



HAL
open science

Quantification de biomarqueurs d'exposition à des agents vésicants dans des matrices biologiques facilement accessibles

Marie Roser

► **To cite this version:**

Marie Roser. Quantification de biomarqueurs d'exposition à des agents vésicants dans des matrices biologiques facilement accessibles. Chimie analytique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV044 . tel-03628462

HAL Id: tel-03628462

<https://theses.hal.science/tel-03628462v1>

Submitted on 2 Apr 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Marie ROSER

Thèse dirigée par **Thierry DOUKI**

préparée au sein du **Laboratoire Systèmes Moléculaires et Nano Matériaux pour l'Energie et la Santé**
dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Quantification de biomarqueurs d'exposition à des agents vésicants dans des matrices biologiques facilement accessibles.

Quantification of biomarkers of exposure to vesicant agents in easy to collect biological matrices.

Thèse soutenue publiquement le **04 octobre 2021**,
devant le jury composé de :

Dr Thierry ORSIERE

Ingénieur de recherche à IMBE, Marseille, Rapporteur

Pr François SICHEL

Professeur à l'Université de Caen-Normandie, Rapporteur

Dr Sophie AYCIRIEX

Maître de conférences à l'Université Lyon 1, Examinatrice

Pr Valérie PICHON

Professeur à Sorbonne Université, Examinatrice

Dr Christine DEMEILLIERS

Maître de conférences à l'Université Grenoble-Alpes, Examinatrice

Pr Éric PEYRIN

Professeur à l'Université Grenoble-Alpes, Examineur, Président

Dr Margaux SECHET

Pharmacienne, Tutrice DGA, Membre invité

Dr Christophe PIERARD

Pharmacien en chef à l'IRBA, Membre invité

Dr Thierry DOUKI

Chercheur CEA-Grenoble, Directeur de thèse



Je remercie sincèrement les organismes qui ont financé et accueilli ces travaux de thèse :

Le CEA et l'Agence Innovation Défense (DGA)



**AGENCE
INNOVATION
DÉFENSE**

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier Thierry Douki de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse. Je lui serai toujours reconnaissant de m'avoir fait confiance, de m'avoir appris tant de choses. Lors de mon entretien pour la thèse, Thierry me posa la question « Pourquoi aimerais-tu être chercheur ? » Sans attendre ma réponse, il dit « Je ne sais pas pourquoi je te pose cette question car, c'est évident, c'est le plus beau métier du monde ». Merci d'avoir partagé cette passion pour la recherche pendant trois ans.

Je remercie tout particulièrement le Dr Thierry Orsière et le Dr François Sichel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Mes remerciements vont également au Pr Valérie Pichon, au Pr Eric Peyrin, au Dr Christine Demeilliers, au Dr Sophie Ayciriex, au Dr Margaux Sechet et au Dr Christophe Pierard pour leur participation à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr Arnaud Salvador et le Dr Christophe Pierard pour les conseils et leurs encouragements en participant au comité de suivi de ma thèse.

Cette thèse a été pour moi l'occasion de travailler avec de nombreuses personnes qui ont grandement participé à l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit. Je commence par remercier les équipes aussi impliquées dans le projet NRBC du CEA : l'Unité Vésicants, spécialement le Dr Christophe Pierard, le Dr Fanny Caffin et le Dr Fanny Gros-Désormeaux et le Laboratoire d'Etudes du Métabolisme des Médicaments spécialement le Dr Daniel Léonço, le Dr Christophe Junot, le Dr François Fenaille. Ensuite, je tiens à remercier Dorothee Jary du Laboratoire Chimie et Capteurs pour la Biologie de m'avoir fait participer au projet NALDERC. Je ne peux oublier David Béal et Leslie Gudimard qui ont été des professeurs hors pair pour mon apprentissage de la culture cellulaire. Je remercie également les deux stagiaires de que j'ai co-encadrées, Camille et Laura, pour leur dévouement dans ce projet.

Je remercie également l'Agence de l'Innovation de Défense de la Direction Générale de l'Armement pour le co-financement de cette thèse. En particulier, merci au Dr Guillot-Combe et à Dr Margaux Sechet pour le suivi des travaux.

J'ai eu le privilège pendant ces trois années de thèse de jouir d'une ambiance de travail plus qu'agréable au sein de l'équipe CIBEST. Ce fut un réel plaisir de travailler dans cet environnement chaleureux.

Je remercie chaleureusement mes parents qui m'ont transmis la persévérance dans le travail, la rigueur sans oublier tant de belles valeurs humaines et la foi. Je crois que le choix de la chimie est finalement un peu une histoire de famille. Avec un grand-père ayant travaillé dans une usine de Solvay en Moselle et un père doué en science responsable du rangement des produits chimiques à l'école, il y a sûrement une explication à mon attrait pour cette discipline.

Je souhaite remercier du fond du cœur mes frères Raphaël et Pierre, ma sœur Marie-Laure sans oublier mes belles-sœurs Mylène et Noëlle et mon beau-frère Jean-Baptiste. Ils m'ont vu grandir, me passionner pour le sport, m'accompagner dans tous mes choix, toutes mes tentatives. Je n'oublierai jamais votre soutien à toutes épreuves.

Pour finir, je remercie de tout mon cœur Godefroy, un mari extraordinaire qui a osé relever le défi : se marier avec une doctorante en dernière année de thèse pendant un hiver perturbé par le Covid. Nous nous souviendrons longtemps de cette année riche en émotions. Je te remercie pour ton soutien, tes encouragements et ta patience durant toute cette thèse, tu as une part importante dans la réussite de ce projet.

Les âmes ne sont pas vaincues par les armes, mais par l'amour et la générosité.

Spinoza, **Ethique**

A la mémoire de mon père,

Sommaire

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE	10
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTES DES TABLEAUX, FIGURES ET EQUATIONS	19
INTRODUCTION	27
ETAT DE L'ART	33
1. LES TOXIQUES DE GUERRES	35
1.1. <i>Petite histoire des armes chimiques</i>	35
1.2. <i>Traités d'interdiction</i>	36
1.3. <i>Définitions d'après la CIAC</i>	37
1.4. <i>Les différentes familles de toxiques de guerre</i>	37
2. L'YPERITE ET LE CEES	41
2.1. <i>Synthèse</i>	41
2.2. <i>Utilisations</i>	44
2.3. <i>Toxicologie</i>	47
2.4. <i>Le CEES : un analogue de l'ypérite</i>	65
3. LES BIOMARQUEURS A L'YPERITE	67
3.1. <i>Notion de biomarqueur en toxicologie</i>	67
3.2. <i>Spécificité des biomarqueurs à des agents chimiques</i>	67
3.3. <i>Spécificité des biomarqueurs en sécurité NRBC</i>	68
3.4. <i>Les biomarqueurs d'exposition à l'ypérite</i>	70
3.5. <i>Glutathion et détoxification des xénobiotiques</i>	77
3.6. <i>Tableaux de synthèse des méthodes de détection des biomarqueurs</i>	82
4. LE PROCESSUS ANALYTIQUE POUR LES ADDUITS ET CONJUGUES A L'YPERITE DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES	88
4.1. <i>La préparation d'échantillon par Extraction sur Phase Solide (SPE)</i>	88
4.2. <i>La chromatographie liquide</i>	94
4.3. <i>Détection par spectrométrie de masse</i>	98
4.4. <i>Les méthodes par dilution isotopiques</i>	103
4.5. <i>Validation de méthode</i>	104
REALISATIONS	107
1. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DES BIOMARQUEURS DU CEES DANS LES MILIEUX DE CULTURE	109
1.1. <i>Choix des biomarqueurs</i>	109
1.2. <i>Préparation de solutions calibrées de standards</i>	111
1.3. <i>Amélioration de la justesse des analyses par dilution isotopique</i>	114
1.4. <i>Purification et concentration des biomarqueurs par SPE</i>	116
1.5. <i>Développement d'une méthode LC-MS/MS pour les biomarqueurs du CEES</i>	121
1.6. <i>Validation de la méthode analytique pour quantifier les biomarqueurs du CEES présents dans les milieux de culture</i>	125
1.7. <i>Bilan</i>	129
2. ETUDE DE LA FORMATION ET DE L'EXCRETION DES BIOMARQUEURS DU CEES DANS LES CELLULES HACAT.	131
1.1. <i>Optimisation des conditions de traitement des cellules</i>	131

1.2. Etude de la formation des dommages à l'ADN-----	133
1.3. Présence de l'adduit N7Gua-CEES dans le milieu de culture -----	135
1.4. Etude de la métabolisation du CEES via la voie des acides mercapturiques-----	136
1.5. Bilan-----	138
3. PERTINENCE DES BIOMARQUEURS DU CEES DANS DES EXPLANTS DE PEAU HUMAINE. -----	140
3.1. Optimisation des conditions de traitement des explants de peau-----	140
3.2. Formation de dommages à l'ADN dans la peau après exposition au CEES-----	142
3.3. Excrétion de l'adduit N7Gua-CEES par les cellules de la peau humaine-----	143
3.4. Présence des biomarqueurs issus de la voie de métabolisation de l'acide mercapturique dans les milieux de culture. -----	145
3.5. Etude de la cinétique des biomarqueurs -----	148
3.6. Une application de la méthode : le projet NALDERC-----	150
3.7. Bilan -----	154
4. ETUDE DE LA FORMATION ET DE LA PERSISTANCE DES BIOMARQUEURS DU CEES CHEZ LA SOURIS.-----	155
4.1. Amélioration de la robustesse des analyses : le cas du plasma. -----	155
4.2. Réduction du temps de préparation d'analyse grâce à le SPE en ligne-----	157
4.3. Persistance des biomarqueurs dans le plasma jusqu'à 14 jours. -----	162
4.4. Diffusion du CEES dans le cerveau-----	165
4.5. Bilan -----	167
5. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DES BIOMARQUEURS DE L'YPERITE. -----	170
5.1. Sélection des biomarqueurs.-----	170
5.2. Synthèse et calibration des standards. -----	171
5.3. Synthèse et calibration des étalons internes. -----	174
5.4. Préparation des échantillons adaptée aux biomarqueurs de l'ypérite. -----	176
5.5. Adaptation de la méthode UHPLC-MS/MS aux biomarqueurs de l'ypérite-----	177
5.6. Validation de la méthode SPE en-line – UHPLC - MS/MS dans le cas du plasma.-----	179
5.7. Bilan -----	187
6. VERS UN NOUVEL ANALOGUE DE L'YPERITE : LE CESE. -----	188
6.1. Propriétés physico-chimiques du CESE -----	188
6.2. Toxicité-----	189
6.3. Etude comparative de la cytotoxicité du CEES et du CESE-----	190
6.4. Formation des biomarqueurs de l'ypérite par traitement in vitro au CESE-----	193
6.5. Bilan -----	196
DISCUSSION GENERALE-----	199
1. DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE POUR LES BIOMARQUEURS DE L'YPERITE -----	201
1.1. La préparation des échantillons-----	201
1.2. Le couplage UHPLC-MS/MS-----	203
2. FORMATION IN VITRO DES CONJUGUES DE LA VOIE DE L'ACIDE MERCAPTURIQUE DANS LA PEAU -----	204
2.1. Le conjugué au glutathion-----	205
2.2. Le conjugué à la cystéine -----	207
2.3. L'acide mercapturique-----	207
3. FORMATION IN VIVO DES CONJUGUES DE LA VOIE DE L'ACIDE MERCAPTURIQUE CHEZ LA SOURIS -----	208
3.1. La présence des conjugués dans le plasma-----	208
3.2. La présence des conjugués dans le cerveau-----	210
4. L'ADDUIT DE LA N7-GUANINE DANS LES BIOFLUIDES-----	212
4.1. Formation de l'adduit -----	212
4.2. Excrétion de l'adduit -----	214

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	217
CONDITIONS EXPERIMENTALES	223
1. CULTURE CELLULAIRE	225
1.1. <i>HaCaT</i>	225
1.2. <i>Kératinocytes primaires humains mammaires</i>	227
1.3. <i>Extraction de l'ADN</i>	230
2. PEAU HUMAINE EXPOSEE AU CEES	231
2.1. <i>Produits et matériel</i>	231
2.2. <i>Préparation</i>	232
2.3. <i>Traitement</i>	232
2.4. <i>Broyage des tissus et extraction d'ADN</i>	232
3. SOURIS EXPOSES AU CEES	233
3.1. <i>Exposition vapeur</i>	233
3.2. <i>Broyage des tissus et extraction de l'ADN</i>	234
3.3. <i>Les métabolites dans les organes</i>	234
3.4. <i>Les fluides biologiques</i>	235
4. DIGESTION DE L'ADN	235
5. SYNTHÈSE DES STANDARDS	236
5.1. <i>Standards du CEES</i>	236
5.2. <i>Etalons Internes du CEES</i>	237
5.3. <i>Standards de l'ypérite</i>	237
5.4. <i>Etalons internes de l'ypérite</i>	238
6. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	238
6.1. <i>SPE</i>	238
6.2. <i>SPE en ligne</i>	239
7. ANALYSES UHPLC-MS/MS	240
7.1. <i>La séparation par chromatographie liquide des standards du CEES</i>	240
7.2. <i>La séparation par chromatographie liquide des standards de l'ypérite dans le plasma</i>	241
7.3. <i>La détection par spectrométrie de masse</i>	242
8. ANALYSES STATISTIQUES	244
LISTE DES COMMUNICATIONS	245
1. PUBLICATIONS	246
2. PRÉSENTATIONS ORALES	246
3. POSTERS	246
4. AUTRE	246
GLOSSAIRE DE TERMES MÉDICAUX	247
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	251
ANNEXES	269

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Acide Formique
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BER	Réparation par excision de base (Base Excision Repair)
CAS	Numéro d'enregistrement unique d'un composé chimique (Chemical Abstracts Service)
CE	Energie de collision (Collision Energy)
CEES	Sulfure de 2-chloroéthyl éthyle
CESE	Sulfure de 2-hydroxyéthyl 2-chloroéthyle
CIAC	Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques
CUR	Pression du gaz rideau (Curtain Gaz)
CV	Coefficient de Variation (exprimé en pourcentage)
CXP	Potentiel de sortie de la cellule de collision (Cell Exit Potential)
Cys	Cystéine
Cys*	Cystéine marquée par 3 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
Cys-CEES	Ethylthioéthyl-cystéine
Cys*-CEES	Ethylthioéthyl-cystéine marqué par 3 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
Cys-Yp	Hydroxyéthylthioéthyl-cystéine
Cys*-Yp	Hydroxyéthylthioéthyl-cystéine marqué par 3 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
Da	Dalton
dGTP	2'-Désoxyguanosine triphosphate
dGuo*	2'-Désoxyguanosine marquée par 5 ¹⁵ N
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DP	(Declustering Potential)
EC	Ecart type
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EI	Etalon Interne
EP	Potentiel d'entrée dans l'analyseur (Entrance Potential)
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESI	Ionisation ElectroSpray (ElectroSpray Ionization)
ETE-N3Ade	N3-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-adenine
ETE-N7Gua	N7-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (N7Gua-Yp)
ETE-O6Gua	O6-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine
FA	Formiate d'ammonium
FDA	Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (Food and Drug Administration)
FIA	Analyse par injection en flux continu (Flow Injection Analysis)
GGT	γ -glutamyltransférase
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GS1	Pression du gaz séchant au niveau de la source d'ionisation ESI
GS2	Pression du gaz auxiliaire au niveau de la source d'ionisation ESI
GSH	Glutathion
GSH*	Glutathion marqué par 2 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
GSH-CEES	Ethylthioéthyl-glutathion
GSH*-CEES	Ethylthioéthyl-glutathion marqué par 2 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
GSSG	Disulfure de glutathion (glutathion oxydé)

GST	Glutathion S-transférase
Gua	Guanine
HaCaT	Lignée cellulaire de kératinocytes immortels
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)
IS	IonSpray Voltage
LC-MS	Couplage Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LD50	Dose létale médiane
LOD	Limite de détection (Limit of detection)
LOQ	Limite de quantification (Limit of quantification)
m/z	Rapport de la masse d'un ion (en unités atomiques) à son nombre de charges
MeOH	Méthanol
MRM	(Multiple Reaction Monitoring)
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem, combinant deux (Mass Spectrometry-Mass Spectrometry)
MSMTESE	1-méthylsulphiny1-2-[2-(méthylthio éthylsulphonyl)] éthane
MTT	Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
N7Gua-CEES	N7-[2-[(2-éthyl)thio]éthyl]-guanine (HETE-N7Gua)
N7Gua*-CEES	N7-[2-[(2-éthyl)thio]éthyl]-guanine marqué par 5 ¹⁵ N
N7Gua-Yp	N7-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (ETE-N7Gua)
N7Gua*-Yp	N7-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine marqué par 5 ¹⁵ N
N7Gua-ETE-N7Gua	Sulfure de bis[2-(guanin-7-yl)éthyl]
NAC	N-AcétylCystéine
NAC*	N-acétylcystéine marquée par 3 ¹³ C et 1 ¹⁵ N

NAC-CEES	Ethylthioéthyl-N-acétylcystéine
NAC*-CEES	Ethylthioéthyl-N-acétylcystéine marqué 3 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
NAC-Yp	Hydroxyéthylthioéthyl-N-acétylcystéine
NAC*-Yp	Hydroxyéthylthioéthyl-N-acétylcystéine marqué 3 ¹³ C et 1 ¹⁵ N
NAD+	Nicotinamide adénine dinucléotide
NER	Réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair)
NRBC(E)	Nucléaire Radiologique Biologique Chimique (Explosif)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)
PFP	Pentafluorophényle
SBMSE	1,1'-sulphonylbis[2-méthylsulphiny]éthane]
SBMTE	1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane]
SBSNAE	1,1'-sulphonylbis[2-S(N-acétylcystéinyl)éthane]
SI	Standard Interne
SMO	Bis-β-chloroéthyle sulfoxyde
S_N2	Substitution Nucléophile bimoléculaire
SPE	Extraction sur phase solide (Solide Phase Extraction)
TDG	Thiodiglycol
TDGO	Thiodiglycol sulfoxyde
TEM	Température dans la source d'ionisation
UHPLC	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance
UV	Ultraviolet

Listes des tableaux, figures et équations

Liste des figures

<i>Figure 1 : Obus allemand de 150 mm conçu pour les agents chimiques pendant la première guerre mondiale.</i> -----	45
<i>Figure 2 : Un soldat et son cheval pendant la première guerre mondiale, tous deux portant les équipements de protection contre l'ypérite.</i> -----	45
<i>Figure 3 : Représentation des principales couches composant la peau.</i> -----	48
<i>Figure 4 : Représentation des ions formés par l'ypérite en milieu physiologique.</i> -----	49
<i>Figure 5 : Mécanisme réactionnel de l'ypérite avec deux nucléophiles (Nu).</i> -----	49
<i>Figure 6 : Réaction de l'eau sur l'ypérite.</i> -----	50
<i>Figure 7 : Produits formés par l'oxydation du soufre de l'ypérite.</i> -----	50
<i>Figure 8 : Mécanismes d'action de l'ypérite proposés par Kehe et Szinicz [29].</i> -----	52
<i>Figure 9 : Représentation du glutathion, sous sa forme réduite, formé par l'association de 3 acides aminés (acide glutamique, cystéine, glycine).</i> -----	53
<i>Figure 10 : Sites des bases de l'ADN qui peuvent être alkylés par des agents chimiques (Figure tirée de [46]).</i> -----	55
<i>Figure 11 : Sites des bases de l'ARN qui peuvent être alkylés par des agents chimiques.</i> -----	56
<i>Figure 12 : Pourcentage des organes les plus touchés quelques jours après une exposition à l'ypérite déterminé par suivi de 233 intoxiqués iraniens lors de la guerre Iraq-Iran [74].</i> -----	58
<i>Figure 13 : Lésions au niveau de l'œil cinq jours après une exposition à l'ypérite (de [77]).</i> -----	60
<i>Figure 14 : Vésicules dans le dos d'une personne intoxiquée à l'ypérite, 18h après l'exposition (de [14]).</i> -----	61
<i>Figure 15 : Hyperpigmentation chez un vétérinaire iranien exposé à l'ypérite (photo de [70]).</i> -----	64
<i>Figure 16 : Représentation des ions formés par le CEES en milieu physiologique.</i> -----	65
<i>Figure 17 : Représentation schématique des différents types de biomarqueur suite à une exposition.</i>	68
<i>Figure 18 : Formules topologiques des produits majoritaires de l'ypérite après hydrolyse et oxydation du soufre.</i> -----	71
<i>Figure 19 : Le produit de dégradation TDG peut venir soit de l'ypérite soit de gaz moutarde à longues chaînes d'après [108].</i> -----	72
<i>Figure 20 : Formules topologiques des métabolites de l'ypérite induits par les β-lyases.</i> -----	72
<i>Figure 21 : Schéma réactionnel de l'ypérite sous forme de l'ion épisulfonium avec la position N7 de la guanine.</i> -----	73
<i>Figure 22 : Formules topologiques des principaux adduits de l'ADN formés par l'ypérite.</i> -----	74
<i>Figure 23 : Représentations de la dépurination de la N7dGuo-Yp dans l'ADN, avec libération de N7Gua-Yp et formation d'un site abasique.</i> -----	75

