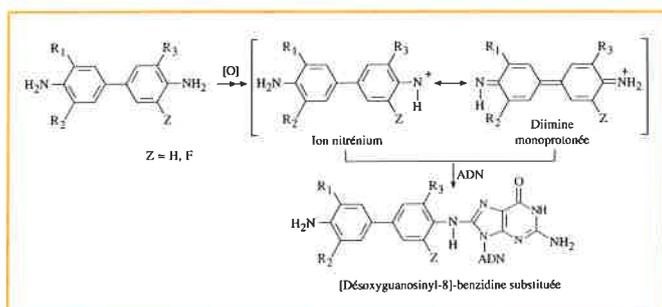


Schéma 14

Alors que les dérivés tétrachlorés et tétrabromés en position 3,3',5,5' sont inactifs tout comme le dérivé tétraméthylé, par

contre le dérivé tétrafluoré montre une activité mutagène, dans certains tests d'Ames, égale à celle de la benzidine (tableau VI).

Tableau VI

Rayon de Van Der Waals	Composé	Activité mutagène (test d'Ames avec activation)
H : 0,12 nm	 Benzidine	++
F : 0,135 nm	 3,3',5,5'-Tétrafluorobenzidine	++
Cl : 0,18 nm	 3,3',5-Trichlorobenzidine	+++
Cl : 0,18 nm	 3,3',5,5'-Tétrachlorobenzidine	0
CH ₃ : 0,20 nm	 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine	0

Si l'on considère le rayon de van der Waals de ces différents atomes, seuls les atomes ou groupes d'atomes nettement plus volumineux que l'hydrogène (Cl, CH₃, Br) sont capables d'inhiber cette activité mutagène. Par ailleurs, la 3,3',5-trichlorobenzidine qui possède une position ortho libre présente une forte activité mutagène, beaucoup plus importante que celle de la benzidine elle-même [17]. La présence d'atomes d'halogène comme le chlore et le brome en position ortho et ortho' (positions 3, 5 et 3', 5') augmente fortement l'activité mutagène de la benzidine à condition de laisser une position ortho avec un substituant peu encombrant (Z = H ou F dans le cas de la 3,3',5,5'-tétrafluorobenzidine (schéma 13) (tableau VI).

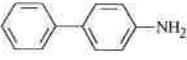
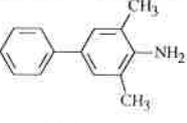
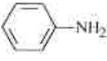
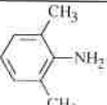
Dans la série de la benzidine il semble que, pour observer une activité mutagène (tableau VI), il soit nécessaire d'avoir au moins une position en ortho non encombrée (Z = H ou F). L'absence d'effet encombrant dans cette position permet la formation d'adduit entre une guanine en position C-8 de l'ADN et l'intermédiaire réactif (diimine monoprotonée ou nitronium) provenant de l'activation de l'un des atomes d'azote de la benzidine [18] (schéma 14).

Dans cette série de la benzidine, pour observer une activité, mutagène, il est nécessaire que cette benzidine substituée possède :

- des fonctions amines primaires libres et non encombrées,
- s'il y a des substituants encombrants autour des fonctions amines primaires, au moins une des positions ortho libre.

Comme il a été signalé précédemment dans ces approches toxicochimiques, il faut se garder de faire des généralisations

Tableau VII

COMPOSE	ACTIVITE GENOTOXIQUE	
	Mutagénicité	Cancérogénicité expérimentale
 4-Aminobiphényle	+	+
 4-Amino-3,5-diméthylbiphényle	+	?
 Aniline	-	+
 2,6-Diméthylaniline	?	+

hâtives. Ainsi, dans la série du 4-aminobiphényle [4] et de l'aniline [19], l'encombrement de l'atome d'azote par des groupes méthyle en ortho et ortho' ne supprime pas l'activité génotoxique, peut-être par suite de la possibilité de métabolisation intervenant au niveau de la position en para de l'amine qui est libre par rapport aux dérivés de la benzidine (tableau VII).

En pratique, la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) peut avantageusement remplacer la benzidine dans ses principaux usages pour la détection des peroxydases (cytochimie, cyto-immunochimie, clinique...).

