



alvéoles pulmonaires avec libération de méthylamine très agressive. Cette irritation pulmonaire s'observe à des concentrations extrêmement faibles, inférieures à 1 ppm, raison pour laquelle la valeur limite d'exposition dans l'air des ambiances de travail fixée par l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) pour l'isocyanate de méthyle, est inférieure à 0,02 ppm, soit 0,05 mg par m<sup>3</sup> d'air [9].

Pour les victimes du nuage toxique de Bhopal, les yeux et les poumons furent les cibles privilégiés, car ce sont les premières zones en contact avec le mélange gazeux. Une hydrolyse rapide de l'isocyanate de méthyle en présence de l'eau tissulaire pourrait rendre compte des troubles observés.

## La toxicité à long terme de l'isocyanate de méthyle : un étrange paradoxe

Fait étonnant, parmi toutes les personnes atteintes par le nuage toxique mais non décédées, environ 20 000 ont ultérieurement développé des troubles à long terme qui, en plus des poumons et des yeux, ont atteint d'autres systèmes ou organes.

Ainsi, une enquête épidémiologique en 1988, auprès de 1 109 survivants de la catastrophe a permis de mettre en évidence que la majorité des personnes intoxiquées souffraient de troubles persistants. Ces atteintes plus ou moins importantes touchaient non seulement l'appareil respiratoire et les yeux, les cibles initiales, mais aussi les systèmes cardiovasculaire, gastro-intestinal, musculosquelettique, reproducteur et immunitaire [10].

Comment expliquer ces effets à retardement alors que, comme on l'a vu précédemment, la demi-vie de l'isocyanate de méthyle en milieu biologique n'excède pas 2 minutes ?

Il y a là un paradoxe difficile à comprendre.

Grâce à de l'isocyanate de méthyle radiomarké, il a été mis en évidence qu'il pouvait se retrouver à des concentrations actives au niveau de différents organes, alors que sa forme libre n'était pas détectée. D'où l'hypothèse que l'isocyanate de méthyle pourrait être pris en charge, dès son entrée dans l'organisme, par un transporteur présentant dans sa structure une fonction nucléophile plus réactive que l'eau environnante. C'est en effet le cas de la fonction thiol (R-S-H), que l'on retrouve dans la structure d'un tripeptide très important, le glutathion (G-S-H).

Ainsi l'isocyanate de méthyle réagit rapidement et de façon réversible avec le glutathion, qui existe en abondance dans le film liquidien endo-alvéolaire [11]. Cette réaction est «spontanée» et ne nécessite pas de catalyse enzymatique du type S-glutathion-transférase.

Pour expliquer cette préférence vis-à-vis des fonctions thiols, il est nécessaire de faire appel au concept dur-mou décrit par Pearson [12]. La délocalisation des électrons de l'isocyanate de méthyle (H<sub>3</sub>C-N=C=O) fait de cette molécule un électrophile mou. De ce fait, l'isocyanate de méthyle va préférentiellement réagir avec un nucléophile mou comme, par exemple, la fonction thiol (-S-H) du glutathion, de la cystéine, mais aussi d'autres peptides et de protéines à fonction thiol accessible.

Ceci explique aussi pourquoi la substitution nucléophile par une fonction thiol, par exemple du glutathion, sera privilégiée par rapport à l'hydrolyse en présence de l'eau du milieu biologique.

Ainsi, au niveau pulmonaire, l'isocyanate de méthyle va rapidement rencontrer du glutathion présent en quantité appréciable dans le liquide alvéolaire, et va former le S-(N-méthylcarbamoyl) glutathion (SMG).

D'un point de vue général, l'isocyanate de méthyle peut réagir selon un mécanisme réversible avec une fonction thiol en formant un S-thioester N-méthylcarbamique ou thiocarbamate (schéma 2).

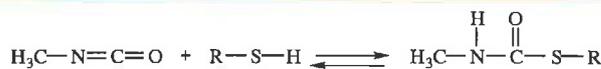


Schéma 2 - Réaction entre l'isocyanate de méthyle et un thiol.

Comme le résume le schéma 3, l'attaque de l'isocyanate de méthyle par la fonction thiol libre du glutathion forme le S-(N-méthylcarbamoyl) glutathion (SMG) qui pourrait ainsi servir au transport dans l'organisme de cet isocyanate réactif. Cette réaction étant réversible, l'isocyanate de méthyle peut être facilement libéré au niveau de cibles appropriées, par exemple des protéines cellulaires ou circulantes présentant une fonction thiol accessible. Le temps de demi-vie du SMG en milieu biologique est d'environ 1 heure, soit beaucoup plus que celui de l'isocyanate de méthyle [20].