Figure 24 : Voie de métabolisation de l'acide mercapturique et de ses réactions secondaires avec les β -lyases.-----	80
Figure 25 : Représentation schématique des réactions intracellulaires et extracellulaires de la voie de métabolisation des acides mercapturiques tirée de [150]. -----	81
Figure 26 : Schématisation des différentes étapes de la SPE dans le cas d'une extraction « rétentives », figure issue de [171].-----	90
Figure 27 : Principe de le SPE en ligne -----	94
Figure 28 : Courbe de Van Deemter pour différentes granulométries de colonne. -----	97
Figure 29 Parties composant un spectromètre de masse et les différentes technologies utilisées -----	98
Figure 30 : Fonctionnement d'une source électrospray. -----	99
Figure 31 : Représentation schématique d'une source électrospray en mode positif.-----	100
Figure 32 Schéma du triple quadripôle du spectromètre de masse 6500+ QTrap de Sciex. -----	101
Figure 33 Principe de fonctionnement d'un analyseur triple quadripôle utilisé en monde MRM.---	102
Figure 34 : Formule topologique des biomarqueurs du CEES choisis. -----	110
Figure 35 : Formule topologique des étalons internes des biomarqueurs du CEES, l'astérisque désigne les isotopes stables ^{13}C et ^{15}N . -----	115
Figure 36 : Profil d'élution théorique en SPE qui montre la quantité de produit éluée en fonction du pourcentage de solvant organique.-----	116
Figure 37 : Rendement de la SPE en fonction des standards et en fonction de la cartouche.-----	117
Figure 38 : Rendement de la SPE en fonction des standards et en fonction de la présence d'acide formique (AF) dans le solvant d'élution contenant du MeOH.-----	118
Figure 39 : Processus de préparation de l'échantillon de sa collecte à sa mise dans les vials pour l'analyse en UHPLC-MS/MS. -----	119
Figure 40 : Rendement de la SPE avec une cartouche polymérique HR-X de 100mg en fonction de la quantité de standard déposé.-----	120
Figure 41 : Rendement de l'ensemble de la préparation d'échantillon. Les données représentées sont la moyenne \pm EC (n=5).-----	121
Figure 42 : Chromatogramme obtenu après injection en UHPLC-MS/MS de 0,5 pmol des biomarqueurs du CEES dans du milieu de culture. -----	122
Figure 43 : Spectres de fragmentations des molécules GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES.-----	124
Figure 44 : Analyse des étalons de la droite d'étalonnage du GSH-CEES.-----	126
Figure 45 : Recouvrement des standards dans du milieu de culture après conservation 1 mois ou 6 mois à -20°C . -----	129
Figure 46 : Taux de survie des cellules HaCaT après un test de cytotoxicité au MTT après traitement au CEES.-----	132
Figure 47 : Représentation schématique des différentes étapes des traitements des cellules HaCaT par du CEES.-----	133

Figure 48 : Variation du niveau du biomarqueur N7Gua-CEES dans l'ADN des cellules HaCaT traitées par du CEES.-----	134
Figure 49 : Concentration du biomarqueur N7Gua-CEES dans les milieux de culture des cellules HaCaT traitées par du CEES. -----	135
Figure 50 : Etude de la stabilité de l'adduit libre N7Gua-CEES dans le milieu de culture des cellules HaCaT pendant 24h à 37°C en présence des autres biomarqueurs. -----	136
Figure 51 : Quantification des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES dans les milieux de culture des cellules HaCaT traitées par du CEES. -----	137
Figure 52 : Etude de la stabilité des conjugués GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES dans le milieu de culture des cellules HaCaT pendant 24h à 37°C en présence des autres biomarqueurs. -----	138
Figure 53 : Photo des plaques multi-puits avec des inserts et du milieu de culture dans les puits. --	142
Figure 54 : Représentation schématique des différentes étapes des traitements des explants de peau humaine par du CEES. -----	142
Figure 55 : Evolution du nombre d'adduits N7Gua-CEES en fonction du temps d'incubation et de la dose de CEES après exposition d'explants de peau humaine par du CEES. -----	143
Figure 56 : Evolution du nombre d'adduit N7Gua-CEES dans les milieux de culture (courbe orange) et dans l'ADN (courbe bleue) des explants de peau humaine traités par 0,08 μ mol de CEES.-----	144
Figure 57 : Evolution de la concentration des biomarqueurs GSH-CEES, Cys-CEES et N7Gua-CEES dans les milieux de culture des explants de peau humaine traités par différentes doses de CEES (0,08 ; 0,16 et 0,4 μ mol). -----	147
Figure 58 : Evolution de la concentration des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES dans les milieux de culture des explants de peau humaine traités par 0,08 / 0,16 / 0,4 μ mol de CEES. -----	149
Figure 59 : Représentation schématique des différentes étapes du traitement 1 des explants de peau humaine par du CEES dans le cas du projet NALDERC. -----	151
Figure 60 : Evolution du nombre d'adduits N7Gua-CEES en fonction des solutions de lavage après exposition d'explants de peau humaine par du CEES (8,6 μ mol). -----	151
Figure 61 : Représentation schématique des différentes étapes du traitement 2 des explants de peau humaine par du CEES dans le cas du projet NALDERC. -----	153
Figure 62 : Evolution du nombre biomarqueurs en fonction des solutions de lavage après exposition d'explants de peau humaine par du CEES (8,6 μ mol). -----	153
Figure 63 : Représentation schématique de l'expérimentation sur les souris sans poil et des jours de collecte des échantillons. -----	155
Figure 64 : Composition du sang humain typique en détaillant la composition du plasma. -----	157
Figure 65 : Processus de préparation de l'échantillon de sa collecte à sa mise dans les vials avant la SPE en ligne au sein de la chaîne HPLC. -----	157
Figure 66 : Représentation de la chimie de surface d'une colonne PFP. -----	158
Figure 67 : Comparaison entre la quantité de biomarqueurs dans le plasma de souris traitées au CEES purifié par la SPE "classique" et par la SPE en ligne.-----	160

Figure 68 : Relation entre les quantités de biomarqueurs détectés dans le plasma de souris après SPE manuelle et SPE en ligne (n=14).-----	161
Figure 69 : Chromatogrammes obtenus après injection en SPE-UHPLC-MS/MS de plasma de souris. -----	163
Figure 70 : Evolution de la concentration des biomarqueurs GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES dans le plasma de souris. -----	164
Figure 71 : Evolution du nombre d'adduit N7Gua-CEES dans l'ADN de cerveau de souris exposées au CEES.-----	166
Figure 72 : Evolution de la concentration (en nM) des 4 biomarqueurs du CEES détectés dans le cerveau de souris exposées au CEES.-----	168
Figure 73 : Formule topologique des biomarqueurs de l'ypérite sélectionnés, Cystéine-Ypérite, N-Acétylcystéine-Ypérite, N7Guanine-Ypérite. -----	171
Figure 74 : Formule topologique du sulfure de 2-chloroéthyl 2-hydroxyéthyl (CESE). -----	172
Figure 75 : Mécanismes réactionnels simplifiés entre soit l'ypérite soit le CESE soit le CEES et des nucléophiles en milieu aqueux.-----	173
Figure 76 : Formule topologique des étalons internes des biomarqueurs de l'ypérite. -----	176
Figure 77 : Les différentes étapes de la préparation des échantillons de plasma.-----	177
Figure 78 : Chromatogramme obtenu après injection en SPE-UHPLC-MS/MS de 0,5 pmol des biomarqueurs de l'ypérite dans du plasma humain. -----	178
Figure 79 : Spectres de fragmentations des molécules Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp.-----	180
Figure 80 : Analyse des étalons de la droite d'étalonnage du N7Gua-Yp.-----	181
Figure 81 : Validation statistique de la méthode. La justesse et la répétabilité de tous les points de la gamme d'étalonnage sont présentés.-----	182
Figure 82 : Profils d'exactitude des standards Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp. -----	185
Figure 83 : Recouvrement des standards dans du plasma après conservation 2 mois à -20°C ou après 7 cycles de congélation / décongélation. -----	186
Figure 84 : Deux hydrolyses successives de l'ypérite qui forment d'abord le CESE puis le TDG. --	189
Figure 85 : Taux de survie des kératinocytes primaires issus du donneur 1 et 2 après un test de cytotoxicité au MTT après traitement soit au CEES soit au CESE.-----	192
Figure 86 : Evolution de la concentration des biomarqueurs induits par le CESE (Cys-Yp et N7Gua-Yp) et par le CEES (Cys-CEES et N7Gua-CEES) dans les milieux de culture des kératinocytes traités par différentes doses de CESE et de CEES (0,1 ; 0,2 et 0,5 mM) lors du traitement 1. -----	195
Figure 87 : Evolution de la concentration des biomarqueurs induits par le CESE (Cys-Yp et N7Gua-Yp) et par le CEES (Cys-CEES et N7Gua-CEES) dans les milieux de culture des kératinocytes traités par différentes doses de CESE et de CEES (0,05 ; 0,1 ; 0,2 et 0,5 mM) lors du traitement 2. -----	196
Figure 88 : Schéma de l'exposition cutanée des souris SKH-1 en utilisant un bouchon de vial HPLC. -----	234
Figure 89 Protocole optimisé de l'extraction sur phase solide pour la colonne polymérique de 100mg. -----	239

Figure 90 : Représentation du spectromètre de masse utilisé pendant ces travaux, le QTRAP 6500+ de Sciex. -----242

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes familles des toxiques de guerres et de leurs principales caractéristiques.-	38
Tableau 2 : Liste des agents chimiques interdits par la CIAC parmi les moutardes au soufre. -----	40
Tableau 3 : Noms, formule chimique et structure de l'ypérite et du CEES (un analogue de l'ypérite utilisé en recherche).-----	42
Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques de l'ypérite et du CEES. -----	44
Tableau 5 : L'utilisation de l'ypérite lors de conflits depuis la première guerre mondiale. -----	47
Tableau 6 : Signes cliniques attendus suite à une exposition à l'ypérite d'après l'ANSM. Les temps indiquent les heures suivant l'intoxication. -----	59
Tableau 7 : Liste non exhaustive de méthodes analytiques déjà développées pour quantifier des marqueurs de l'ypérite présentant leurs principales caractéristiques.-----	87
Tableau 8 : Analyse des spectres RMN du proton de Cys-CEES, NAC-CEES et GSH-CEES. -----	113
Tableau 9 : Ions parents et ions fils lors de l'analyse en mode MRM des standards des biomarqueurs CEES.-----	123
Tableau 10 : Validation statistique de la méthode. La concentration calculée, la justesse et la répétabilité du plus petit et du plus grand point de la gamme sont présentés. -----	128
Tableau 11 : Concentration (en nM) des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES détectés dans le milieu de culture des explants de peau humaine traités au CEES. -----	150
Tableau 12 : LOD et LOQ dans le plasma de souris soit après SPE manuelle soit après SPE en ligne grâce à deux souris témoins.-----	161
Tableau 13 : Concentration (en nM) des 4 biomarqueurs du CEES détectés dans la plasma de souris exposées au CEES. -----	165
Tableau 14 : Analyse des spectres RMN du proton de Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp. -----	175
Tableau 15 : Ions parents et ions fils lors de l'analyse en mode MRM des standards des biomarqueurs de l'ypérite.-----	179
Tableau 16 : Comparaison de certaines propriétés physico-chimiques de l'ypérite, du CESE et du CEES.-----	189
Tableau 17 : Toxicité chez les animaux de l'Ypérite, du CESE et du CEES en utilisant comme indicateur la dose létale médiane (DL 50).-----	190
Tableau 18 : Paramètres invariables dans ces travaux de thèse de la source du SM.-----	242
Tableau 19 : Les transitions MRM utilisées pour la méthode validée au chapitre 1 pour les biomarqueurs du CEES et leurs EI dans les milieux de culture, et leurs paramètres optimisés en spectrométrie de masse.-----	243

Tableau 20 : Les transitions MRM utilisées pour la méthode validée au chapitre 5 pour les biomarqueurs de l'ypérite et leurs EI dans le plasma, et leurs paramètres optimisés en spectrométrie de masse.-----243

Liste des équations

Équation 1: Première synthèse de l'ypérite réalisée par Despretz en mélangeant du dichlorure de soufre et de l'éthylène. -----	41
Équation 2: Les deux étapes de synthèse du l'ypérite par Meyer. -----	43
Équation 3: Synthèse de l'ypérite par Clarke. -----	43
Équation 4: Relation entre HEPT et la longueur de la colonne et son nombre de plateaux théoriques. HEPT s'exprime généralement en mm. -----	95
Équation 5: Equation de Van Deemter. -----	96
Équation 6: Principe du calcul de la concentration d'un analyte en utilisant un standard interne (SI). -----	103
Équation 7 : Formule permettant de calculer la justesse. -----	183
Équation 8 : Formule permettant de calculer les bornes de tolérance relatives haute (en faisant l'addition) et basse (en faisant la soustraction). -----	183
Équation 9 : Formule permettant de calculer les limites d'acceptabilité relatives haute et basse. ----	184

Introduction

Les menaces NRBCE (nucléaire, radiologique, biologique, chimique, explosif), regroupent cinq grands risques liés à des activités industrielles, à l'utilisation d'armes de destruction massive ou à des pandémies, pouvant entraîner un nombre élevé de victimes civiles et militaires : le nucléaire, la biologie, la chimie et la dissémination de produits radioactifs contaminants ou explosifs. Parmi ces risques, les armes chimiques ont une place particulière à cause de leur accessibilité parfois facile. Dans le domaine de la menace chimique un enjeu important consiste à identifier des biomarqueurs spécifiques à une exposition à l'ypérite. Cet agent chimique est présent sur les champs de bataille depuis 1917, lors de la première guerre mondiale. Malgré l'entrée en vigueur de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), la menace chimique reste toujours d'actualité par une exposition lors de conflits armés, d'actes terroristes ou d'une exposition accidentelle avec d'anciennes munitions. A l'heure actuelle, il n'existe ni antidote ni traitement spécifique contre une intoxication à l'ypérite. De plus, il y a des lacunes concernant l'identification des personnes potentiellement intoxiquées comme le souligne la Fiche Piratox n° 6 « Ypérite et autres moutardes vésicantes » de l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) :

« Il n'existe aucun marqueur d'exposition à l'ypérite qui soit dosé en routine ou aidant directement à la prise en charge des intoxiqués. Un certain nombre de marqueurs ont été mis en évidence pour confirmer l'exposition à ce toxique et ils ne sont disponibles que dans un nombre très limité de laboratoires appartenant au réseau de laboratoires Piratox. Les prélèvements urinaires doivent être congelés et les prélèvements sanguins uniquement réfrigérés. »

L'obtention de données qualitatives et surtout quantitatives sur l'exposition revêt un intérêt majeur à plusieurs titres : d'un point de vue médico-légal, pour apporter une preuve de la contamination ; d'un point de vue diagnostique ; et d'un point de vue pronostic. L'analyse de biomarqueurs est aussi un support à la recherche pour développer des contre-mesures médicales telles que des antidotes et des thérapies.

Pour prouver une exposition à l'ypérite, actuellement, des adduits à l'ADN sont analysés après extraction de l'ADN. Ces biomarqueurs permettent de faire des études de cinétiques, de diffusion au sein d'un organisme mais ces prélèvements sur les individus sont invasifs. De tels adduits sont instables et sont donc dépurinés dans les cellules pour se retrouver dans le milieu extra-cellulaire donc dans les fluides biologiques. Les produits hydrolysés et oxydés de

l'ypérite ont été utilisés comme biomarqueurs mais ils ne sont pas tous spécifiques. Des méthodes analytiques permettent d'analyser des conjugués aux protéines sanguines telles que l'albumine et l'hémoglobine. Ces conjugués sont stables dans le sang mais il est nécessaire pour leur analyse d'hydrolyser les protéines. Cette digestion rallonge de quelques heures le temps d'analyse. L'ypérite est métabolisée par la voie de métabolisation de l'acide mercapturique. Parmi ces métabolites, seuls les métabolites produits par les enzymes β -lyases ont été quantifiés alors que d'autres métabolites de cette voie peuvent servir comme biomarqueurs d'exposition. En effet, le conjugué à l'acide mercapturique sert déjà de biomarqueur pour d'autres expositions chimiques [1, 2].

C'est dans ce contexte que cette étude a été menée. Elle vise à mettre en place une méthode analytique spécifique à l'ypérite, sensible, capable de quantifier des biomarqueurs d'exposition persistants, présents dans les fluides biologiques et adaptés à une analyse par couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Pour cela, ces travaux proposent de nouveaux biomarqueurs pour compléter le panel de biomarqueurs à l'ypérite explorés. Nous nous sommes focalisés sur une série de biomarqueurs encore peu utilisés dans ce domaine : les conjugués du glutathion et certains de leurs métabolites produits par la voie de l'acide mercapturique et aux adduits à l'ADN dans les fluides biologiques.

Un point important à souligner est que, du fait de contraintes légales liées au contrôle des armes chimiques, l'ypérite n'est utilisable que dans deux laboratoires en France. Ainsi, une grande partie du travail expérimental préliminaire de cette étude a été réalisée avec son analogue, le CEES (2-chloroéthyl éthyl sulfure), reconnu pour sa réactivité chimique similaire et largement présent dans la littérature.

L'objectif dans le chapitre 1 a été de développer et valider une méthode d'analyse quantitative pour l'identification de biomarqueurs du CEES. On veut être capable de quantifier les biomarqueurs dans les milieux de culture après un traitement biologique *in vitro*. Pour cela, nous avons sélectionné 4 biomarqueurs : l'adduit à la position N7 de la guanine, le

conjugué au glutathion, le conjugué à la cystéine et le conjugué à l'acide mercapturique. Les standards des biomarqueurs ont été synthétisés, purifiés, quantifiés. L'idée ensuite a été de purifier et concentrer les biomarqueurs dans les échantillons en développant une méthode de préparation d'échantillon Extraction sur Phase Solide (SPE). La méthode analytique optimisée repose sur un couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse. L'ensemble du processus analytique développé a été validé en suivant les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration) pour pouvoir l'utiliser comme outil d'évaluation lors des traitements biologiques.

L'objectif du chapitre 2 a été d'utiliser cette méthode analytique pour étudier la formation des biomarqueurs du CEES chez les kératinocytes immortalisés humains, la lignée HaCaT, exposées au CEES. Pour cela, les cellules ont été traitées avec des concentrations élevées de CEES sur un temps court pour permettre la production de ses métabolites. Les cellules sont replacées dans du milieu de culture frais où elles sont incubées pendant 6h. L'objectif a été de vérifier la formation et l'excrétion des biomarqueurs du CEES par analyse des milieux de culture afin d'évaluer la pertinence des biomarqueurs choisis et la capacité de métabolisation des cellules de la peau.