Au contraire de la benzidine et des benzidines disubstituées en ortho ($R_1 = R_2 = \text{CH}_3, \text{Cl}, \text{Br}, \text{NH}_2, \dots$), la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine n'est pas sensible à la polymérisation (impliquant une position ortho libre), ce qui exclut son utilisation pour certaines caractérisations comme la détection de l'hémoglobine sur les gels de polyacrylamide en milieu acide. Par contre, la 3,3'-diaminobenzidine, très utilisée en cytochimie, est un excellent substitut de la benzidine bien qu'elle soit mutagène et faiblement cancérogène en expérimentation animale [20].

Pour beaucoup d'utilisateurs, le choix d'un produit de substitution implique obligatoirement des qualités égales à celles du produit à remplacer. Malheureusement, ce n'est pas toujours possible pour des produits aux multiples applications. La benzidine est dans ce sens exemplaire.

Ainsi, dans une majorité d'utilisation la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine est un excellent substitut, souvent même plus sensible que la benzidine elle-même [16]. Par contre, dans quelques techniques spécifiques, seule la 3,3'-diaminobenzidine donne des résultats satisfaisants et, dans ce cas, il faut l'utiliser en mettant en œuvre la méthodologie rigoureuse nécessaire pour la manipulation des produits génotoxiques [21].

Il reste encore beaucoup à faire pour que des recherches soient initiées afin de trouver des réactifs de substitution suffisam-

ment sensibles et non toxiques et qui puissent garantir, pour les personnels amenés à travailler en permanence avec ces produits (laboratoires de contrôle, d'essais, de recherche...), une meilleure protection de leur santé.

QU'ATTENDRE DE LA TOXICOCHIMIE ?

La toxicochimie, discipline interdisciplinaire, peut apporter une explication moléculaire (décrite par la chimie) à l'effet toxique observé (décrit par la toxicologie) (schéma 1).

L'intérêt majeur d'une telle approche théorique est d'être prédictive. Partant d'une bonne connaissance de la "biodisponibilité" et de la réactivité du toxique final (toxique ultime), il est possible, dans certains cas, de rechercher dans une série donnée de composés celui ou ceux qui ont, à qualité égale bien entendu, le moins d'effets néfastes sur la santé, surtout à long terme.

Ainsi, dans la famille des alcanes, comment expliquer que seul l'hexane soit un neurotoxique périphérique ? L'étude de sa biotransformation (schéma 6) montre qu'il est surtout métabolisé en hexane-2,5-dione que l'on retrouve dans le sang et au niveau des tissus nerveux où il s'accumule et produit les effets toxiques observés (dégénérescence des nerfs longs). Ce métabolite final présente dans sa structure un enchaînement 1,4-dicétonique porteur de la forte réactivité et, par là même, de la toxicité de cette molécule. Par contre, les autres alcanes n'aboutissent pas à des métabolites renfermant un tel toxico-phore.

Ainsi, l'identification d'un toxicophore dans une série de composés à propriétés voisines peut permettre d'éliminer le composé toxique (ici l'hexane) et ceci afin de sélectionner les composés présentant à qualité égale (par exemple l'heptane, le pentane...) le moins de risque pour la santé [22].

Dans une série déterminée, pour un composé donné, si l'on possède d'une part une bonne connaissance de sa "biodisponibilité", en particulier sur sa métabolisation, et que d'autre part l'on acquiert des informations sur la réactivité du ou des métabolites ultimes (ou des intermédiaires réactifs) impliqués dans la toxicité, il est possible d'établir d'éventuelles relations entre la structure chimique de ce composé et la toxicité observée.

Même dans une série analogue, l'extrapolation à d'autres composés se fera toujours avec prudence et seulement à titre indicatif. En effet, seule l'expérimentation animale (sur au moins 2 espèces dont un rongeur) et surtout l'épidémiologie peuvent permettre de confirmer ou non la toxicité à long terme d'un composé prévue par des approches toxicochimiques [23].

Historiquement, l'étude quantitative des relations structure-activité, dite méthode QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) [24] a surtout été développée par C. Hansch [25] qui prit en considération les facteurs thermodynamiques et électroniques des molécules.

En 1981, J. Kaufman [26] a proposé une méthode informatique pour élucider les relations structure-activité toxique en vue d'une éventuelle prédiction de la toxicité.

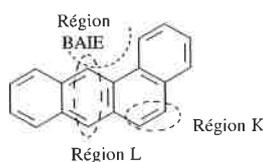
L'utilisation de méthodes graphiques comme le système DARC mis au point par J.E. Dubois [27], est tout à fait adaptée pour une telle approche.

L'approche QSAR permet, en théorie, de prédire dans des séries données la nature des groupements "toxiques" porteurs de la toxicité.