Dans ces réactions, le SMG se comporte comme un agent de trans-carbamoylation pour les peptides ou les protéines à groupement cystéinyl-SH libre, modifiant ainsi leur structure et, de ce fait, leurs propriétés biologiques [13].

Ceci a des implications importantes dans la compréhension du mécanisme d'action toxique des isocyanates ou des isothiocyanates (R-N=C=S), ces derniers se retrouvant fréquemment dans des produits naturels.

En expérimentation animale, l'injection chez le Rat d'isocyanate de méthyle conduit à l'excrétion dans la bile du S-(N-méthylcarbamoyl) glutathion (SMG) [14] et à l'élimination urinaire de 25 % de la dose d'isocyanate de départ sous forme d'acide mercapturique correspondant : la N-acétyl-S-(N-méthylcarbamoyl) cystéine (AMCC) [15] comme l'indique le schéma 3.

Sur ce schéma, il apparaît bien que l'isocyanate de méthyle doit être considéré comme un toxique direct, c'est-à-dire qu'il peut, grâce à sa propre réactivité, interférer avec les molécules biologiques possédant une fonction nucléophile, et ceci sans l'aide d'enzymes.

Les cibles privilégiées semblent être les protéines à fonction thiol libre, dont en général la carbamoylation va entraîner l'inhibition de leur fonction biologique [16]. A titre d'exemple, *in vitro* l'isocyanate de méthyle va réagir sur l'actine G, une des protéines importantes des microfilaments, bloquant ultérieurement sa polymérisation en actine F ce qui en final désorganise le cytosquelette cellulaire.

Une seconde voie permet d'aboutir au même résultat, mais par un cheminement un peu plus compliqué, mettant en jeu une forme de transport originale, le glutathion. Ce dernier réagit très aisément avec l'isocyanate de méthyle et forme le SMG (schéma 3) qui peut alors traverser facilement les membranes lipophiles et être véhiculé dans le sang. Comme l'action du glutathion sur l'isocyanate de méthyle est réversible, le SMG

libérera au niveau cellulaire l'isocyanate de méthyle qui pourra ainsi intervenir directement sur sa cible. Pour son élimination hors de l'organisme, le SMG va faire intervenir les voies classiques de formation des acides mercapturiques. Il y a d'abord élimination d'une glycine puis d'un acide glutamique et ceci en présence de peptidases spécifiques. La S-(N-méthylcarbamoyl) cystéine (SMC) formée est, en final, acétylée en N-acétyl-S-(N-méthylcarbamoyl) cystéine (AMCC) que l'on va retrouver dans les urines comme métabolite urinaire principal de l'isocyanate de méthyle.

Pour une part, la SMC peut perdre sa cystéine et redonner au contact des tissus l'isocyanate de méthyle. Il est intéressant de remarquer que, par transcarbamoylation, le SMG en présence de cystéine peut facilement donner directement la SMC.

Il apparaît ainsi que le SMG et la SMC doivent être considérés comme des formes de transport de l'isocyanate de méthyle libérant celui-ci au niveau des cibles appropriées, par contact avec la membrane plasmique.

Les études ne sont pas actuellement assez avancées pour bien expliquer les effets myélotoxiques, génotoxiques et immunotoxiques de l'isocyanate de méthyle. Néanmoins, il semble que, dans de nombreux cas, le SMG et secondairement la SMC soient des éléments cytotoxiques capables de libérer *in situ* l'isocyanate de méthyle.

A part les atteintes pulmonaires et oculaires qui furent constantes parmi les victimes de l'accident de Bhopal, il apparaît que l'isocyanate de méthyle est aussi un toxique puissant pour la reproduction surtout chez la femme [5]. Beaucoup de femmes intoxiquées ont souffert de troubles gynécologiques (leucorrhées, inflammation pelvienne, suppression de la lactation...). Par ailleurs, les gestations menées à leur terme après l'accident de Bhopal n'ont jamais excédé 15 %.

Il semblerait que l'action fœtotoxique de l'isocyanate de méthyle soit due au SMG qui empêcherait le développement embryonnaire en inhibant la capture des nutriments par le sac vitellin. Cette inhibition pourrait être due à la carbamoylation des protéines tissulaires par l'isocyanate de méthyle libéré à partir du SMG [17].

Comme cela a été décrit précédemment [16], l'isocyanate de méthyle, de par son électrophilie, peut réagir facilement avec les fonctions thiols présentes sur certaines protéines, sur des peptides comme le glutathion, mais aussi sur la cystéine. Ceci constitue des formes particulières de transport qui permettent de libérer l'isocyanate de méthyle au niveau d'organes cibles aussi variés que les poumons, le foie, mais aussi au niveau de l'embryon ou ultérieurement du fœtus (schéma 3).