L'objectif du chapitre 3 a été d'étudier la formation et la persistance à court terme des biomarqueurs du CEES après diffusion de ce toxique à travers la peau humaine *in vitro*. Les explants de peau humaine sont un modèle biologique plus complexe que les cellules en culture permettant de simuler une exposition humaine cutanée au CEES. Les explants ont été traités, de façon topique, avec différentes doses de CEES puis incubés pendant à 24h. Les milieux de culture ont été analysés afin d'y quantifier les biomarqueurs du CEES. La présence des biomarqueurs dans les milieux rend probable leur présence dans les fluides biologiques *in vivo*, spécialement le plasma.

L'objectif du chapitre 4 a été d'étudier la formation et la cinétique des biomarqueurs du CEES chez la souris sans poil. Elles ont subi un traitement cutané aux vapeurs de CEES. Les souris ont été sacrifiées entre 1 jour après l'exposition et 14 jours après l'exposition. De cette expérimentation animale, le plasma et le cerveau ont été analysés. L'analyse du sang permet d'évaluer la pertinence de chaque biomarqueur dans cette matrice facilement accessible. Pour son analyse, une méthode de SPE en ligne a été développée afin réduire le temps de préparation des échantillons. La quantification des biomarqueurs dans le cerveau, complète

des études sur les conséquences psychologiques et neurologiques de l'ypérite et de mieux comprendre sa diffusion et sa métabolisation.

Etant donné que le CEES n'est pas une menace en soi et que l'objectif principal concerne l'ypérite, l'objectif du chapitre 5 a donc été d'adapter la méthode validée au chapitre 1 aux biomarqueurs de l'ypérite. Pour cela, les standards spécifiques à l'ypérite ont été synthétisés, purifiés et calibrés. Pour synthétiser les biomarqueurs de l'ypérite sans pouvoir utiliser l'ypérite, nous avons utilisé un de ses produits de dégradation, le sulfure de 2-chloroéthyl 2-hydroxyéthyl (CESE). Une méthode de chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) avec une étape de SPE en ligne a été adaptée de celles pour les marqueurs du CEES en utilisant les mêmes étapes élémentaires.

L'objectif du chapitre 6 a été d'évaluer la pertinence du CESE, produit dont la fonction hydroxyle correspond à l'hydrolyse d'un chlore dans les monoadduits de l'ypérite. Il permet de former chimiquement des métabolites de l'ypérite dont l'adduit à la position N7 de la guanine, le conjugué au glutathion, le conjugué à la cystéine et le conjugué à l'acide mercapturique. L'idée a donc été de vérifier *in vitro* la formation de ces biomarqueurs de l'ypérite en traitant des cellules primaires par le CESE. La toxicité induite par ce composé a été comparée à celle du CEES.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un cofinancement entre le CEA et l'Agence de l'Innovation de Défense et d'une collaboration active avec l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées.

Etat de l'art

1. Les toxiques de guerres

1.1. Petite histoire des armes chimiques

Depuis des siècles, bien avant la première guerre mondiale, les produits chimiques ont été utilisés lors de guerres, de conflits, d'attaques terroristes. Les toxines extraites de plantes et d'animaux ont été utilisées comme poison. Dès l'Antiquité gréco-romaine, les premières armes chimiques ont fait leur apparition lors de différents conflits. Par exemple, durant les guerres du Péloponnèse, des puits ont été empoisonnés et des gaz sulfureux poussés par le vent ont été utilisés sur des cités assiégées. Les cavaliers romains utilisèrent des fumées suffocantes et des cendres caustiques lors du siège d'Ambrasia, 187 avant J.C., pour neutraliser leurs adversaires. Remarquons que ces usages ont été unanimement condamnés par les juristes grecs et romains.

Suite aux progrès de la chimie au 19^{ème} siècle, les armes chimiques ont pris un nouveau tournant. La première utilisation massive eut lieu en avril 1915 lors de la première guerre mondiale, qui sera rebaptisée la « guerre des gaz ». En effet, les troupes allemandes ont répandu 168 tonnes de chlore tuant environ 5000 alliés. Durant cette guerre, l'utilisation des armes chimiques, telles que le chlore, le phosgène, des irritants, des vésicants causa environ 90 000 morts et 1,3 million de blessés.

En 1980, l'Iraq attaqua l'Iran avec du gaz moutarde et des gaz neurotoxiques. En l'espace de 8 ans, l'Iran subit 387 attaques chimiques causant la mort de 100 000 soldats ainsi que de nombreux civils. A l'heure actuelle, des milliers de victimes souffrent des effets à long terme de ces toxiques.

Parmi les agents de la menace NRBC(E) (nucléaire, radiologique, biologique, chimique, explosif), les armes chimiques ont une place particulière à cause de leur accessibilité relativement facile pour certains agents. C'est en particulier le cas de l'ypérite présente sur les champs de bataille depuis 1917. Jusqu'à aujourd'hui, l'ypérite (ou gaz moutarde) a été utilisée au moins lors d'une douzaine de conflits, tuant et blessant sévèrement des millions de personnes, des militaires ainsi que des civils. Ce bilan important justifie que des laboratoires travaillent sur cet agent pour mieux comprendre sa toxicité et pour développer des stratégies

thérapeutiques. Ce dernier point est particulièrement délicat du fait des nombreuses cibles biologiques de l'ypérite et des mécanismes physiologiques ainsi perturbés.

1.2. Traités d'interdiction

Dès 1907, la Convention de La Haye proscrit l'utilisation des armes chimiques, ce qui n'empêcha pas les attaques massives avec ces agents lors de la première guerre mondiale. Ce conflit fit prendre davantage conscience que ces armes causent des souffrances inutiles et disproportionnées par rapport aux avantages militaires attendus, et qu'elles sont non discriminantes *i.e.* elles touchent aussi bien les militaires que les populations civiles. Ainsi la communauté internationale a redoublé d'efforts pour interdire leur emploi. L'aboutissement de ces réflexions fut la signature du Protocole de Genève de 1925 concernant la prohibition d'emploi de gaz asphyxiants, toxiques ou similaires et de moyens bactériologiques.

Cependant ce Protocole souffrait de véritables lacunes : les interdictions se limitaient à l'emploi d'armes chimiques et bactériologiques. Il n'était absolument pas interdit de mettre au point, de fabriquer ou de posséder de telles armes. De plus, la volonté des pays signataires d'interdire complètement les armes chimiques n'était pas totale : de nombreux pays signèrent le Protocole avec des réserves leur permettant d'utiliser des armes chimiques contre des pays n'ayant pas adhéré au Protocole ou de riposter de la même manière en cas d'attaque à l'arme chimique.

Le 3 septembre 1992, un comité spécial a soumis à la Conférence du désarmement le texte appelée la Convention sur l'interdiction des armes chimiques (CIAC). Cette Convention, qui inclut pour la première fois un régime de vérification, s'articule autour de trois grands thèmes : l'interdiction des armes chimiques et leur destruction ; la non-prolifération ; la coopération. Le 29 avril 1997, avec 87 États parties, la Convention sur l'interdiction des armes chimiques entrait en vigueur et acquérait force exécutoire au regard du droit international. Le nombre des états signataires a atteint 194 en 2013. Les Etats non signataires sont : la Corée du Nord, l'Égypte, le Sud Soudan.

1.3. Définitions d'après la CIAC

La CIAC a défini la notion « d'arme chimique » [3] :

a) Les produits chimiques toxiques et leurs précurseurs, à l'exception de ceux qui sont destinés à des fins non interdites par la Convention, aussi longtemps que les types et quantités en jeu sont compatibles avec de telles fins.

b) Les munitions et dispositifs spécifiquement conçus pour provoquer la mort ou d'autres dommages par l'action toxique des produits chimiques toxiques définis à l'alinéa a), qui seraient libérés du fait de l'emploi de ces munitions et dispositifs.

c) Tout matériel spécifiquement conçu pour être utilisé en liaison directe avec l'emploi des munitions et dispositifs définis à l'alinéa b).

Un produit chimique est dit toxique si par son action chimique sur des processus biologiques, il peut provoquer chez les êtres humains ou les animaux, la mort, une incapacité temporaire ou des dommages permanents. Cela comprend tous les produits chimiques de ce type, quels qu'en soient l'origine ou le mode de fabrication, qu'ils soient obtenus dans des installations, dans des munitions ou ailleurs [3].

1.4. Les différentes familles de toxiques de guerre

Les toxiques de guerre sont généralement de petites molécules, *i.e.* avec un masse moléculaire faible, qui existent sous forme solide, liquide ou gazeuse. L'état physique de ces toxiques détermine leur efficacité, leur usage et leur conséquences physiologiques. Ils ont souvent un temps d'action faible et peuvent être létaux même à faibles doses. Les toxiques de guerre sont d'une grande variété, que ce soit d'un point de vue physico-chimique (masse moléculaire, point fusion) ou des effets toxiques (concentration létale, effets sur la peau, type d'antidote). Il existe deux grandes familles de toxiques de guerre : les agents volatils et les agents persistants. Les composés volatils contaminent essentiellement l'air alors que les composés persistants recouvrent surtout les surfaces. Les agents chimiques sont généralement classés par leur mode d'action et le type de blessure qu'ils engendrent (Tableau 1).

Famille	Exemples	Dispersion	Mode d'action	Effets
Agents suffocants	Chlore Chloropicrine Disphosgène Phosgène	Gaz	Absorption par les poumons	Accumulation de fluide dans les poumons entraînant l'asphyxie de la victime
Agents hémotoxiques	Cyanure d'hydrogène Chlorure de cyanogène Arsine	Gaz	Absorption par les poumons	Inhibition de la capacité des cellules sanguines à utiliser l'oxygène
Agents de lutte antiémeute	Gaz lacrymogène Gaz au poivre	Liquide Aérosol	Absorption par les poumons, la peau et les yeux	Larmes, toux et irritation des yeux, du nez, de la bouche et de la peau ; constriction des voies respiratoires
Agents neurotoxiques	Tabun Sarin Soman Cyclosarin VX	Liquide, aérosol, vapeur et poussière	Absorption par les poumons ; contact avec la peau	Convulsions, perte de contrôle du corps ; paralysie des muscles, notamment du cœur et du diaphragme.
Agents vésicants	Moutarde au soufre Moutarde à l'azote Lewisite	Liquide, aérosol, vapeur et poussière	Absorption par les poumons et la peau	Brûlures sur la peau, les muqueuses et les yeux ; apparition de cloques sur la peau, dans la paroi de la trachée et dans les poumons

Tableau 1 : Les différentes familles des toxiques de guerres et de leurs principales caractéristiques.

1.4.1. Les agents suffocants

Ils touchent principalement les voies respiratoires *i.e.* ils irritent le nez, la gorge et surtout les poumons. Lorsque ce type de gaz est inhalé par une victime, il provoque dans les alvéoles la sécrétion d'un flux constant de fluide qui remplit les poumons, entraînant ainsi l'asphyxie de la personne. Ils ont une persistance faible dans l'environnement. Les principaux agents sont : le chlore, le phosgène, le diphosgène, la chloropicrine. Etant des composés utilisés dans l'industrie chimique, ils ont été les premiers toxiques de guerre disponibles en grandes quantités. Ils ont été utilisés à grande échelle lors de la première guerre mondiale car ces gaz retombaient bien dans les tranchées.

1.4.2. Les agents hémotoxiques

Ces agents se diffusent dans le sang après pénétration par inhalation. Leur toxicité est due à leur capacité à inhiber l'aptitude des cellules sanguines à utiliser et à transférer l'oxygène. Ainsi, la victime meurt d'asphyxie. Dans l'ensemble ils ont une persistance faible dans l'environnement et une vitesse d'action rapide. Les plus connus de ces agents sont : le cyanure d'hydrogène, le chlorure de cyanogène et l'arsine.

1.4.3. Les agents de lutte anti-émeute

Ces agents sont très majoritairement utilisés dans la lutte anti-émeute. Ils ont fait l'objet de nombreux débats pour savoir s'ils doivent être considérés comme des toxiques de guerres ce qui les inclurait dans le traité de non-prolifération des armes chimiques. Finalement, ces agents sont autorisés dans le cadre du maintien de l'ordre public, mais ils sont cependant bien interdits comme moyens de guerre. Ce sont des composés chimiques qui causent une incapacité temporaire par irritation des yeux et/ou du système respiratoire. Ces agents sont choisis pour leur faible toxicité qui est non létale aux concentrations utilisées.

1.4.4. Les agents neurotoxiques

Ils bloquent les impulsions entre les cellules nerveuses ou d'une synapse à l'autre. La contamination se fait généralement par absorption par la peau et les poumons. Ces agents sont divisés en deux groupes principaux : les agents de la série G et les agents de la série V selon leurs désignations militaires. A la fin des années 30, des chimistes allemands ont synthétisé les premiers agents neurotoxiques, le tabun (GA) et le sarin (GB), qui ont été les premiers des agents de la série G. Le soman (GD) et le cyclosarin (GF) ont rapidement suivi. Peu après, des chimistes britanniques ont développé les agents de la série V, qui tendent à être plus létaux. Le VX est le plus connu. Les agents V sont des toxiques extrêmement dangereux puisqu'il suffit seulement de quelques milligrammes pour entraîner la mort de la victime. De plus, ils persistent longtemps sur les champs de bataille.

1.4.5. Les agents vésicants

Ce sont les toxiques de guerre les plus courants. Ces substances huileuses agissent par inhalation et par contact avec la peau. Leur nom vient de l'apparition de grandes vésicules qui s'apparentent à de graves brûlures. Plus précisément, ils sont classés en trois catégories :

- Les moutardes à l'azote
- Les vésicants à l'arsenic
- Les moutardes au soufre

La CIAC répertorie 9 molécules dans les moutardes au soufre qui sont donc considérées comme agent de guerre (*Tableau 2*). Parmi ces agents se retrouve l'ypérite, le plus connu, qui est au cœur de ces travaux de thèse. Les structures chimiques des moutardes au soufre dérivent de celle de l'ypérite.

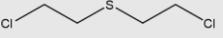
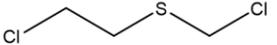
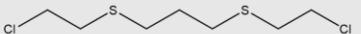
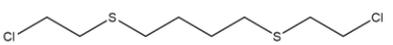
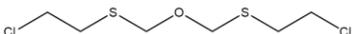
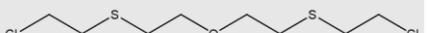
Nom	CAS	Formule chimique	Structure chimique
Ypérite Gaz moutarde	505-60-2	$C_4H_8Cl_2S$	
Sulfure de 2-chloroéthyle et de chlorométhyle	2625-76-5	$C_3H_6Cl_2S$	
Bis(2-chloroéthylthio)méthane	63869-13-6	$C_5H_{10}Cl_2S_2$	
Sesquimoutarde Agent Q	3563-36-8	$C_6H_{12}Cl_2S_2$	
1,3-Bis(2-chloroéthylthio)-n-propane	63905-10-2	$C_7H_{14}Cl_2S_2$	
1,4-Bis(2-chloroéthylthio)-n-butane	142868-93-7	$C_8H_{16}Cl_2S_2$	
1,5-Bis(2-chloroéthylthio)-n-pentane	142868-94-8	$C_9H_{18}Cl_2S_2$	
Oxyde de bis(2-chloroéthylthiométhyle)	63918-90-1	$C_6H_{12}Cl_2OS_2$	
Moutarde-O Agent T	63918-89-8	$C_8H_{16}Cl_2OS_2$	

Tableau 2 : Liste des agents chimiques interdits par la CIAC parmi les moutardes au soufre.

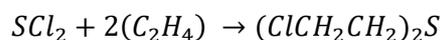
2. L'ypérite et le CEES

L'ypérite figure parmi les agents chimiques de guerre les plus utilisés, depuis la première guerre mondiale jusqu'au récent conflit syrien. La relative facilité de sa synthèse et l'existence de stocks en fait également une arme potentielle d'attaque terroriste. Ces divers éléments justifient que l'on continue à s'intéresser à cette molécule.

2.1. Synthèse

L'histoire de l'ypérite est souvent présentée comme commençant à la première guerre mondiale où elle a été utilisée massivement. En réalité, elle a été synthétisée pour la première fois presque 100 ans avant le début de ce conflit.

En France, Despretz (1798-1863), professeur à l'école Polytechnique de Paris, décrit certains de ses résultats à l'Académie Royale des Sciences en décembre 1822. Il montre la réaction entre le dichlorure de soufre et l'éthylène (*Équation 1*) [4].



Équation 1 : Première synthèse de l'ypérite réalisée par Despretz en mélangeant du dichlorure de soufre et de l'éthylène.

Le produit obtenu est décrit par le chimiste comme malodorant, visqueux et difficile à brûler. Il ne mentionne pas les propriétés irritantes de ce composé. Il est considéré comme le scientifique ayant découvert cette molécule [5].

Toujours en France, le chimiste Alfred Riche, en 1854, répète les expériences de Despretz. Il décrit son travail dans l'article « Recherches sur des combinaisons chlorées dérivées des sulfures de méthyle et d'éthyle ». Il ne détaille ni les étapes de la synthèse ni les produits intermédiaires. A nouveau, il ne mentionne aucun caractère irritant du liquide jaune obtenu ayant un point d'ébullition à 185-200 °C.

Des travaux similaires ont été réalisés en Allemagne par le chimiste Niemann qui se basa sur les travaux de Despretz. En 1860, il publia l'article « Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaygas » (A propos des effets du chlorure de soufre brun sur le gaz d'éthylène) [6]. Il décrit la réaction entre l'éthylène et le chlorure de soufre « brun » (un mélange de monochlorure de soufre et de dichlorure de soufre). Le liquide huileux obtenu a un point d'ébullition entre 190 et 200°C, est insoluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'alcool mais bien soluble dans les éthers. Il est le premier à relever les effets toxiques de l'ypérite. Par contre, la formule chimique exacte du produit obtenu n'est pas encore totalement élucidée.

Au même moment, en 1860, en Angleterre, Guthrie, plus connu pour ces travaux en physique qu'en chimie, synthétisa et décrit l'ypérite (*Tableau 3*) [7]. Il y parvient en faisant doucement barboter de l'éthylène dans du chlorure de soufre à froid. Puis, il caractérisa son produit, nommé « bichlorosulfure d'éthylène » :

« Son odeur est âcre et non déplaisante, ressemblant à l'huile de moutarde ; son goût est astringent et similaire au raifort. Les petites quantités de vapeur qui se diffusent attaquent les peaux fines, comme entre les doigts et autour des yeux, détruisant l'épiderme. S'il reste sous forme liquide sur la peau, des vésicules apparaissent. »

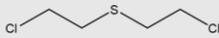
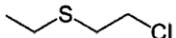
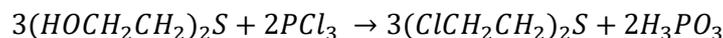
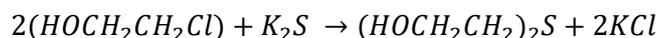
Nom	Synonymes	CAS	Formule chimique	Structure chimique
Ypérite	Gaz moutarde; bis(2-chloroéthyl)sulfure; « sulfur mustard »; SM; « agent HD »; « mustard gas »	505-60-2	C ₄ H ₈ Cl ₂ S	
CEES	Sulfure de 2-Chloroéthyl éthyl	693-07-02	C ₄ H ₉ ClS	

Tableau 3 : Noms, formule chimique et structure de l'ypérite et du CEES (un analogue de l'ypérite utilisé en recherche).