Il est important de considérer qu'en plus du ou des toxico-phores (ou des protoxico-phores nécessitant une bioactivation enzymatique) des groupes fonctionnels ou parties de molécule présentes sur une molécule peuvent jouer un rôle essentiel dans la "biodisponibilité" de la molécule, en particulier pour la métabolisation détoxifiante (formation de métabolites hydro-solubles facilement éliminés hors de l'organisme).

A titre d'exemple, dans la bioactivation des hydrocarbures polyaromatiques (HPA) qui, comme le benzo(a)pyrène (BaP) sont d'importants polluants environnementaux, il est nécessaire de prendre en considération plusieurs facteurs pour prédire l'éventuelle génotoxicité.

Comme l'ont démontré D.M. Jerina et R.E. Lehr [28], la présence d'une région "baie" renfermant un carbone benzylique très électrophile est essentielle pour l'activité génotoxique, la voie de métabolisation aboutissant aux métabolites ultimes (diol-époxydes) intervenant à ce niveau [23]. Néanmoins, si l'on veut distinguer les activités mutagène et cancérogène de tels composés il faut aussi prendre en considération deux autres régions : les régions K et L qui furent définies par A. et B. Pullmann [29]. La région K est, semble-t-il, plus une région d'activation qui serait importante en mutagenèse bactérienne, tandis que la région L serait plutôt impliquée dans les processus de détoxification des composés qui comportent un tel arrangement nucléaire.



CONCLUSION

Une approche prévisionnelle associant des informations sur les propriétés physico-chimiques des composés eux-mêmes, sur leur interaction avec les cibles biologiques ou les écosystèmes peut, dans des cas précis, permettre de proposer des produits de remplacement capables d'être substitués à des composés présentant des risques pour les éventuels utilisateurs.

En règle générale, pour les produits de remplacement, il est nécessaire de prendre en compte non seulement les différents types de toxicité (irritation, organotoxicité, immunotoxicité, génotoxicité...), mais aussi les critères physico-chimiques (volatilité, inflammabilité, instabilité...) et ne pas substituer un risque à un autre.

Pour l'avenir, l'utilisation de l'informatique ne peut qu'aider à une meilleure approche dans la prévision du risque toxique. Ainsi, l'utilisation de systèmes experts s'appuyant sur l'intelligence artificielle devrait permettre dans l'avenir de mieux appréhender les éventuelles relations structure-activité toxique [29].

Néanmoins, quelle que soit l'approche, il ne faut pas s'attendre à trouver dans tous les cas des solutions miracles qui permettraient d'éliminer du milieu professionnel tous les produits dangereux, tant pour l'homme lui-même que pour son environnement.