Par contre, l'affinité de l'isocyanate de méthyle est plus faible pour l'eau, et son hydrolyse en méthylamine et dioxyde de carbone n'est pas instantanée (schéma 1).

Avec l'ADN, le site d'alkylation par l'isocyanate de méthyle est, pour l'essentiel, les amines primaires hétérocycliques (qui sont des donneurs durs dans le concept dur-mou de Pearson), préférentiellement celle de la cytosine mais aussi secondairement celles de l'adénine et de la guanine [18] (figure 1).

Il se forme une méthylurée substituée, le reste méthylcarbamoyl occupant un volume de van der Waals identique à un groupement butyle, ce qui entraîne une distorsion locale dans l'ADN facilement reconnue par le système de réparation, type excision.

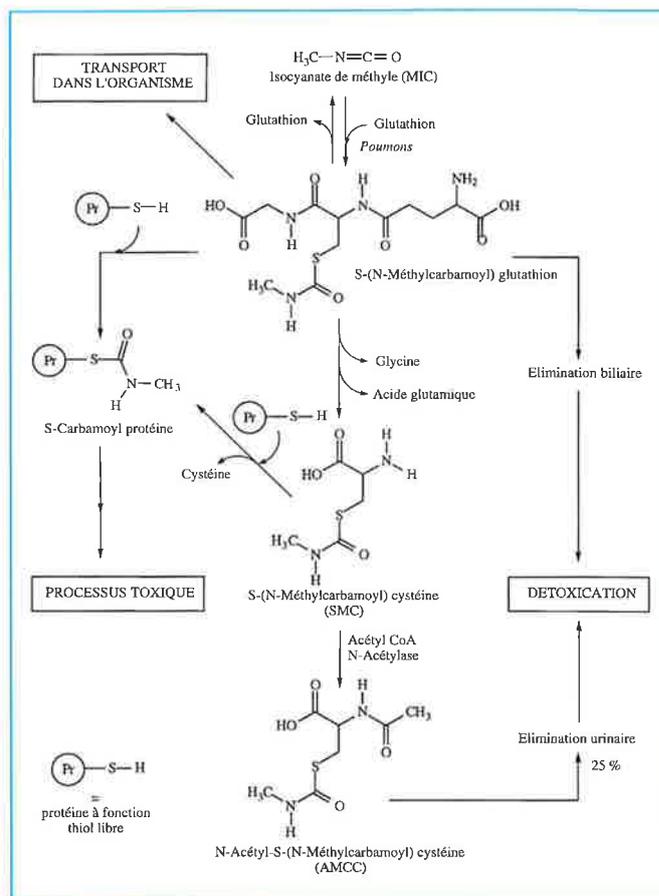


Schéma 3 - Réaction de l'isocyanate de méthyle avec le glutathion et les protéines à fonction thiol disponible.

Dans certains tests à court terme, l'isocyanate de méthyle est un faible mutagène, et est par ailleurs un agent clastogène entraînant des modifications de la structure des chromosomes, vraisemblablement par atteinte des protéines nucléaires (réparases ?). Ceci signifie peut-être que l'isocyanate de méthyle n'est pas un génotoxique vrai, mais serait plutôt un promoteur de cancérogénèse faible [19], mais ceci reste à vérifier.

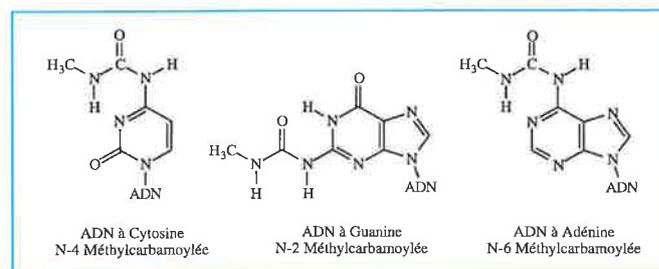


Figure 1 - Principaux adduits entre les bases nucléiques et l'isocyanate de méthyle.

## Quelles leçons tirer de la catastrophe de Bhopal ?

Bhopal, qui fit connaître au monde entier l'isocyanate de méthyle, aura permis aux toxicologues de progresser plus rapidement dans la compréhension des propriétés de ce toxique étonnant... mais à quel prix !