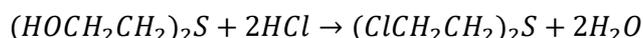
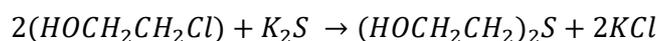
Plus tard, en Allemagne, en 1886, le chimiste Meyer arrive à obtenir de l'ypérite plus pure. Pour cela, il utilise d'autres réactifs, par rapport aux premiers travaux. En effet, il fait réagir du 2-chloroéthanol avec du sulfure de potassium puis traite le résultat avec du trichlorure de phosphore (*Équation 2*). Il décrit son composé comme un liquide huileux lourd avec un point

d'ébullition de 217°C. Il le qualifie de poison fort qui engendre des blessures, avec un temps de latence de plusieurs heures, qui cicatrisent très difficilement [8].



Équation 2 : Les deux étapes de synthèse du l'ypérite par Meyer.

Juste avant la première guerre mondiale, en 1913, un anglais, Clarke reprend les travaux de l'allemand Meyer en améliorant la deuxième étape de la synthèse. Il remplace le trichlorure de phosphore par de l'acide chlorhydrique (*Équation 3*). Il confirme les caractéristiques décrites par le chimiste allemand. Malgré la toxicité de l'ypérite, Clarke trouve qu'il est possible de le manipuler en parfaite sécurité en évitant ces vapeurs et tout contact avec la peau. Cependant, un accident avec une flasque cassée le conduisit 2 mois à l'hôpital pour cicatriser ses plaies à la jambe.



Équation 3 : Synthèse de l'ypérite par Clarke.

Pendant la première guerre mondiale, la production à grande échelle a été faite en utilisant les procédés de Meyer et Clarke. Jusqu'à la seconde guerre mondiale, des travaux ont été faits pour augmenter le rendement de synthèse et la pureté du produit final [9].

Aujourd'hui, l'ypérite est bien caractérisée puisque ces principales propriétés physico-chimiques sont connues (*Tableau 4*). Quand elle est pure, elle est incolore. Sa couleur jaune allant jusqu'au brun, lors de ses utilisations en tant qu'agent de guerre, vient des impuretés de la synthèse. A température ambiante, c'est un liquide visqueux, faisant penser à de l'huile qui a une densité de 1,27 ; qui n'est à l'état gazeux qu'à partir de 218°C. C'est pourquoi, malgré son appellation « gaz moutarde », ce composé n'est pas à l'état gazeux lors de son utilisation dans les conflits armés mais à l'état liquide. L'explosion des obus crée un aérosol d'ypérite *i.e.* un ensemble de fines particules liquides, en suspension dans l'air. Les vapeurs de l'ypérite

sont plus denses que l'air, elle reste au niveau du sol. L'ypérite est très peu soluble dans l'eau, elle est lipophile. L'ypérite est dite persistante dans l'environnement extérieur. A une température de 38°C, elle est présente dans l'environnement pendant 7 h environ alors qu'à 10°C elle est persistante pendant 100 h.

Nom	Etat	Masse moléculaire (g/mol)	Densité/eau	Densité/air	Point ébullition	Point fusion	Solubilité
Ypérite	Liquide huileux	159,08	1,27	5,4	215-217 °C	14,5 °C	609 mg/L (25°C)
CEES	Liquide incolore	124,63	1,07		156 °C		

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques de l'ypérite et du CEES.

2.2. Utilisations

Lors de la première guerre mondiale, en juillet 1917, les troupes anglaises, à côté d'Ypres en Belgique, ont été attaquées par des obus contenant un liquide huileux irritant [10]. C'est la première fois que cet agent a été utilisé de façon massive. Il infligea environ 15 000 blessés aux troupes anglaises en seulement 3 semaines. Bien que l'ypérite irrite les voies respiratoires, les allemands pendant la 1ère guerre mondiale l'ont utilisé pour ses propriétés vésicantes. En effet, malgré le développement des masques à gaz, les soldats étaient tout de même fortement gênés par les irritations cutanées (*Figure 2*). Il y a généralement une période de latence de plusieurs heures entre l'exposition à l'ypérite et l'apparition des premiers symptômes. C'est pour cela qu'un chimiste américain, en 1917, développa un nouveau vésicant capable d'induire toute de suite des douleurs. Ce composé a été nommé Lewisite.

Malgré une introduction tardive dans le conflit, l'ypérite est responsable de 80% des intoxications avec 1,2 million de blessées. Plus de 100 000 personnes sont décédées rapidement après une telle exposition. De plus, on estime qu'au moins 113 000 tonnes d'agents chimiques ont été utilisées sur les champs de bataille, ce qui représente environ 66 million d'obus (*Figure 1*). L'utilisation de l'ypérite perturbe les troupes adversaires plus qu'elle ne tue. Moins de 5% des blessés à l'ypérite sont décédés. Par contre, l'évacuation et la prise en charge des nombreux blessés ayant une convalescence supérieure à 6 semaines réquisitionne le personnel du système de santé, spécialement les unités de brûlures. Pendant les conflits, l'ypérite avait de

nombreux surnoms : « distilled mustard »; « S-mustard »; « S-Lost »; « Schwefel-Lost »; « Yellow cross liquid »; Ypérite; « Kampstoff Lost ».

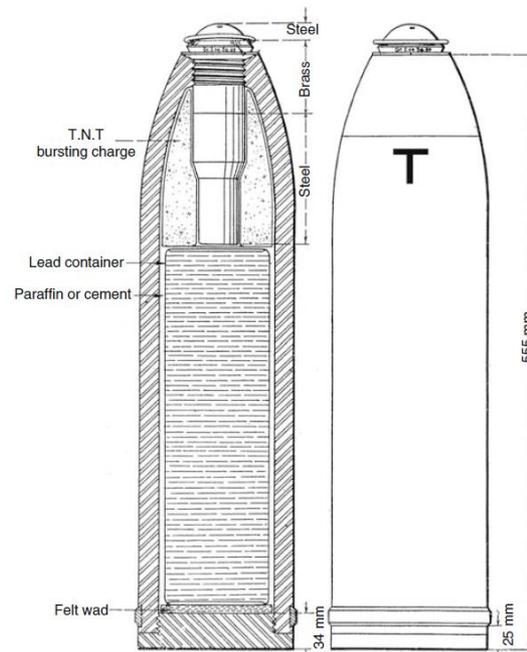


Figure 1 : Obus allemand de 150 mm conçu pour les agents chimiques pendant la première guerre mondiale.

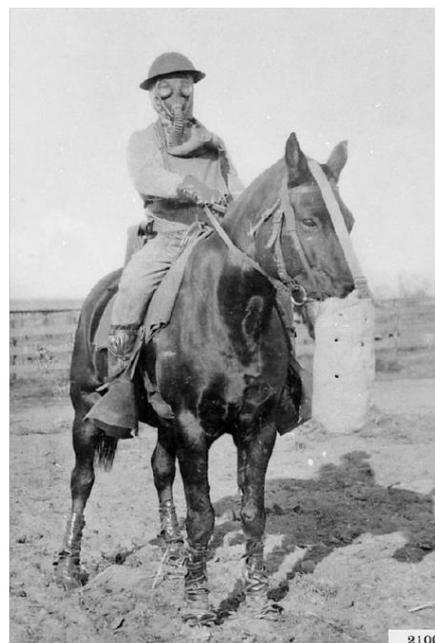


Figure 2 : Un soldat et son cheval pendant la première guerre mondiale, tous deux portant les équipements de protection contre l'ypérite.

Dès lors, l'ypérite a été utilisée lors de nombreux conflits jusqu'à aujourd'hui (*Tableau 5*). En 1919, le Royaume-Uni s'en est servi contre l'armée rouge pendant la guerre civile russe. Entre 1923 et 1926, les espagnols ont lancé des obus d'ypérite pendant la guerre du Rif. En 1936, elle a été utilisée en Ethiopie par des troupes italiennes. Les armes chimiques et bactériologiques ont été utilisées pendant la 2^{ème} guerre sino-japonaise. Bien qu'il n'y a pas eu d'utilisation des armes chimiques lors de la seconde guerre mondiale, les états belligérants avaient des stocks considérables d'ypérite [11]. Ces derniers ont été en grande majorité enfouis dans la mer [12]. Les seuls cas de blessure à l'ypérite pendant la seconde guerre mondiale ont eu lieu lors du bombardement du port de Bari en décembre 1943. Parmi les bateaux au port, un cargo contenait 100 tonnes de vésicants. Il y eu 600 blessés aux agents vésicants dont 83 morts. L'ypérite a été utilisée lors du conflit Egypte-Yemen (1963-1967). Elle a été massivement utilisée par les iraqiens contre les soldats et les civils iraniens entre 1983 et 1988. Ces attaques chimiques ont blessé plus de 100 000 personnes [13].

Plus récemment, en Syrie, depuis 2015, trois attaques avec de l'ypérite ont eu lieu. En août 2015, l'ypérite a été utilisée lors de l'attaque de la ville de Marea, dans le nord de la Syrie. En particulier, quatre membres d'une famille ont souffert de difficultés respiratoires et de brûlures [14]. Plus tard, en mars 2016, c'est en Iraq à Tazahurmatu que plusieurs personnes ont été exposées à l'ypérite après une attaque. Enfin, un groupe de syriens a aussi été exposé à cet agent en novembre 2016 à Al-Bab en Syrie [15].

L'ypérite reste une menace aujourd'hui surtout dans le cadre des attaques terroristes [16]. Une utilisation d'armes chimiques, sur le modèle de la secte Aum à l'origine d'un attentat au gaz sarin dans le métro de Tokyo en 1995, pourrait avoir de lourdes conséquences. La fabrication de substances chimiques nocives telles que l'ypérite ne requiert en effet pas de moyens particulièrement difficiles à acquérir ou à opérer. Les groupes terroristes cherchent à se doter d'armes de destruction massive comme les armes nucléaires, radiologiques, biologiques ou chimiques [17].

Conflit	Période	Agent chimique	Lieu	Victimes
Première guerre mondiale	1915-1918	Chlorine, phosgène, cyanure d'hydrogène, ypérite	Europe Moyen-Orient	> 1,3 million
Guerre civile russe	1919-1921	Adamsite, diphénylchloroarsine, ypérite	Russie	inconnu
Guerre du Rif	1923-1926	Chloropicrine, bromométhyléthylcétone, ypérite	Maroc	inconnu
2 ^{de} guerre italo-éthiopienne	1936-1940	Chlorine, diphénylchloroarsine, phénylchloroarsine, phosgène, 2-chloroacétophénone, ypérite	Ethiopie	50 000 - 150 000
2 ^{de} guerre sino-japonaise	1937-1945	2-chloroacétophénone, diphénylchloroarsine, cyanure d'hydrogène, lewisite, phosgène, ypérite	Mandchourie	> 80 000
Guerre civile au Yémen	1963-1967	2-chloroacétophénone, phosgène, ypérite	Yémen	>14 000
Guerre du Vietnam	1965-1975	2-chlorobenzylidène malonitrile,	Vietnam	inconnu
Guerre Iran Iraq	1980-1988	2-chlorobenzylidène malonitrile, sarin, tabun, ypérite	Iran, Iraq	> 100 000
Attaques terroristes Aum Shinrikyo	1994-1995	Sarin, VX	Japon	> 1 000
Conflit syrien	2013-2015	Chlorine, sarin, ypérite	Syrie	inconnu

Tableau 5 : L'utilisation de l'ypérite lors de conflits depuis la première guerre mondiale.

2.3. Toxicologie

2.3.1. Pénétration et diffusion de l'ypérite dans l'organisme

L'ypérite peut être absorbée soit par inhalation soit par contact cutané soit par ingestion d'aliments contaminés. Cet agent lipophile pénètre facilement dans la peau et dans les muqueuses. Lors d'une exposition cutanée, 20% de la quantité d'ypérite passe dans la peau au bout de quelques minutes [18]. Parmi les 20% absorbés, environ 12% se retrouvent dans l'épiderme et le derme alors que le reste, 8 %, passe directement dans le système sanguin (*Figure 3*) [19]. La vitesse de pénétration de l'ypérite gazeux à travers la peau humaine a été estimée entre 1 et 4 mg/cm²/min. Une élévation de la température et de l'humidité augmente la vitesse de pénétration [18, 20]. Que ce soit une intoxication cutanée ou par inhalation, l'ypérite peut se retrouver en moins de 10 minutes dans le système sanguin [21].

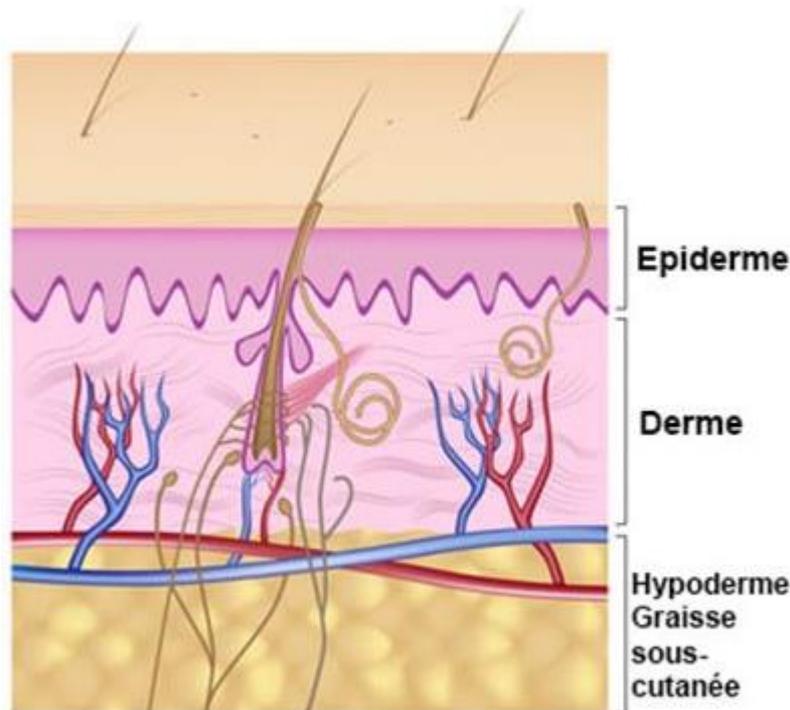


Figure 3 : Représentation des principales couches composant la peau.

Cameron *et al.* ont calculé l'absorption de l'ypérite sous forme vapeur dans le nez de lapins. Dans une enceinte de vapeur d'ypérite, le nez en absorbe environ 20% contre 75% pour le phosgène en comparaison [22]. Plusieurs équipes ont étudié la dispersion dans l'organisme de l'ypérite par mesure de radioactivité en utilisant de l'ypérite marquée au soufre 35. Après exposition cutanée et par voie intraveineuse, la majorité de l'ypérite et de ses métabolites a été détectée dans les reins, le foie, la région nasale, le système nerveux central et les poumons [23, 24]. Dans les minutes suivant une exposition cutanée, au niveau de la peau, l'ypérite se concentre surtout dans l'épiderme. Cinq minutes après une exposition oculaire, l'ypérite se retrouve majoritairement dans la cornée [25]. La biotransformation de l'ypérite après intoxication d'animaux a été étudiée. Davison *et al.*, après injection intravéneuse d'ypérite chez des rats et des souris, ont majoritairement retrouvé dans les urines le conjugué GSH-sulfure de bis-chloroéthyl (45%), des conjugués au sulfone (7%), le thiodiglycol et ses conjugués (14,4%) [26]. Roberts et Warwick (1963) ont trouvé que le métabolite majoritaire dans les urines après injection intrapéritonéale chez des rats est le cystéine-bis-(β -chloroéthyl) sulfone, qui n'est pas un conjugué au glutathion [27]. Ces différences de produits majoritaires peuvent être liées aux différentes voies d'injection.

2.3.2. La réactivité de l'ypérite

La réactivité de l'ypérite a été étudiée et détaillée par Reid en 1958 [28]. La réactivité de cette molécule est à l'origine des mécanismes d'action entraînant les blessures. Avant de réagir avec des biomolécules, l'ypérite passe souvent par un intermédiaire très réactif. En effet, l'ypérite subit une cyclisation intramoléculaire pour former des ions (*Figure 4*). La formation de l'intermédiaire, l'ion épisulfonium, est facilité par l'augmentation de la température dans un environnement aqueux. Cela pourrait expliquer la grande sensibilité des régions chaudes et humides de l'organisme aux effets aigus de l'ypérite [19, 29].

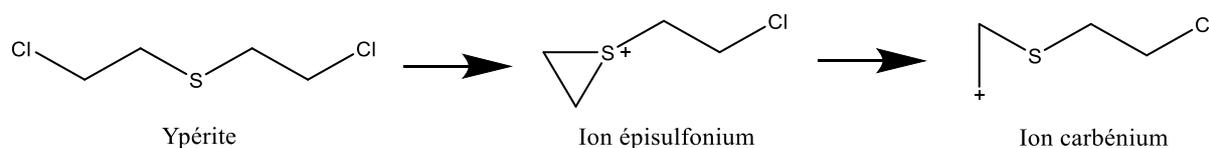


Figure 4 : Représentation des ions formés par l'ypérite en milieu physiologique.

L'ypérite est un agent alkylant : elle se lie de manière covalente à des nucléophiles, comme le représente le mécanisme en *Figure 5*. L'étape d'initiation de l'alkylation est une réaction intramoléculaire de type S_N2 qui forme l'ion épisulfonium. En effet, au sein de la même molécule, le soufre (bon nucléophile) et le chlore (bon groupe partant) vont permettre de créer un ion épisulfonium (très électrophile) par réaction intramoléculaire [28]. Ce cycle sulfonium, très réactif, électrophile, va réagir avec un nucléophile. Comme l'ypérite est bi-fonctionnelle, une deuxième réaction S_N2 peut avoir lieu au niveau du second chlore.

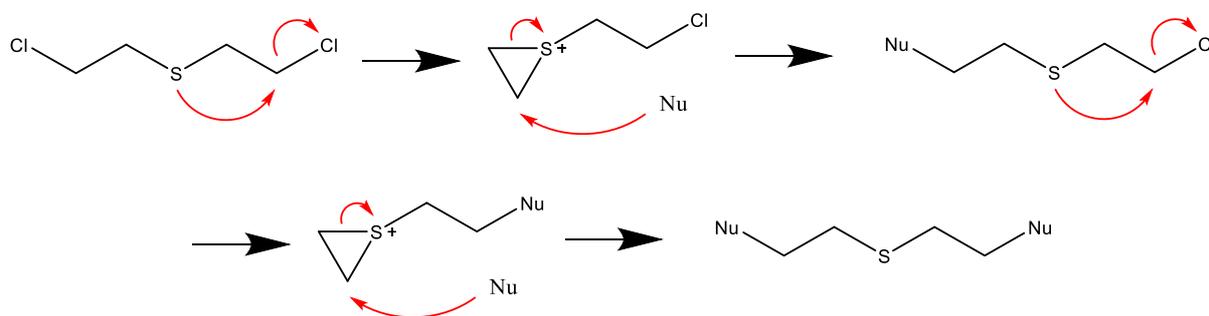


Figure 5 : Mécanisme réactionnel de l'ypérite avec deux nucléophiles (Nu).

2.3.2.1. Hydrolyse et réaction avec les fonctions alcools

Après formation de l'intermédiaire, l'ypérite peut modifier les carbohydrates et les fonctions alcools des protéines. En milieu physiologique, son temps de demi-vie est environ de 24 min car l'ypérite réagit avec l'eau pour former le thiodiglycol et l'acide chlorhydrique. (*Figure 6*). En solution alcaline, le temps de demi-vie de l'hydrolyse de l'ypérite est environ de 5 minutes. La réaction est plus lente en milieu acide.

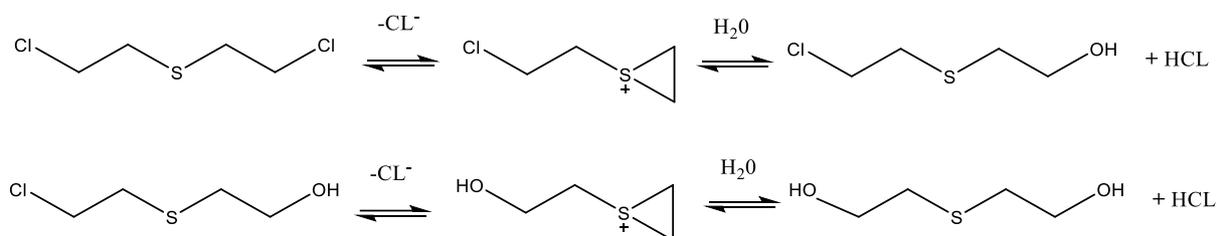


Figure 6 : Réaction de l'eau sur l'ypérite.