REFERENCES

- [1] Picot A., Gagnault J.C. et Glomot R. *L'Actualité Chimique*, janvier 1984, 22-28 ; 1984, 23-33.
- [2] Ariens E.J., Simonis A.M. et Ofermeier J. *Introduction to general toxicology*. Academic Press, New-York, 1976.
- [3] Picot A. *Aspect biochimique de la toxicité de diverses substances chimiques (solvants, produits mutagènes, cancérogènes...)* CNRS (Gif-sur-Yvette), 1979.
- [4] Ashby J., Paton D., Lefevre P.A., Styles J.A., et Rose F.L. *Carcinogenesis*, 1982, 3, (11), 1277-1282.
- [5] De Serres F.J. et Ashby J. *Evaluation of short-term test for carcinogens*, Elsevier, 1981.
- [6] Couri D. et Milk S.M., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1982, 22, 145-166.
- [7a] Weber P. et De Caprio A.P. *Toxicologist*, 1981, 1, 134.
- [7b] De Caprio A.P. *Chem. Biol. Interact.*, 1985, 54, 257-270.
- [7c] De Caprio A.P. *Hexane neuropathy : studies experimental animals and man*, in De Matteis F. et Loc E.A. *Selectivity and molecular mechanisms of toxicity*, Mac Millan Press (Londres), 1987.
- [8] Anthony D.C., Boekerheide K., Anderson C.W. et Graham D.G. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1983, 71, 372-382.
- [9] Sayre L.M., Shearon C.M., Wrong-Mongkolrit T.R., Medori R. et Gambetti P. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986, 84, 36-44.
- [10] Mehlan M.A., Hemstreet G.P., Thrope J.J. et Weaver N.K. *Advances in Modern Environmental Toxicology. Vol. VII. Renal effects of petroleum hydrocarbons* Princeton Scientific Pu. 1984.
- [11a] Lock E., Charbonneau M., Strasser J., Swenberg J. et Bus J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987, 91, 182-192.
- [11b] Loury D.J., Smith-Oliver T. et Butterworth B.E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987, 88, 44-56.
- [11c] Borghoff S.J., Strasser J., Charbonneau M. et Swenberg J.A. *Toxicologist*, 1988, 8, 135.
- [11d] Swenberg J.A., Snort B., Borghoff S.J., Strasser J. et Charbonneau M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1989, 97, 35-46.
- [11e] Stone L.C., Kanerva R.L., Burns J.L. et Alden C.L. *Food Chem. Toxicol.*, 1987, 25, 43-52.
- [11f] Bomhard E., Marsmann M., Rühl-Fehlert Ch. et Zywieta A. *Arch. Toxicol.*, 1990, 64, 530-538.
- [11g] Borghoff S.J., Miller A.B., Bowen J.P. et Swenberg J.A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991, 107, 228-238.
- [12] Pitha J.V., Hemstreet G., Asal N., Petrone B., Trump B. et Silvas F. *Toxicol. Ind. Health*, 1987, 3, (4) 491-506.
- [13] Picot A. in *Les Risques du Travail : pour ne pas perdre sa vie à la gagner*, Ouvrage collectif sous la direction de Cassou B. (et al), La Découverte (Paris), 1985, 359-362.
- [14] Searle C.E. *Chemical Carcinogens*, 1984, Vol. II, p. 303-323, ACS Monograph n° 182, 2nd Edn.
- [15] Joseph PD. (1985) *Environ. Health Perspect.*, 1985, 64, 171-178.
- [16] Holland V.R., Saunders B.C., Rose F.L. et Walpole A.L. *Tetrahedron*, 1974, 30, 3299-3302.
- [17] Joseph PD. et Williams L. *Mutagenesis*, 1987, 2, (3) 225-228.
- [18] Martin C.N., Beland F.A., Roth R.W. et Kadlubar F.F. *Cancer Res.*, 1982, 42, 2678-2686.
- [19] Zeiger E. *Cancer Res.*, 1987, 47, 1287-1296.
- [20] Weisburger E.K., Russfield A.B., Homburger F., Weisburger J.H., Boger E., Van Dongen C.G. et Chu K.C. *J. Environ. Pathol. and Toxicol.*, 1978, 2, 325-356.
- [21] Picot A. *Bulletin d'Information Toxicologique*, mai 1988, 5, CNRS (Gif-sur-Yvette)
- [22] Picot A. *Bulletin d'Information Toxicologique*, mai 1988, 3, CNRS (Gif-sur-Yvette)
- [23] Picot A. *Bulletin d'Information Toxicologique*, mai 1988, 4, CNRS (Gif-sur-Yvette)
- [24a] Golberg L. *Structure-activity correlation as a predictive tool in toxicology*, Hemisphere Publ. Corp. (Washington), 1983.
- [24b] Tichy M. *QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry*, Pharmacology Library (Nauta W.Th. et Rekker R.F. ed.), 1985, 8, Elsevier, Amsterdam.
- [24c] Structure-activity relationships in toxicology and ecotoxicology : an assessment Ecotox. monograph n°8, 1986, European Chemical Industry, Bruxelles.
- [25] Hansch C. et Leo A.J. *Substituent constants for correlation analysis in Chemistry and Biology* Wiley J. ed. New-York, 1979.
- [26] Kaufman J.J. (1981) *Int. J. Quantum Chem. QBS*, 1981, 8, 419-439.
- [27] Dubois J.E. *DARC System in chemistry* (Wipke W.T., Heller S., Feldmann R. et Hyde E. ed.), John Wiley New-York, 1973.
- [28] Lehr R.E. et Jerina D.M. *Arch. Toxicol.*, 1977, 39, 1.
- [29] Pullman A. et Pullmann B. *Adv. Cancer Res.*, 1955, 3, 117-169.
- [30a] Rosenkranz H.S., Mitchell C. et Klopman G. *Mutation Res.*, 1985, 150, 1-11.
- [30b] Rosenkranz H.S., Krierson M.R. et Klopman G. (1986) *IARC*, 1986, 83, Lyon.
- [30d] Krierson M.R., Klopman G. et Rosenkranz H.S. *Environ. Mutagen.*, 1985, 8, 283.