Classiquement, cet isocyanate très réactif aurait dû intervenir sur les organismes vivants riches en eau en s'hydrolysant



- Lancet*, September 2, 1989, p. 567-568.
- [5] Bucher J.R., Methylisocyanate : a review of health effects research since Bhopal, *Fund. Appl. Toxicol.*, 1987, 9, p. 367-379.
- [6] Nemery B., Sparrow S., Dinsdale D., Methyl isocyanate : thiosulphate does not protect, *Lancet ii*, 1985, p. 1245-1246.
- [7] Methyl isocyanate, Brochure F414431, Union Carbide Corporation, New York, 1976.
- [8] Brown W.E., Green A.H., Cedel T.E., Cairns J., The biochemistry of protein-isocyanate interactions. A comparison of the effects of aryl and alkyl isocyanates. *Environ. Health Perspect*, 1987, 72, p. 5-11.
- [9] Picot A., Bhopal : les retombées d'une tragédie, *La Recherche*, mars 1986, 17, 175, p. 412-417.
- [10] Gupta B.N., Rastogi S.K., Chadra H., Mathur A.K., Mathur N., Mahendra P.N., Pangtey B.S., Kumar S., Kumar P., Seth R.K., Dwivedi R.S., Ray P.K., Effect of exposure to toxic gas on the population of Bhopal. Part I. Epidemiological clinical, radiological and behavioral studies. *Ind. J. Exp. Biol.*, 1988, 26, p. 149-160.
- [11] Cautin A.M., North S.L., Hubbard R.C., Crystal R.G., Normal alveolar epithelial lining fluid contains high level of glutathione, *J. Appl. Physiol.*, 1987, 63, p. 152-157.
- [12] Pearson R.G., Songstad J., Organic and biological chemistry. Application of the principle of hard and soft acids and bases to organic chemistry, *JACS*, 1967, 89, p. 1827-1836.
- [13] Pearson P.G., Slatter J.G., Rashed M.S., Deog-Hwa Han, Baillie T., Carbamoylation of peptides and proteins in vitro by S-(N-methylcarbamoyl)glutathione and S-(N-methylcarbamoyl)cysteine. Two electrophilic S-linked conjugates of methylisocyanate, *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, 4, p. 436-444.
- [14] Pearson P.G., Slatter J.G., Han M.R., Grillo M.P., Baillie T.A., S-(N-methylcarbamoyl)glutathione : a reactive S-linked metabolite of methylisocyanate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 166, p. 245-250.
- [15] Slatter J.G., Rashed M.S., Pearson P.G., Deog-Hwa Han, Baillie T.A., Biotransformation of methylisocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate-mediated toxicities, *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, 4, p. 157-161.
- [16] Baillie T.A., Slatter J.G., Glutathione : A vehicle for the transport of chemically reactive metabolites *in vitro*, *Acc. Chem. Res.*, 1991, 24, p. 264-270.
- [17] Guest I., Varma R.R., Inhibition of mouse embryonic, yolk sac, and limb-bud function by the methylisocyanate metabolite S-(N-methylcarbamoyl)glutathione, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1994, 72, p. 50-56.
- [18] Salomon J.J., DNA adducts of lactones, sultones, acylating agents and acrylic compounds, *DNA adducts : identification and biological significance* (Hemminki K., Dipple A., Shuker D.E.G., Kadlubar F.F., Segerbäck D. et Bartsch H. Ed.), *IARC Scientific Publication n°125*, IARC, Lyon, 1994.
- [19] Varma D.R., Guest I., The Bhopal accident and methylisocyanate toxicity, *Jour. Toxicol. Environ. Health*, 1993, 40, p. 513-529.
- [20] Baillie A.T., Kassahun K., Reversibility in glutathione-conjugate formation, p 163-181, *Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds* (Anders M.W., Dekant W.), Academic Press, San Diego, 1994.
- [21] Philip B., Inde : les vies brisées de Bhopal, *Le Monde*, 4-5 décembre 1994, p. 6.
- [22] BIST, Après Bhopal, Visakhapatnam ? *Lettre mensuelle du CEDUST*, Ambassade de France en Inde, New Delhi, mai 1995, p. 62.

## Stages de formation continue du CNAM

### Toxicologie fondamentale et appliquée

**Lieu :** Paris

**Thèmes :**

- 20-24 novembre 1995 : Réactualisation des connaissances de base en chimie, biologie cellulaire et moléculaire.
- 15-19 janvier 1996 et 19-23 février 1996 : Toxicologie fondamentale.
- 18-22 mars 1996 et 15-19 avril 1996 : Toxicologie nutritionnelle.
- 25-29 mars 1996 : Toxicologie industrielle.

**Responsables (scientifiques et pédagogiques) :** A. Picot, X. Cuny, R. Albrecht, M. Rabache.

Renseignements : CNAM-FC, 292, rue Saint-Martin, 75141 Paris Cedex 03. Tél. : (1) 40.27.23.76. Fax : (1) 40.27.20.07.