2.3.2.2. Réaction avec les fonctions thiols

Les fonctions thiols sont aussi alkylées en partant de l'ion épisulfonium. Les deux fonctions chlorées de l'ypérite peuvent réagir sur deux différentes fonctions thiol, formant des pontages.

2.3.2.3. L'oxydation

L'ypérite peut s'oxyder pour donner la sulfone et le sulfoxyde correspondant (*Figure 7*). Sachant que le sulfoxyde est moins réactif que le sulfone, la transformation de l'ypérite en sulfoxyde est une voie de détoxification et de neutralisation de l'agent. A l'inverse, la sulfone peut faire des attaques nucléophiles, elle est donc toxique.

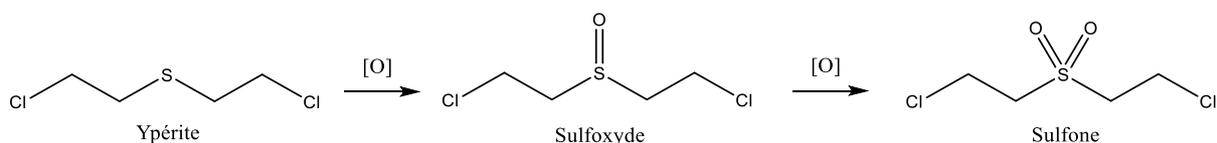


Figure 7 : Produits formés par l'oxydation du soufre de l'ypérite.

2.3.2.4. Réaction avec les fonctions azotées

L'ypérite réagit avec l'ammoniaque et avec les amines primaires, secondaires et tertiaires, hétérocycliques et avec les imines pour donner une variété de produits. Ces fonctions étant très présentes au sein des protéines, des bases de l'ADN et des phospholipides, ces biomolécules sont des cibles privilégiées de l'ypérite.

2.3.3. Mécanismes d'action biologique

L'ypérite est un agent alkylant bifonctionnel. Ses mécanismes d'action biologique ne sont pas encore parfaitement connus. Les réactions chimiques de l'ypérite avec les composés des cellules sont bien identifiées mais le lien entre ces interactions et les blessures n'est pas encore totalement élucidé. Beaucoup de recherches ont été faites pour comprendre les conséquences biochimiques de l'ypérite. De plus, les effets délétères de l'ypérite ne se limitent pas à la stricte zone contaminée mais aussi aux cellules et tissus en périphérie [30]. L'ypérite donne même des effets systémiques. La majorité des mécanismes sont induits par la capacité du chlore à alkyler de nombreuses biomolécules. Les produits formés sont des adduits stables qui peuvent modifier le fonctionnement normal des biomolécules concernées et ainsi perturber le métabolisme (*Figure 8*). Les principaux mécanismes connus à ce jour sont la déplétion du glutathion, l'alkylation de l'ADN/ARN, l'alkylation de protéines.

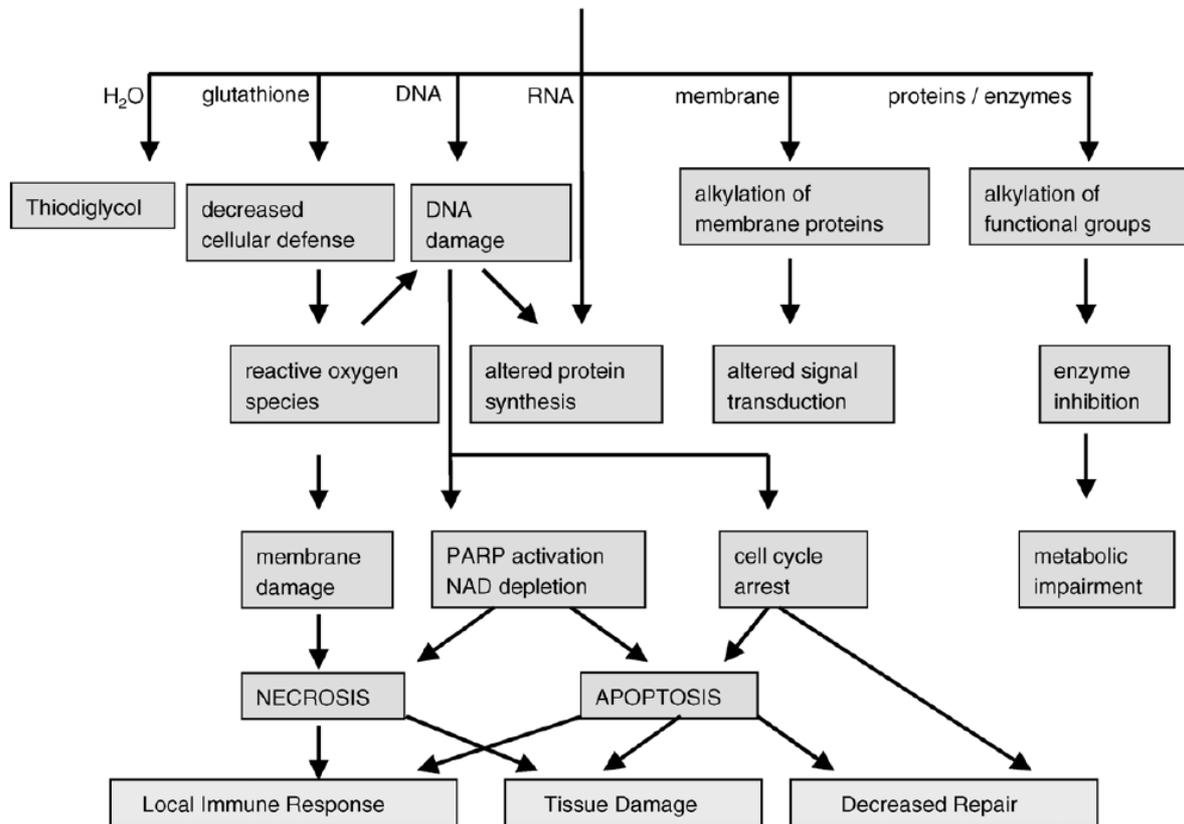


Figure 8 : Mécanismes d'action de l'ypérite proposés par Kehe et Szinicz [29]. Après réaction de l'ypérite avec différentes molécules des cellules, leur fonctionnement est perturbé jusqu'à induire leur nécrose ou leur apoptose.

2.3.3.1. Déplétion du glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) qui constitue le groupement thiol le plus abondant dans la cellule avec une concentration de l'ordre du millimolaire (**Figure 9**) [31]. La liaison entre l'acide glutamique et la cystéine n'est pas une liaison peptidique mais une liaison amide entre la fonction acide de l'acide glutamique et la fonction amine de la cystéine. Il est directement ou indirectement impliqué dans de nombreux mécanismes biologiques comme la synthèse des protéines et des acides nucléiques, le transport cellulaire, l'activité de plusieurs enzymes, le métabolisme secondaire et la protection cellulaire. En effet, il a un rôle essentiel dans la protection de la cellule contre les molécules et les métabolites électrophiles. De plus, c'est une des défenses majeures contre le stress oxydant. Il joue un rôle important dans le maintien et la régulation dans l'équilibre redox de la cellule. En effet, il peut réguler le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) grâce à son cycle redox où il est oxydé

en GSSG, forme oxydée du glutathion, puis réduit à nouveau par la glutathion réductase qui maintient ainsi le rapport GSH/GSSG stable.

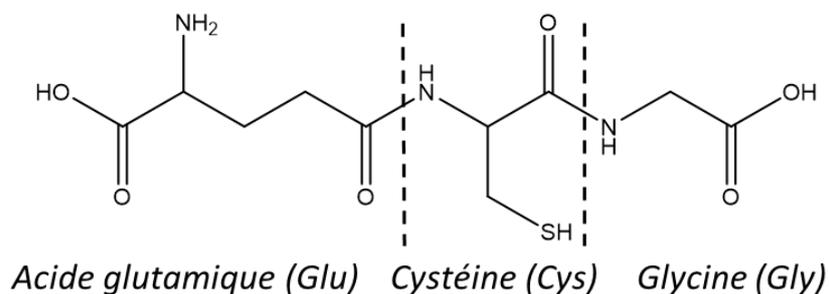


Figure 9 : Représentation du glutathion, sous sa forme réduite, formé par l'association de 3 acides aminés (acide glutamique, cystéine, glycine).

L'ypérite se conjugue au glutathion en réagissant au niveau de la fonction thiol par réaction directe ou par réaction catalysée par une enzyme. Dans les urines, certains métabolites issus initialement de la conjugaison de l'ypérite avec le glutathion ont été détectés [32]. La conjugaison du glutathion avec les molécules d'ypérite entraîne donc une diminution de la quantité de glutathion libre dans les cellules [33]. Cette baisse est même observée sur le long terme [34]. La quantité de GSH est significativement diminuée dans le foie, les reins et les muscles après intoxication à l'ypérite [35].

L'absorption de l'ypérite entraîne donc une déplétion du glutathion ainsi que des réactions inflammatoires aiguës [36]. Il a été observé que l'activité des antioxydants diminue dans le foie et les muscles, cependant, celle des reins n'est pas perturbée [35]. C'est pourquoi une augmentation de la production des ERO (espèces réactives de l'oxygène) et ERN (espèces réactives de l'azote) est observée [36]. Une exposition à l'ypérite augmente de façon significative les marqueurs de stress oxydant dès 1h après exposition. Une augmentation d'ERN est observé dans les cellules [40]. Dans le cas d'une exposition à un agent vésicant, comme l'ypérite ou le CEES, cette accumulation des ERO est proportionnelle à la dose de toxique appliquées aux kératinocytes de la peau, *in vitro* [37]. Dans les poumons et le foie d'animaux intoxiqués par l'ypérite, il y a une augmentation significative des marqueurs des dommages oxydants ainsi qu'une réduction des défenses antioxydantes tels que le glutathion, les activités de la catalase, ainsi que de la glutathion-S-transférase à long-terme [38].

L'augmentation des ERO et ERN change le ratio antioxydant / oxydant ce qui entraîne la perte de l'équilibre redox. Cela induit un stress oxydant [39]. Celui-ci entraîne des dommages sur l'ADN, l'oxydation de protéines, la peroxydation de lipides et d'autres toxicité au niveau des organes [40]. Les espèces oxydantes formées réagissent avec les membranes phospholipidiques pour former des peroxydes de lipides. Ces derniers sont responsables de l'altération des membranes [41]. Il y a un lien entre le dérèglement de l'équilibre redox et des dommages dans les organes ayant subi ce stress oxydant. Ces observations confirment que le déséquilibre oxydant / antioxydant est impliqué dans les effets à long-terme [38].

La diminution du glutathion entraîne aussi l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre. En effet la déplétion du glutathion entraîne une perte des groupements thiols des protéines et d'enzymes. Parmi les protéines dont l'action est inhibée, se trouve la famille des ATPases $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ qui régule l'homéostasie du calcium. L'inhibition de ces enzymes entraîne une augmentation de la concentration de Ca^{2+} . L'ypérite induit ainsi une légère augmentation en Ca^{2+} [42]. En conséquence, des protéases, des phospholipases et des endonucléases sont activées ce qui peut engendrer des cassures au niveau des membranes, du cytosquelette et de l'ADN donc la mort de la cellule [43].

2.3.3.2. Alkylation de l'ADN

L'ypérite, *via* l'ion épisulfonium, très réactif, réagit fortement avec l'ADN pour former des adduits. Les sites des bases de l'ADN susceptibles de subir une alkylation sont nombreux comme le montre la *Figure 10*. La guanine est la base la plus souvent et intensément touchée avec des adduits formés en position N2, N3, O6, N7 et C8. La régiosélectivité de la réaction d'addition dépend des propriétés chimiques de l'électrophile notamment l'acidité de Lewis. En ce qui concerne l'ypérite, l'adduit le plus fréquent est celui à la position N7 de la guanine mais il est peu stable. Il est facilement dépuriné et forme donc un site abasique. Cependant, ces adduits ne sont considérés ni comme directement cytotoxique ni comme directement mutagènes car ils sont instables et ne participent pas l'appariement des bases de l'ADN [44]. C'est le site abasique formé qui est cytotoxique. L'alkylation de la position O6 de la guanine est peu fréquente mais plus critique pour la mutagénèse. L'enzyme de réparation méthylguanine méthyltransférase, qui répare ces lésions alkylée en O6, a peu d'effet sur cet adduit de l'ypérite [45].

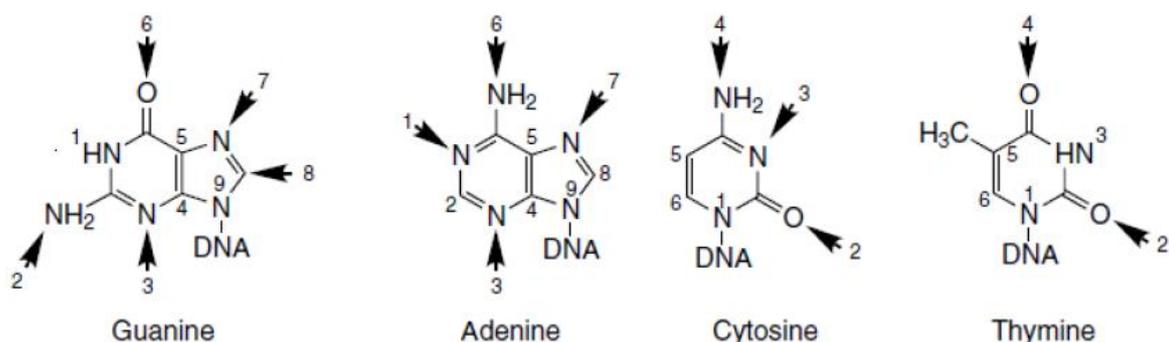


Figure 10 : Sites des bases de l'ADN qui peuvent être alkylés par des agents chimiques (Figure tirée de [46]).

Comme l'ypérite est bifonctionnelle, l'adduit formé peut subir une seconde réaction intramoléculaire de type S_N2 pour donner un second ion épisulfonium. Ce dernier va soit subir une solvolysé (formant un mono-adduit avec une fonction alcool dans l'eau), soit réagir avec un groupement nucléophile d'une protéine (formant un pontage ADN-Protéine), soit réagir avec une autre base de l'ADN (formant des pontages inter ou intra-brins) [47]. Les pontages inter-brins de l'ADN sont considérés comme une liaison fortement cytotoxique. Malgré leur faible pourcentage parmi les adduits formés, ils ont un rôle prépondérant dans les mécanismes d'action de l'ypérite et de sa toxicité. En effet, ils inhibent la réplication et la transcription en empêchant la séparation des brins ce qui va entraîner la mort cellulaire [48, 49]. Pour prévenir ces effets délétères, des mécanismes de réparation de l'ADN sont activés tels que la réparation par excision de base (BER) et la réparation par excision de nucléotides (NER) [50, 51]. Les sites abasiques issus des adduits peuvent entraîner des cassures simple brins et des cassures doubles brins lors de la réplication. Ces dernières sont responsables de l'arrêt du cycle de la cellule, de l'instabilité génomique, et dommages au niveau des chromosomes [52]. L'ypérite engendre donc à la fois des cassures de brin indirectement et des pontages [53, 54].

Ainsi, l'alkylation des bases de l'ADN entraîne des modifications structurales, *i.e.* pontages, cassures et sites abasiques, provoquant l'activation des processus de réparation. Ces mécanismes de réparation active l'enzyme poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) [55]. PARP-1 est un détecteur moléculaire des cassures dans l'ADN qui joue un rôle essentiel dans l'organisation spatiale et temporelle de leur réparation, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité du génome et à la survie cellulaire. Ainsi, elle limite les effets de l'ypérite [56]. Pour autant, la sur-activation de la PARP, induite par un nombre très élevé de dommages à l'ADN,

peut entraîner la mort de la cellule [57]. En effet, suractivée, elle épuise les réserves cellulaires de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). Cette baisse inhibe la glycolyse et active la voie des hexoses phosphates. De plus, la diminution en NAD⁺ libère des protéases qui ont un rôle dans le phénomène de vésication. Une infiltration de leucocytes, une libération de cytokines et autres médiateurs de l'inflammation participent aux lésions des tissus. Enfin, la diminution en NAD⁺ est aussi responsable d'une déplétion en adénosine triphosphate (ATP), consommée afin de reconstituer le stock de NAD⁺ [58]. Cet épuisement progressif de l'ATP par inhibition de l'oxydation du glucose, entraîne la mort cellulaire par nécrose [47]. Sans sa source d'énergie, la cellule ne peut maintenir son métabolisme de base comme sa défense contre le stress oxydant. A cause de ces différentes altérations, les cellules meurent selon différents types de mécanisme : nécrose ou mort cellulaire programmée.

L'ypérite attaque aussi bien l'ADN que l'ARN dont les principaux sites d'alkylation sont N-7 de la guanine, N-1 de l'adénine, N-3 de l'adénine, O-2 et N-3 de la cytosine [59, 60] (*Figure 11*). D'un point de vue structurel, l'ARN contient des résidus de ribose là où l'ADN contient du désoxyribose, ce qui rend l'ARN chimiquement instable, différemment que l'ADN. L'ADN se dépurine alors que l'ARN s'hydrolyse.

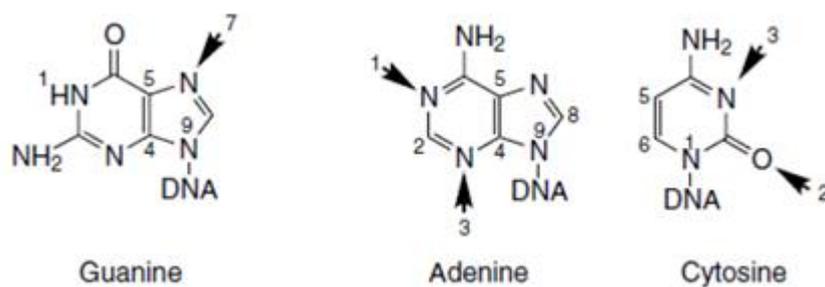


Figure 11 : Sites des bases de l'ARN qui peuvent être alkylés par des agents chimiques.

2.3.3.3. Alkylation des protéines

Les groupements thiol des cystéines des protéines peuvent être alkylés par l'ypérite. Des liaisons covalentes sont formées entre l'ypérite et les protéines. Cette modification des protéines peut engendrer un changement de leur conformation et/ou un dysfonctionnement de leur activité [61]. Les effets de l'alkylation des protéines ne sont généralement visibles qu'avec des concentrations importantes d'ypérite [62].

L'ypérite a un impact sur les enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases, les catalases, les glutathion peroxydases et les glutathion-S-transférases [63]. Les superoxydes dismutases ont une activité réduite dans les leucocytes, les plaquettes, la rate et le cerveau car l'ypérite se lie à ces enzymes. La catalase est inhibée dans les érythrocytes, les leucocytes et la rate. Les glutathion peroxydases ont une activité en baisse dans les leucocytes, la rate et le foie [64]. Ces diminutions entraînent un stress oxydant [65].

D'autres composés comme les composants du cytosquelette sont modifiés après une exposition à l'ypérite. Les kératines sont alkylés [66]. Il peut même y avoir des pontages entre les filaments des kératines [67], donc la morphologie de la cellule est modifiée [68]. Ces modifications ont été observées par Mol *et al.* chez des kératinocytes humains [69].

2.3.4. Toxicité aiguë

Les organes les plus affectés par l'ypérite sont les yeux, la peau et les poumons, c'est-à-dire ceux en contact direct avec le toxique (*Figure 12*). Une des caractéristiques majeures d'une exposition à l'ypérite est la période de latence avant l'apparition des premiers symptômes. Cette période asymptomatique dépend de la quantité d'ypérite absorbée, du temps d'exposition, des conditions environnementales (température, humidité) et de la voie d'exposition (peau, œil, inhalation ou ingestion) [70]. Par exemple, une température élevée avec beaucoup d'humidité, sur une peau fine, induira de plus graves lésions avec un temps de latence réduit pour une quantité donnée d'ypérite. On ne peut négliger la variabilité inter-individu, certains seront plus sensibles que d'autres pour une même dose de toxique. Kehe *et al.* précisent que plus la dose d'ypérite absorbée est élevée plus le temps de latence asymptomatique est court [71]. Ainsi, le temps de latence est inversement proportionnel à la dose d'ypérite. Cet effet a été observé lors d'intoxications récentes au Moyen-Orient [72].

La dose létale pour un humain est de 200 mg si l'ypérite est ingéré et de 3 g si c'est une exposition cutanée. Une exposition à une très grande quantité d'ypérite entraîne des convulsions suivie d'une mort rapide [73]. Mais la plupart des décès induits par l'ypérite ont lieu dans les semaines suivant l'intoxication suite à des complications des lésions pulmonaires [10].

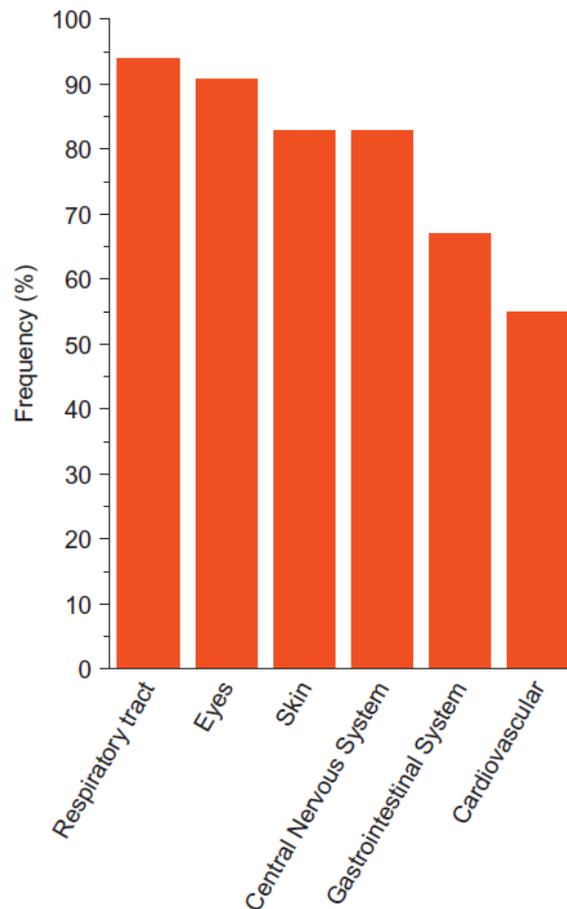


Figure 12 : Pourcentage des organes les plus touchés quelques jours après une exposition à l'ypérite déterminé par suivi de 233 intoxiqués iraniens lors de la guerre Iraq-Iran [74].

Le **Tableau 6** détaille les symptômes qui surviennent après une exposition à l'ypérite, et les traitements appropriés. La prise en charge de patients intoxiqués par de l'ypérite lors des derniers conflits a permis d'étudier en détail les symptômes d'une telle intoxication [14, 15, 71, 72, 75]. Aujourd'hui, il n'existe toujours pas d'antidote spécifique à l'ypérite donc les traitements donnés aux victimes sont seulement symptomatiques. Ils ont pour seuls objectifs de soulager les démangeaisons, les douleurs, les troubles et les infections [75].

Organes	Toxicité aiguë	Traitements
Les yeux	<p>Faible intoxication en 4 à 12 heures :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Irritation conjonctivale • Photophobie • Douleurs oculaires croissantes • Larmoiement intense • Vision floue <p>Forte intoxication en 3 à 6 heures :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Blépharospasme • Douleurs très vives • Hémorragie conjonctivale • Larmoiement purulent • Œdème puis vésications palpébrales • Ulcérations cornéennes • Cécité possible si contact d'ypérite liquide avec l'œil 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aucun pansement occlusif ne doit être placé, avant le lavage des yeux ➤ Lavage prolongé des yeux ➤ Éviter l'adhérence des paupières ➤ Port de lunettes noires pour lutter contre la photophobie. ➤ Orienter vers l'ophtalmologiste
Les poumons	<p>Faible intoxication en 12 h ou plus :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Signes d'irritation (rhinite, pharyngite, laryngite, toux sèche pénible) avec congestion non spécifique des voies aériennes supérieures • Trachéo-bronchite avec expectoration <p>Forte intoxication entre 4 et 8 h :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Œdème extensif entraînant dyspnée et dysphonie • Nécrose épithéliale des muqueuses bronchiques avec obstruction mécanique • Signes d'atélectasies et de bronchopneumopathie avec expectoration <p>Formes les plus graves qui apparaissent dans les 1ers jours :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Œdème pulmonaire • Insuffisance respiratoire aiguë 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Oxygénothérapie ➤ Aérosol β2 mimétique ➤ Kinésithérapie respiratoire. ➤ Antibiothérapie curative ➤ Intubation et ventilation contrôlée en pression positive
La peau	<p>Entre 2 h et 12 h :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Érythème douloureux • Prurit • Œdème sous-cutané <p>Entre 12 h et 48 h :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vésicules (risque de surinfection élevé) <p>Cicatrisation très lente (plusieurs semaines ou mois)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Décontamination ➤ Le refroidissement des lésions ➤ Antalgiques/analgésiques (Ex : morphine, buprénorphine) ➤ Désinfection des brûlures selon les protocoles appropriés pour les brûlés ➤ Mise à plat des vésicules les plus grosses risquant d'éclater ➤ Traitement des zones nécrosées ➤ Pansement à la pommade ➤ Comme pour les brûlures, le traitement général
Système digestif <i>Par ingestion ou intoxication très sévère</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Nausées, vomissements • Douleurs abdominales • Diarrhée sanglante 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antibiothérapie
Système sanguin	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperleucocytose transitoire, • À partir du 5ème jour : leucopénie - parfois thrombopénie • Anémie moins fréquente 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antibiothérapie
Systémique	<ul style="list-style-type: none"> • Asthénie • Fièvre • Atteinte neuromusculaire • Troubles psychologiques 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antibiothérapie

Tableau 6 : Signes cliniques attendus suite à une exposition à l'ypérite d'après l'ANSM. Les temps indiquent les heures suivant l'intoxication.

2.3.4.1. Les yeux

Les premiers signes cliniques d'une intoxication à l'ypérite sont au niveau oculaire c'est la partie la plus sensible à l'ypérite [61]. Les premiers effets seront observables environ 1h après une légère contamination avec les paupières qui deviennent rouges et enflées. Une conjonctivite de gravité variable apparaît dont l'intensité est croissante jusqu'à 48h. Entre 4h et 12h, les victimes ont la sensation d'avoir du sable dans les yeux, des larmoiements, de la photophobie [76]. Une dose élevée d'ypérite produit de graves lésions 1h à 3h après l'exposition.



Figure 13 : Lésions au niveau de l'œil cinq jours après une exposition à l'ypérite (de [77]).

2.3.4.2. La peau

Les lésions au niveau de la peau sont des érythèmes, des nécroses et des cloques qui se percent facilement. Une pigmentation anormale est souvent observée après une exposition à l'ypérite. L'évolution des brûlures à l'ypérite se fait généralement de la façon suivante :

- a) Des érythèmes : les rougeurs sont très marquées, des œdèmes peuvent se former, des démangeaisons peuvent être intenses. La peau peut prendre des teintes foncées jusqu'à devenir noire à certains endroits.
- b) Des cloques : à la suite des érythèmes de nombreuses petites vésicules apparaissent qui ensemble peuvent s'unir pour former de larges cloques. Elles ne sont pas douloureuse *per se* mais sont particulièrement gênantes. Elles sont remplies d'une sérosité ambrée dont la pression rend les ampoules proéminentes. Celles présentes

dans les endroits de flexion (coude, genou...) contraignent les mouvements. Les cloques de l'ypérite sont fragiles et se percent facilement (*Figure 14*).

- c) Les profondes brûlures entraînent la perte totale de l'épiderme particulièrement dans les zones humides et où l'épiderme est fin. La régénération de ces tissus est longue, elle peut prendre plusieurs semaines voire plusieurs mois.



Figure 14 : Vésicules dans le dos d'une personne intoxiquée à l'ypérite, 18h après l'exposition (de [14]).

2.3.4.3. Les voies respiratoires

Lors d'une exposition à un aérosol d'ypérite, les poumons sont aussi touchés entraînant rhinite, laryngite, nécrose des muqueuses du système respiratoire et bronchopneumonie. Après une période de latence de 4h à 8h en moyenne, l'ypérite irrite et congestionne les muqueuses du nez et de la gorge, la trachée et les bronches. Ainsi les premiers symptômes sont : sensation de brûlure, rhinorrhée, enrouement. Il y a des tous sèches avec expectorations. L'évolution des symptômes respiratoires aboutit à des insuffisances respiratoires telles que la bronchite chronique, à l'emphysème, à l'œdème pulmonaire. Les voies respiratoires inférieures s'infectent facilement pour donner des bronchopneumonies après 48h environ.

Dans les cas les plus graves, il peut y avoir une embolie pulmonaire pouvant causer la mort. Cette complication a souvent lieu la deuxième semaine après l'exposition [74].

2.3.4.4. Le système gastro-intestinal

L'ingestion de nourriture et d'eau contaminées engendrent les symptômes suivant : nausée, vomissement, douleur, diarrhée. L'individu est réticent à la nourriture.

2.3.4.5. Le système sanguin

De fortes doses d'ypérite induisent des effets toxiques sur la moelle osseuse, les cellules sanguines et la myélosuppression [78]. Dans les premiers jours, la leucocytose est observée, ensuite, le nombre de globule blanc commence à diminuer à partir du 3^{ème} ou 4^{ème} jour après l'exposition. Le taux minimum de globule blanc est généralement atteint autour du 9^{ème} jour. Cette leucopénie est suivie d'une diminution du nombre de mégacaryocyte (cellule géante responsable de la production des plaquettes sanguines).

2.3.4.6. Action systémique

Une intoxication à l'ypérite engendre maux de tête, perturbations du système digestif, anorexie, douleurs, leucopénie, anémie [72]. Lors d'une intoxication sévère, le système nerveux central peut être affecté, entraînant des convulsions.

La majorité des intoxiqués survivent car l'ypérite est peu létale. La guérison des blessures aiguës peut prendre entre quelques semaines et plusieurs mois. Les dommages des voies respiratoires sont les plus persistants.

2.3.5. Toxicité retardée et chronique

Dans les effets à long terme de l'ypérite, il faut distinguer la toxicité retardée de la toxicité chronique. La toxicité retardée concerne les effets qui peuvent se développer des mois voire

des années après un seul contact avec le toxique. C'est particulièrement observé lors d'un conflit armé, où les militaires et les civils n'ont été intoxiqués qu'une seule fois à une dose qui peut être importante. La toxicité chronique regroupe l'ensemble des effets délétères sur un organisme vivant suite à une exposition ou à une administration répétée d'un toxique à des doses multiples non létales. C'est le cas des ouvriers dans les usines qui produisaient des armes chimiques. Après une intoxication à l'ypérite, une détérioration de la santé physique et psychologique a été rapportée dans de nombreux cas. Les effets sur le long terme de l'ypérite peuvent se diviser en quatre groupes : les troubles psychologiques, les effets locaux, les cancers, des désordres du système de reproduction.

2.3.5.1. Les troubles psychologiques

Une intoxication à l'ypérite est un facteur de stress important qui cause des troubles de stress post-traumatique (TSPT). Ces effets retardés ont été observés chez des vétérans iraniens dont 65% ont des signes de dépression et d'anxiété suite à une intoxication à l'ypérite [79]. Il peut y avoir des dépressions chroniques, perte de libido et des anxiétés. Les intoxiqués ressentent beaucoup de fatigue et ont un sommeil perturbé [80].

2.3.5.2. Les effets locaux dus aux lésions :

- Au niveau oculaire : perte partielle ou totale de la vue, des déformations de la cornée, des conjonctivites [81-83].
- Au niveau pulmonaire : des maladies pulmonaires chroniques [84], sténose bronchique, toux, asthme, bronchites chroniques, fibrose pulmonaire, bronchiectasie [85]. Après la guerre Iraq-Iran, l'expression « mustard lung » englobe l'ensemble des conséquences de l'ypérite sur les poumons, c'est devenue une maladie à part entière [86]. Pour 95% des intoxiqués, il y a des conséquences pulmonaires sur le long terme.
- Au niveau cutané : cicatrices, hyperpigmentation (*Figure 15*) ou hypopigmentation [87], peau sèche, éruptions cutanées, atrophie, hypertrophie, angiomes. La plupart de ces lésions se situe au niveau (ordre de fréquence décroissant) des appareils génitaux, du dos, du thorax, de l'abdomen, des jambes, des bras, de la tête et du cou [74].



Figure 15 : Hyperpigmentation chez un vétéran iranien exposé à l'ypérite (photo de [70]).

2.3.5.3. Les cancers

L'ypérite est un agent mutagène et cancérigène. Une étude sur les soldats américains de la première guerre mondiale montre que ceux exposés à l'ypérite, ont proportionnellement développé plus de cancers des poumons que les autres. De même, l'ypérite a causé le développement de nombreux cancers des voies respiratoires chez des ouvriers d'une usine au Japon [88, 89]. Après la guerre Iraq-Iran, il y a eu une baisse significative de l'âge moyen d'apparition du cancer des poumons parmi les victimes de l'ypérite par rapport à l'âge moyen dans la population générale [90]. Le centre international de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'ypérite comme un carcinogène de groupe 1 (carcinogène certain) [91].

2.3.5.4. Le système de reproduction

L'ypérite induit des désordres au sein du système de reproduction : baisse de la production des hormones, cellules des testicules endommagées, baisse de la qualité du sperme, baisse de la fertilité [92].

2.3.5.5. Qualité de vie

De façon générale, pour des intoxiqués à l'ypérite, la qualité de la vie est détériorée. Notamment, les problèmes psychologiques et les maladies chroniques pulmonaires limitent leur vie de famille, la vie sociale, leur capacité professionnelle [80].

2.4. Le CEES : un analogue de l'ypérite

Le CEES (sulfure de 2-chloroéthyl éthyle), un analogue de l'ypérite, est largement présent dans la littérature s'intéressant aux effets de l'ypérite (*Tableau 3*). Ces principales propriétés physico-chimiques sont résumées dans le *Tableau 4*. Bien qu'il soit également CMR, le CEES n'est pas soumis aux mêmes contraintes légales que l'ypérite. Il est interdit de posséder et d'utiliser l'ypérite même dans le cadre de la recherche sans des autorisations particulières. A *contrario*, le CEES peut être acheté et manipulé dans les laboratoires sans contraintes particulières. C'est la raison pour laquelle il est souvent employé pour mimer les effets de l'ypérite. Sa dose létale médiane (LD50) est environ 100 plus élevée que celle de l'ypérite. Sa moindre toxicité est principalement expliquée par la présence d'un seul chlore. Le CEES est en effet monofonctionnel, c'est pour cela qu'il est souvent appelé « demi gaz moutarde ». Ainsi, il ne peut pas faire de bi-adduit, de bi-conjugué ou de pontage [93]. Cependant, comme l'ypérite, en milieu physiologique, il forme des ions très électrophiles après élimination du chlore (*Figure 16*). Comme le CEES donne les mêmes intermédiaires réactionnels que l'ypérite, il alkyle aussi de nombreuses biomolécules. Cette réactivité similaire explique les mécanismes d'action du CEES sur le métabolisme sont presque identiques à ceux de l'ypérite avec des nuances de gravité.

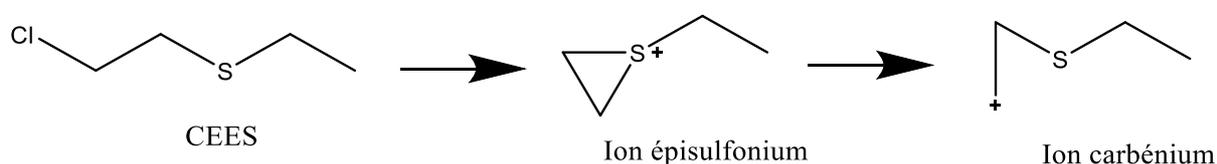


Figure 16 : Représentation des ions formés par le CEES en milieu physiologique.

Le CEES, comme l'ypérite, induit un stress oxydant au niveau cellulaire [94, 95]. Il engendre des dommages à l'ADN par alkylation de bases [96]. Des brûlures similaires à celles de l'ypérite sont observées [97].

3. Les biomarqueurs à l'ypérite

3.1. Notion de biomarqueur en toxicologie

De manière générale, un biomarqueur peut être défini comme un indicateur ou un signe d'un changement au sein d'un système biologique au niveau physiologique, pathologique, biochimique, cellulaire, moléculaire en réponse à un xénobiotique. Les Instituts nationaux de la santé (« National Institutes of Health, NIH ») définissent les biomarqueurs comme « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur d'un processus biologique normal ou une réponse à un agent thérapeutique ». Il reflète l'interaction entre un risque (chimique, biologique ou physique) et un système biologique.

Le domaine des biomarqueurs a évolué lors des dernières décennies en suivant les développements des sciences biomédicales et analytiques. Il s'adresse au besoin de détecter rapidement une réponse biologique suite à une exposition à des produits chimiques, des médicaments et des mélanges d'agents. Leur rôle est également de pouvoir prédire les conséquences sur la santé telles que des maladies et les cancers.

3.2. Spécificité des biomarqueurs à des agents chimiques

Les conséquences d'une exposition chimique dépendent de la santé et de l'environnement de l'individu, des propriétés et de l'état du produit chimique et des circonstances de l'exposition. Elle peut être sans aucun effet, avoir des conséquences à court terme et/ou à long terme ou entraîner la mort de l'individu. Il existe trois classes de biomarqueurs (*Figure 17*) :

- 1) **Le biomarqueur d'exposition** : un xénobiotique, ou ses métabolites primaires ou la réponse à une interaction entre l'agent et une molécule ou une cellule-cible, mesurée dans un compartiment de l'organisme. Le niveau de ce biomarqueur reflète normalement le niveau de l'exposition.
- 2) **Le biomarqueur d'effet** : altération au niveau biochimique, physiologique, comportementale ou autre, mesurable dans un organisme, qui, selon son ampleur, peut être reconnue comme étant associée à une dégradation confirmée ou possible de l'état de santé ou à une maladie.

- 3) **Le biomarqueur de susceptibilité** : indicateur de la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre l'exposition à un xénobiotique spécifique.

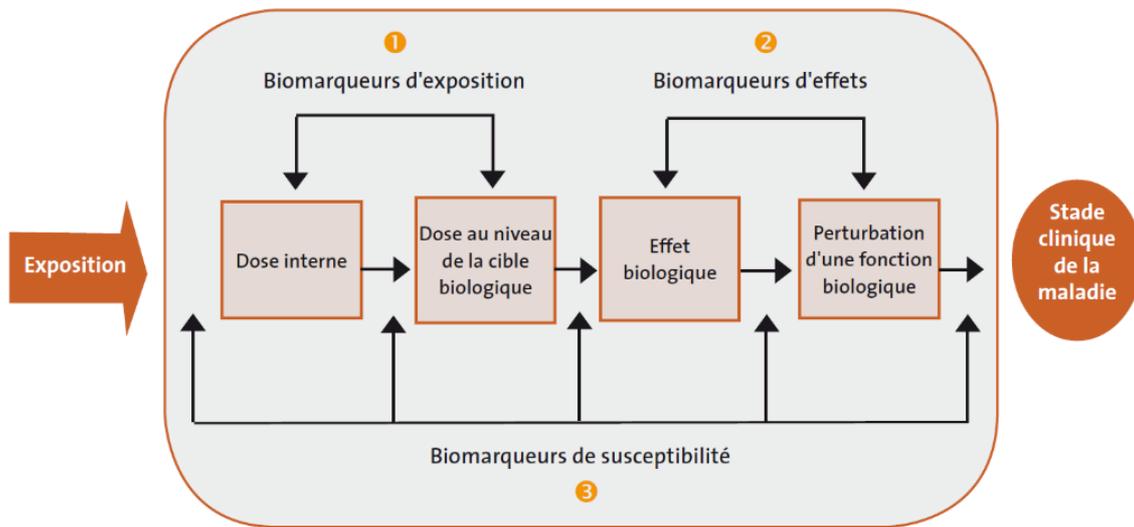


Figure 17 : Représentation schématique des différents types de biomarqueur suite à une exposition.

Le taux de biomarqueurs, en fonction de sa nature, peut refléter la cinétique d'un dommage et fournir des informations sur les mécanismes moléculaires liés à la toxicité. Ces biomarqueurs sont utiles pour définir un diagnostic, un pronostic et un traitement juste. En toxicologie, les biomarqueurs d'exposition tels que les métabolites doivent avoir les propriétés suivantes : biologiquement pertinent, facilement et rapidement analysable par une méthode spécifique, précise, avec une limite de détection basse, validée. De façon plus concrète, Dr. Maria Christina Fossi, dans les années 1990, suggère que le biomarqueur idéal doit être mesurable dans des échantillons biologiques facilement prélevés de façon non invasive, lié à une exposition de l'organisme, directement en lien avec les mécanismes d'action du contaminant, très sensible nécessitant de faibles quantités d'échantillon réalisé par une méthode d'analyse facile, peu coûteuse et valable pour différentes espèces.

3.3. Spécificité des biomarqueurs en sécurité NRBC

Le contexte de risque d'attaques chimiques est particulier. Lors d'un attentat utilisant des armes chimiques, un grand nombre de personnes seraient simultanément intoxiquées dans une

situation de panique et de stress. Un autre scénario est l'utilisation d'armes chimiques dans des régions reculées comme cela peut être le cas en opération extérieure, la prise en charge des blessés et l'analyse des fluides biologiques n'est pas forcément immédiate. Les principales propriétés des biomarqueurs, pour être une preuve d'exposition sans équivoque, sont d'après [98] :

- La persistance : Le biomarqueur doit être détectable au moins jusqu'à une semaine après l'exposition, le plus longtemps étant le mieux. En effet, lors d'un conflit, la prise en charge des victimes n'est pas toujours immédiate. Ce besoin de persistance exclut, en général, l'utilisation de l'agent chimique libre comme biomarqueur mais plutôt celle de ces métabolites ou de produits de dégradation.
- La stabilité chimique : le biomarqueur doit être stable dans différentes matrices biologiques comme le sang, le plasma, les urines sans subir, par exemple, d'hydrolyse ou d'oxydation.
- La spécificité : dans des matrices biologiques complexes, comme les urines, il est nécessaire que le biomarqueur soit un marqueur non équivoque reflétant une exposition à un toxique de guerre. Les échantillons prélevés sur une personne non exposée ne doivent en aucun cas contenir le biomarqueur.

Les biomarqueurs d'exposition sont efficaces pour mesurer une dose interne. Ils permettent parfois d'établir un lien entre les expositions et les effets indésirables sur la santé par connaissance des cibles biologiques du toxique. Dans ce contexte, ils sont plus informatifs que des marqueurs environnementaux (air ou nourriture) [2].

Un diagnostic rapide et efficace, au moyen d'une détection de biomarqueurs spécifiques, joue un rôle primordial dans la gestion de la menace des armes chimiques. L'analyse de différents échantillons biologiques, tels que l'urine et le sang, peut apporter une preuve de contamination aux armes chimiques. Hormis l'analyse des agents et de leurs métabolites, les adduits formés par les agents chimiques avec les biomolécules telles que les protéines et l'ADN sont d'un intérêt croissant pour une identification rétrospective grâce à leur persistance plus longue au sein de l'organisme [99]. En effet, leur détection peut servir en science médico-légale dans le cas d'attaques terroristes.

3.4. Les biomarqueurs d'exposition à l'ypérite

Des autopsies faites sur des soldats iraniens ayant succombé à une exposition cutanée à l'ypérite montrent la présence de marqueurs de l'ypérite dans de nombreux organes tels que le cerveau, les reins, le foie, les poumons [100]. Ainsi l'ypérite se diffuse dans tout l'organisme donnant la possibilité d'utiliser diverses familles de biomarqueurs.

3.4.1. L'ypérite libre

Rapidement après l'intoxication, il n'y a presque plus d'ypérite libre dans l'organisme mais de très nombreux dérivés et produits de dégradation. Cependant, des tissus adipeux accumulent l'ypérite puisqu'elle est très lipophile. De l'ypérite libre a ainsi été retrouvée dans des tissus humains *post-mortem* 7 jours après l'intoxication. Les tissus en question sont : les poumons, les reins, le cerveau et des tissus adipeux. Lors de cette étude, de l'ypérite a été aussi retrouvée dans les cheveux [101]. Il a été observé une accumulation d'ypérite dans les tissus adipeux des animaux tout particulièrement dans la graisse péri-rénale, la graisse épидидymale, la graisse sous-cutanée et la graisse brune [102]. Après intoxication de rats par voie intraveineuse (10 mg/kg) ou cutanée (de 1 à 10 mg/kg), l'ypérite libre est détectable dans le sang pendant 1h30 environ.

3.4.2. Les produits de dégradation

L'ypérite a deux centres électrophiles non-sélectifs qui peuvent conduire à la formation de nombreux produits de dégradation. Ceux-ci sont souvent excrétés dans les urines. Certains ont été identifiés chez le rat [98]. Les produits majoritaires de dégradation sont issus de l'hydrolyse des chlores et de l'oxydation du soufre. Le thiodiglycol (2,2'-thiodiéthanol, TDG), le thiodiglycol sulfoxyde (TDGO), et le bis-β-chloroéthyle sulfoxyde (SMO) sont ainsi essentiellement formés (*Figure 18*) [103].

Après intoxication de rats et de cochons d'Inde, le marqueur TDG a été détecté dans les urines. La concentration en TDG augmente dans les urines pendant la première semaine suivant l'exposition [104]. Des quantités élevées de TDG ont été également détectées dans des urines de personnes intoxiquées par des vapeurs et des aérosols de l'ypérite [105].

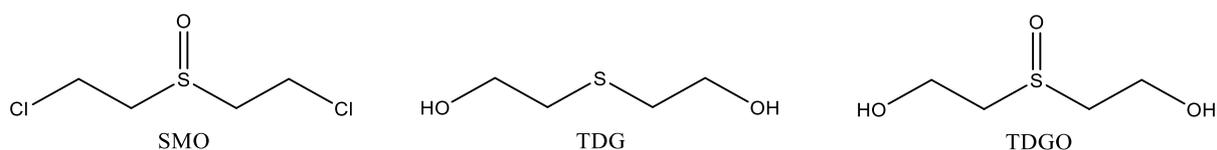


Figure 18 : Formules topologiques des produits majoritaires de l'ypérite après hydrolyse et oxydation du soufre.

Deux personnes ont été contaminées par de l'ypérite en détruisant un ancien obus de la première guerre mondiale. L'analyse de leur urine a permis de valider la nature de l'agent chimique. Des doses élevées de TDG et TDGO ont été retrouvées dans les urines collectées rapidement après l'exposition. Comme il a été montré que TDGO est plus abondant dans les urines que TDG, des traitements d'échantillons des urines ont été développés afin de réduire TDGO en TDG pour ne mesurer à la fin que la fraction de TDG [106]. Cependant, leur quantité diminue rapidement jusqu'à ne plus être spécifique *i.e.* la quantité détectée n'est plus différentiable de la quantité présente chez des personnes non intoxiquées [32]. Ainsi, ces produits de dégradation ne peuvent pas être considérés comme spécifiques. En effet, chez des personnes non contaminées, il est possible de détecter des traces de TDG et TDGO car ils sont des composés endogènes présents *in vivo* à la concentration de 0-1 ng/mL and 2-8 ng/mL, respectivement [107]. Seules les concentrations de TDG et TDGO statistiquement différentes des concentrations endogènes peuvent être la preuve d'une intoxication à l'ypérite. C'est pourquoi, la CIAC demande de spécifier dans les rapports d'analyse d'urine : « TDG can be contained in the urine of people unexposed to sulfur mustard. »

Lors d'une récente étude, il a été montré que TDG n'est pas un produit de dégradation spécifique à l'ypérite pour une autre raison. D'autres molécules similaires à l'ypérite telles que l'agent T et l'agent Q (voir **Tableau 2**) aussi appelées « gaz moutarde à longues chaînes » peuvent former du thiodiglicol lors de leur dégradation par différentes formulations commerciales utilisées lors de la décontamination d'agents chimiques (**Figure 19**). Ces résultats remettent en question le rôle de TDG comme marqueur d'exposition spécifique à l'ypérite [108]. Ces métabolites ne sont donc pas une preuve sans équivoque d'une exposition à l'ypérite.

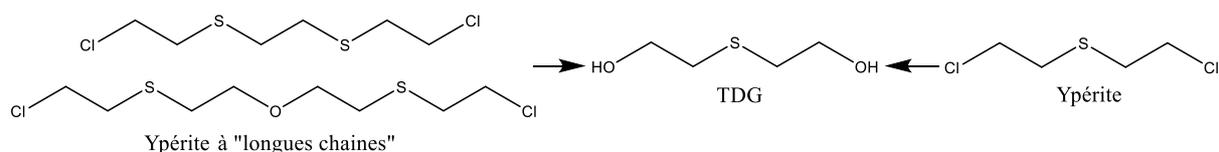


Figure 19 : Le produit de dégradation TDG peut venir soit de l'ypérite soit de gaz moutarde à longues chaînes d'après [108].

3.4.3. Les dérivés du glutathion et de la voie des β -lyases

Parmi les intermédiaires de la voie de métabolisation des acides mercapturiques (détails p. 78), un électrophile se trouve converti en conjugué de la cystéine Cys-X. Ce dernier peut être pris en charge dans une déviation du processus de métabolisation appelée « thiomethyl shunt ». Cys-X est converti en un dérivé mercaptan (X-SH) lors d'une réaction catalysée par la cystéine S-conjugate β -lyase. Le mercaptan est ensuite méthylé ou subit une glucuronon-conjugaison avant d'être excrété [109].

Les métabolites de l'ypérite générés par les β -lyases sont 1,1'-sulphonylbis[2-S(N-acétylcystéinyl)éthane] (SBSNAE), 1,1'-sulphonylbis[2-méthylsulphiny]éthane] (SBMSE), 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] (SBMTE) et 1-méthylsulphiny-2-[2-(méthylthio)éthylsulphonyl] éthane (MSMTESE) (**Figure 20**). Ces métabolites sont des composés moyennement polaires et persistants. Ils sont exogènes *i.e.* ils ne sont produits dans l'organisme que dans le cas d'une intoxication à l'ypérite. Ils sont donc spécifiques.

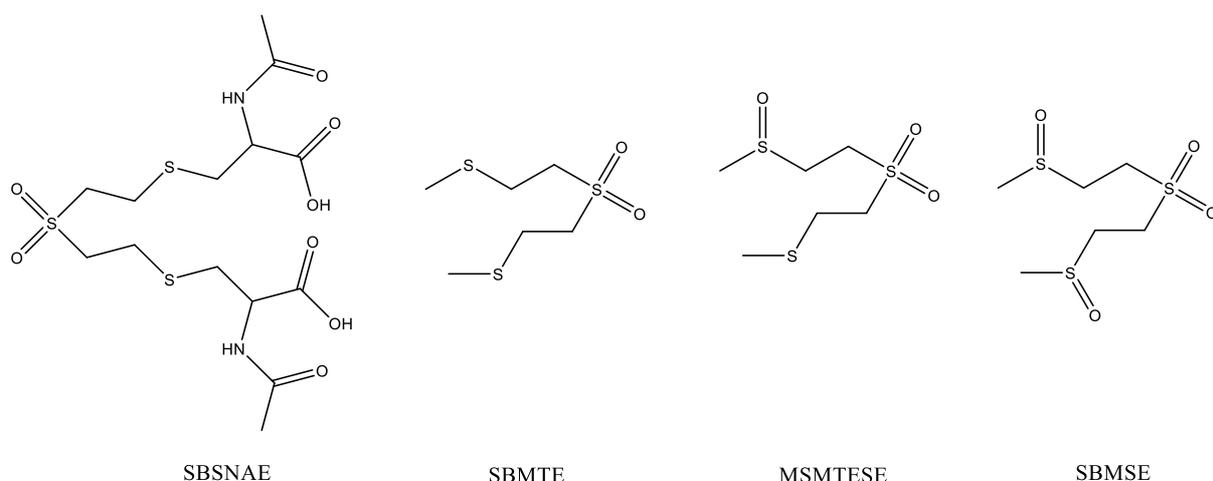


Figure 20 : Formules topologiques des métabolites de l'ypérite induits par les β -lyases.

Après une exposition de rats à l'ypérite à une dose de 5 mg/kg, il a été possible de détecter le marqueur SBSNAE jusqu'à 14 jours après l'exposition [110]. Dans les urines de deux personnes accidentellement contaminées à l'ypérite, SBSNAE a été détecté à de très faibles concentrations, proches de la limite de détection [111]. Après une exposition à l'ypérite avec un ancien obus de la première guerre mondiale, l'urine des deux personnes a été analysée. Des taux élevés de métabolites β -lyases ont été retrouvés. Il a été possible de les détecter jusqu'à 11 jours après exposition chez le patient 1 et 7 jours pour l'un des patients malgré de faibles expositions [32]. A la suite d'une attaque à l'ypérite au Moyen-Orient, des analyses d'urines ont été faites. Elles ont été collectées chez des patients entre 30 h et 48h après l'exposition. SBMTE a été détecté chez certains des patients mais pas chez tous. La limite de détection de la méthode utilisée est de 1 ng/mL [72].

3.4.4. Les adduits à l'ADN

Les agents alkylants comme l'ypérite peuvent réagir avec l'ADN pour donner des produits d'alkylation nommés adduits (*Figure 21*). Cette réaction peut avoir lieu au niveau des atomes nucléophiles de l'ADN comme l'azote, l'oxygène. Au vue, de la structure de l'ADN, de nombreux sites sont sensibles aux alkylations (*Figure 10*). Cependant, certains le sont beaucoup plus, donnant des adduits majoritaires.

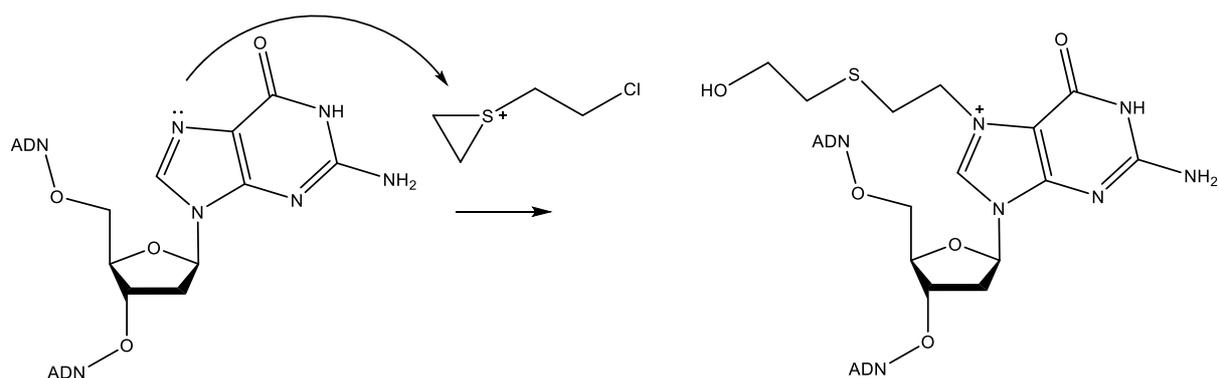


Figure 21 : Schéma réactionnel de l'ypérite sous forme de l'ion épisulfonium avec la position N7 de la guanine.

Les sites principaux d'alkylation de l'ADN par l'ypérite sont les positions N7 et O6 de la guanine et à la position N3 de l'adénine (*Figure 22*). Il y a aussi formation de pontage entre les

positions N7 de guanine adjacents. Il existe des différences significatives entre les quantités des différents adduits formés. Le monoadduit de la guanine en position N7, N7-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (HETE-N7Gua ou noté N7Gua-Yp), est l'adduit majoritaire (61%) [112, 113] car c'est la position la plus réactive [114]. Le bi-adduit, N7Gua-ETE-N7Gua (N7Gua-Yp-N7Gua), sulfure de bis[2-(guanine-7-yl)éthyl], est environ deux fois moins présent (17%) [115]. Quant au monoadduit à la position N3 de l'adénine, N3-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-adénine (HETE-N3Ade ou noté N3Ade-Yp), il est faiblement formé (16%) [113, 116], les adduits à la position O6 de la guanine, O6-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (HETE-O6Gua ou noté O6Gua-Yp), ne représente environ que 0,1% des adduits formés [117-119].

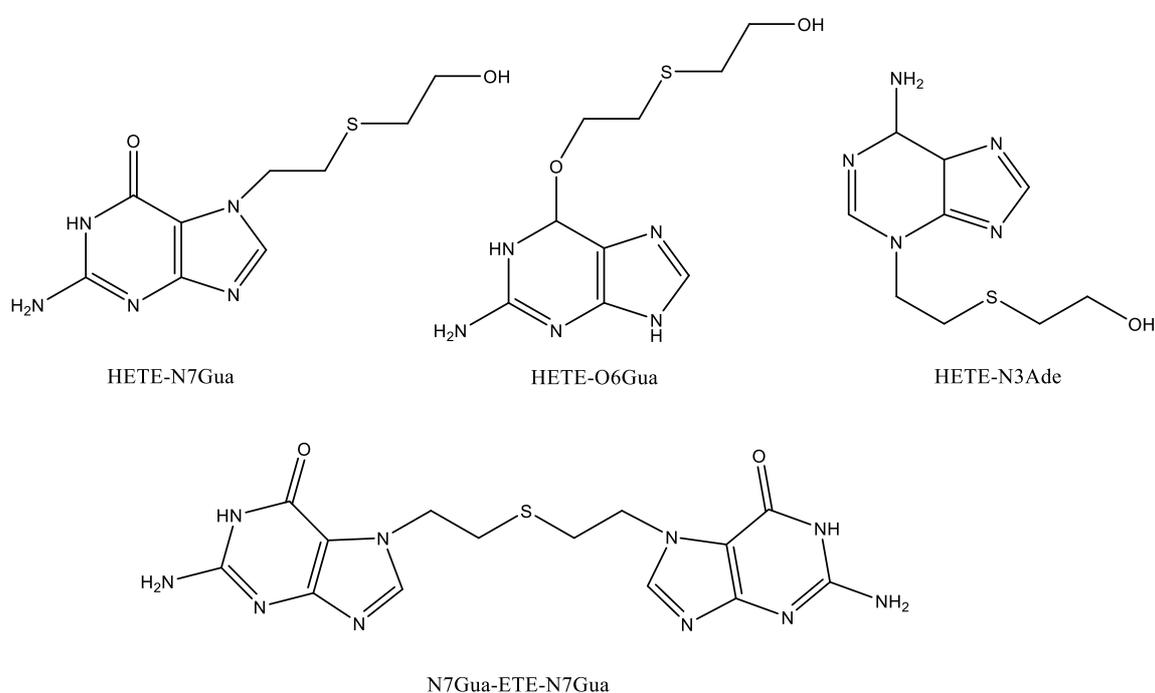


Figure 22 : Formules topologiques des principaux adduits de l'ADN formés par l'ypérite.

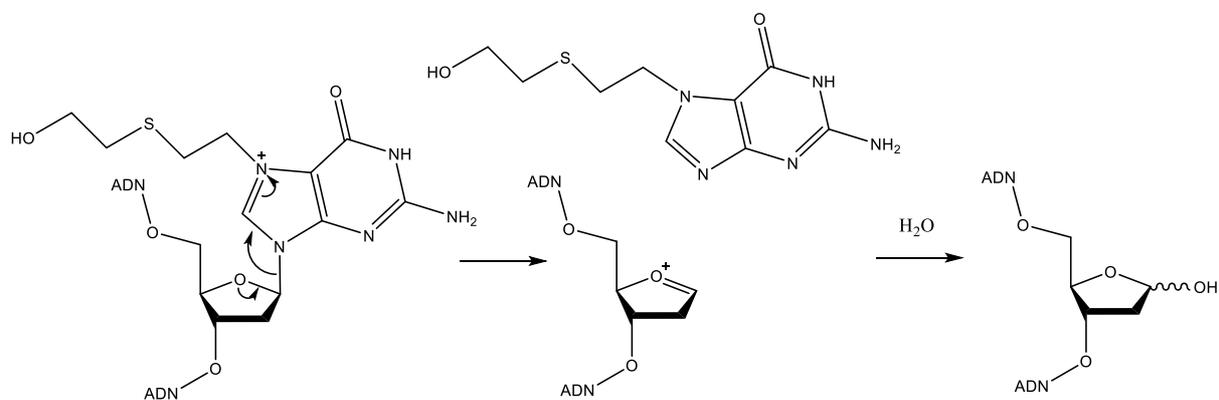


Figure 23 : Représentations de la dépurination de la N7dGuo-Yp dans l'ADN, avec libération de N7Gua-Yp et formation d'un site abasique.

Comparativement à d'autres adduits de l'ADN, les adduits à la position N7 de la guanine ne sont chimiquement pas stables, ils se dépurinent (**Figure 23**), c'est-à-dire que la liaison sucre-base se rompt. Ils ont un temps de demi-vie dans l'ADN double hélice de 2h à 150h. Cette instabilité vient de la présence d'une charge positive sur le cycle de la guanine pour les produits d'alkylation en N7. Plus l'alkylant est gros, plus le temps de demi-vie de la dépurination est faible. Ainsi le temps de demi vie de N7Gua-Yp à 37°C et pH 7, est de 52 h dans la double hélice et de 8h pour le nucléoside isolé [59].

Il a été aussi observé que l'ypérite forme des liaisons covalentes simultanément avec la base d'ADN Guanine à la position N7 et le glutathion pour donner l'adduit : S-[2-(N7-guanyl)-éthylthioéthyl]-glutathion (N7Gua-Yp-GSH). Après traitement de souris SKH-1 par de l'ypérite, cet adduit a été détecté dans la peau, le cerveau, les poumons, les reins et la rate. Il a été persistant jusqu'à deux semaines dans la peau, le cerveau et les poumons [120].

Après une exposition cutanée de rats, il a été possible de retrouver des adduits (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade, N7Gua-ETE-N7Gua) dans de nombreux organes tels que les poumons, les reins, le pancréas, la rate, la moelle et le cerveau. De plus, les quantités d'adduits sont dose-dépendantes [121]. Les adduits à l'ADN, spécifiques à l'ypérite, ont déjà été utilisés comme marqueurs d'exposition lors de la guerre entre l'Iraq et l'Iran [122]. Ils sont persistants, et dans un cas ont été détectés jusqu'à 21 jours après l'exposition [30]. Dans un autre cas, les adduits ont été détectés jusqu'à 29 jours après intoxication à l'ypérite, dont le plus abondants étant HETE-N7Gua [123].

3.4.5. Les adduits aux protéines

Les produits de l'alkylation des protéines sont stables *in vivo*. L'ypérite réagit notamment sur les résidus cystéines des protéines. Les protéines habituellement suivies sont l'albumine et l'hémoglobine puisqu'elles se situent dans le sang qui est une matrice facilement accessible. Ces adduits peuvent être de bons marqueurs d'exposition grâce à leur persistance qui est équivalente à celle de la protéine alkylée. Ainsi, le temps de vie d'un adduit à l'hémoglobine est de 2 ou 3 mois, temps de vie de l'hémoglobine non modifiée.

L'albumine est une protéine (66kDa), représentant environ 60 % des protéines plasmatiques, avec 35 résidus cystéine dont 34 sont impliqués dans des ponts disulfures à l'origine de sa structure tertiaire. Sa composition présente un seul groupement thiol, ne formant pas de pont disulfure, au niveau de sa cystéine-34 responsable de plus de 80 % de l'activité thiol plasmatique [124]. Ce site est ainsi identifié comme une cible plasmatique favorisée pour de nombreux électrophiles [125, 126]. Dès 1999, Noort *et al.* ont développé une méthode pour évaluer les adduits de l'ypérite issus de l'alkylation de la cystéine 34 de l'albumine [127].

Actuellement, la CIAC accepte deux biomarqueurs issus de la conjugaison de l'ypérite à l'albumine sur la cystéine 34 (Alb-Yp) pour confirmer une exposition à cet agent. Le premier est le fragment tripeptidique cystéine-proline-phénylalanine (Yp-CPF) dont la cystéine a réagi avec l'ypérite. Il est obtenu par une digestion utilisant la protéinase K. Le second est le fragment dipeptidique cystéine-proline (Yp-CP) où l'ypérite a réagi sur la cystéine ; il est obtenu par une digestion utilisant la pronase [128].

Le sang a une concentration d'hémoglobine environ de 140 mg/mL qui peut être facilement isolée. Après traitement de cette protéine avec de l'ypérite marquée par un ³⁵S, plusieurs sites d'alkylation ont été observés : des cystéines, des acides aspartiques, des lysines, des tryptophanes, six différents résidus histidines, trois résidus acide glutamique, et les valines en position N-terminale [129]. Bien que les conjugués à la position N-terminale de la valine ne représentent que 1 à 2% des sites alkylés par l'ypérite, ce sont de bons biomarqueurs (noté Val-Yp) puisqu'ils peuvent être facilement extraits de l'hémoglobine par la digestion d'Edman.

La persistance des conjugués à l'albumine et à l'hémoglobine a été étudiée *in vivo*. Des rats ont été exposés par intraveineuse avec une dose de 0,3 mg/kg. Le conjugué à l'albumine a été détecté jusqu'à 7 jours après l'exposition alors que le conjugué à l'hémoglobine (position N-terminale de la valine) a été présent jusqu'à 28 jours. La décroissance de la concentration de ces conjugués correspond bien avec les temps de demi-vie respectifs de l'albumine et des globules rouges chez le rat [130]. Les adduits protéiques peuvent être détectés jusqu'à 90 jours dans différentes matrices biologiques humaines [131, 132].

Les conjugués à l'albumine et à l'hémoglobine, spécifiques à l'ypérite, ont déjà été utilisés comme marqueurs d'exposition lors de la guerre entre l'Iraq et l'Iran [122, 127]. Lors de la destruction d'une arme contenant de l'ypérite, trois employés se sont contaminés. Leur

exposition a été vérifiée en analysant leur urine et leur plasma par GC-MS et LC-MS/MS. Le conjugué à l'albumine a été détecté jusqu'à 29 jours après la contamination [75].

Afin de réaliser une analyse de conjugués aux protéines, il est souvent nécessaire de passer par une étape de digestion enzymatique pour fractionner les longues chaînes protéiques en chaînes peptidiques plus courtes. Elle se fait généralement à l'aide de protéinase. La limite est le temps nécessaire pour préparer un échantillon. Dans une méthode développée récemment pour analyser le conjugué albumine-ypérite, l'étape de digestion dure 2h, il s'en suit une étape de dérivation [133]. Dans d'autres méthode, l'étape de digestion de 2h est suivie par une extraction sur phase solide avant injection [128, 134].

Young et Capacio ont développé une méthode analytique pour détecter l'ypérite libre venant des conjugués aux protéines du plasma. Pour cela, ils font réagir l'acide chlorhydrique avec les conjugués aux protéines ce qui permet de rompre la liaison entre l'ypérite et la protéine. Cette conversion libère l'ypérite analysée par la suite [135].

3.5. Glutathion et détoxification des xénobiotiques

Le glutathion (GSH) est un tripeptide qui existe dans l'organisme humain et ayant une concentration intracellulaire entre 3-4 mM [136]. Il est surtout présent dans le cytosol (85-90%), le reste se trouvant dans la mitochondrie, la matrice nucléaire et les peroxysomes [137]. Il joue un rôle important dans les systèmes d'oxydo-réductions, de protection contre le stress oxydant et détoxification d'agents électrophiles exogènes ou endogènes. Cette biomolécule comporte trois groupes fonctionnels qui peuvent réagir avec d'autres molécules *i.e.* des fonctions thiol, amine et carboxylique. La conjugaison au GSH est un processus majeur de la phase II de la métabolisation cellulaire des agents électrophiles. Deux études chez les rats montrent que la conjugaison de l'ypérite avec le glutathion est plus importante que l'hydrolyse de celui-ci [26, 27]. Cependant, malgré la formation du conjugué GSH-ypérite, la quantité de GSH ne réduit pas de façon conséquente la concentration en ypérite *in vitro*, surtout pour des doses importantes d'ypérite [138].

3.5.1. Les voies de métabolisation

La métabolisation d'un composé exogène se fait généralement en deux étapes principales. La première, la phase I, consiste à activer le composé par des réactions d'oxydo-réductions, d'hydrolyse, d'ajout de groupes nucléophiles. La seconde, la phase II, sert à rendre le composé plus hydrophile afin de pouvoir être éliminé par les urines. Cela est possible grâce à la conjugaison des métabolites avec des molécules endogènes telles que l'acide glucuronique et le glutathion. De plus, cette conjugaison diminue l'activité toxique du composé exogène. C'est pourquoi on parle aussi de processus de détoxification. Les étapes de métabolisation sont catalysées par des enzymes. De nombreux xénobiotiques sont transformés par des processus qui n'impliquent pas des réactions de phase I. C'est tout particulièrement le cas de la conjugaison au glutathion de xénobiotique qui met en jeu une enzyme de phase II [139].

La voie de métabolisation de l'acide mercapturique, « mercapturate pathway » en anglais, permet de détoxifier de nombreux électrophiles endogènes et exogènes (comme les médicaments) (*Figure 24*). Elle commence par la conjugaison de l'électrophile sur le glutathion. Cette première étape peut se faire spontanément [140], mais la réaction est généralement accélérée par l'action des enzymes GSH S-transférases (GSTs). Cette famille d'enzyme comporte surtout des enzymes dans le cytoplasme mais aussi quelques enzymes membranaires. Les GSTs sont répandues dans de nombreux tissus. Bien que les conjugués au glutathion soient souvent engendrés dans le foie, ils peuvent tout de même être formés dans tout l'organisme. Les conjugués sont issus de la formation d'une liaison thioéther entre le GSH et le xénobiotique. Cette étape a pour rôle de bloquer les fonctions réactives du toxique. Au vue de la forte concentration en GSH au sein des cellules, celui-ci est généralement en large excès par rapport à l'électrophile. Le résultat, *i.e.* le conjugué GSH-X, est sécrété en dehors de la cellule grâce à la pompe GS-X et différents transporteurs ATP (*Figure 25*) [141]. Il est excrété dans la bile [142] et/ou métabolisé par la suite de la métabolisation des acides mercapturiques.

Le conjugué au GSH est ensuite métabolisé par GGT (γ -glutamyltransférase), surtout une enzyme hépatique transmembranaire présente sur les surfaces extracellulaires des membranes des canaux et des glandes [143] d'où sa présence dans le plasma [144]. Elle est surtout exprimée à la surface des tubes proximaux rénaux. Toute l'activité enzymatique se situe dans la portion extracellulaire de l'enzyme [145]. Cette enzyme catalyse la rupture de la liaison γ -glutamyl. Le résultat est donc le conjugué CysGly-X. Ce conjugué est lui-même converti en un conjugué à la cystéine, Cys-X par différentes peptidases.

In fine, ce conjugué est N-acétylé pour donner le conjugué à la N-acétyl-cystéine, NAC-X. On parle aussi de conjugué à l'acide mercapturique. Par souci de simplification, le conjugué à la NAC sera appelé l'acide mercapturique et non le conjugué à l'acide mercapturique dans la suite du texte. Ce composé est généralement plus hydrophile que le xénobiotique, il est rapidement excrété par les urines. Cette conversion en NAC-X est catalysée par les N-acétyltransférases (NAT), notamment la NAT8. L'activité de ces enzymes est la plus importante dans les reins [146], plus précisément au niveau du tube contourné proximal [147]. Au niveau cellulaire, l'enzyme est localisée sur la surface cytosolique du réticulum endoplasmique [148].

Si le conjugué Cys-X contient un bon nucléofuge, il peut subir une réaction de β -élimination. Cette étape est catalysée par des β -lyases [149] ce qui a été déjà évoquée.

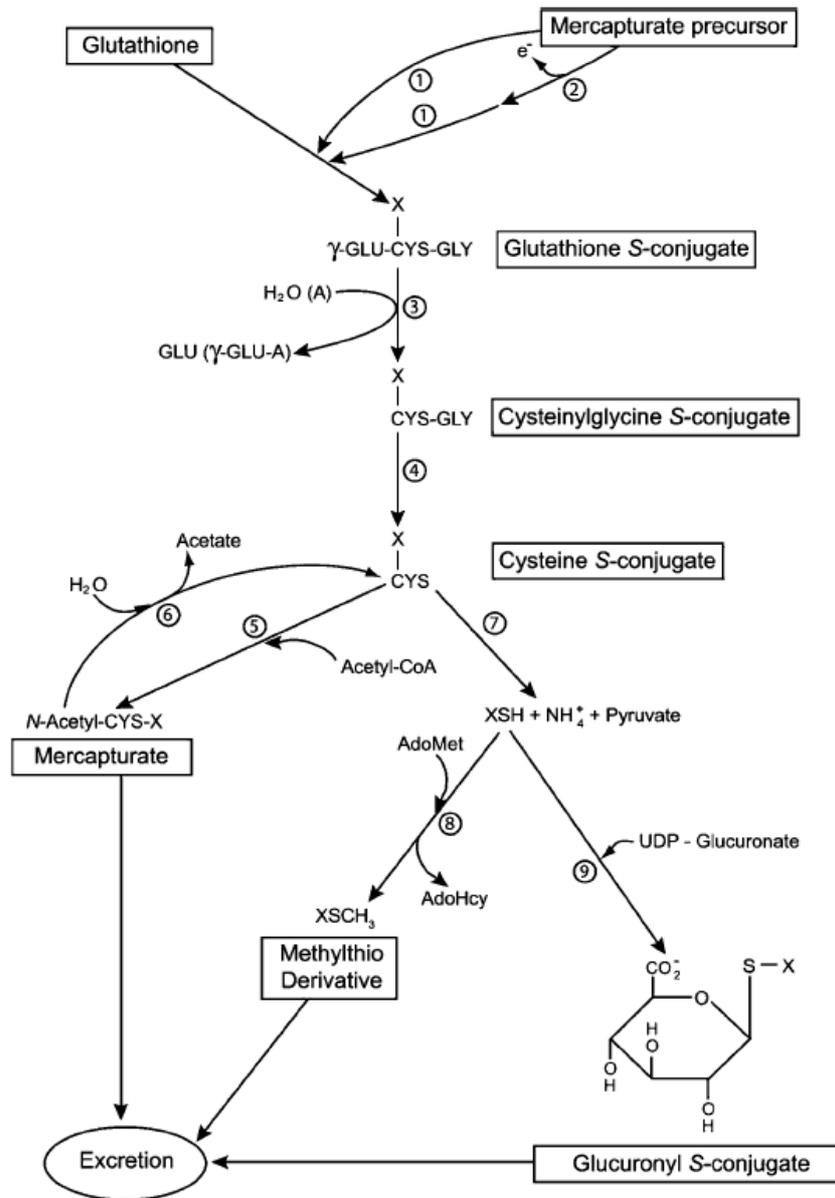


Figure 24 : Voie de métabolisation de l'acide mercapturique et de ses réactions secondaires avec les β -lyases. La voie de métabolisation regroupe les réactions de 1 à 5. Les réactions 7,8 et 9 correspondent aux réactions d'élimination du conjugué Cys-X appelées « thiomethyl shunt ». Les numéros correspondent aux différentes réactions de métabolisation catalysées par leur enzyme particulière : 1 glutathion S-transférases, 2 oxydases, 3 γ -glutamyltransférase, 4 dipeptidases, 5 N-acétyltransférases, 6 aminoacylases, 7 cystéine S-conjugué β -lyases, 8 thiométhyltransférase, 9 UDP-glucuronosyltransférases. Schéma issu de [149].

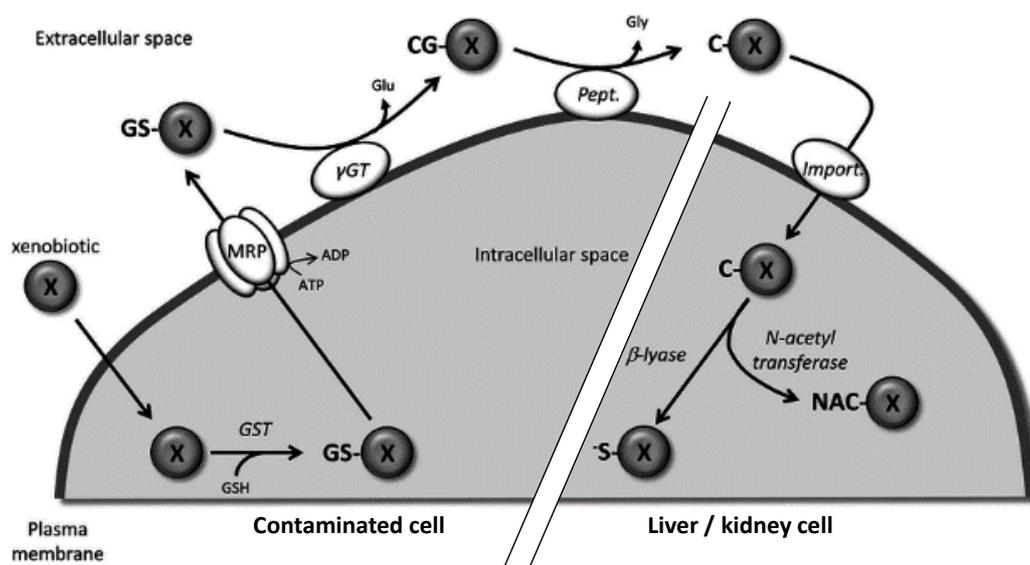


Figure 25 : Représentation schématique des réactions intracellulaires et extracellulaires de la voie de métabolisation des acides mercapturiques tirée de [150]. X : xénobiotique ; GS-X : X conjugué au glutathion ; CG-X : X conjugué au cystéinylglycyl ; C-X : X conjugué à la cystéine ; NAC-X : X conjugué à la N-acétylcystéine ; -S-X : thiol réactif de X ; GST : glutathion-S-transférase ; γ GT : γ -glutamyltransférase ; Pept. : peptidase ; Import. : peptide transporteur ou cystéine transporteur.

3.5.2. L'utilisation des métabolites comme biomarqueurs

Le conjugué à l'acide mercapturique (ou conjugué à la NAC) peut être utilisé comme biomarqueur [31]. Des revues listent des méthodes LC-MS pour l'analyse d'acide mercapturique servant comme biomarqueur à une exposition à des agents exogènes. [1, 151].

L'isoprène, classé par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 2B (cancérogènes possible pour l'homme), est présent dans les fumées de tabac. Il a été identifié qu'un biomarqueur majeur de ce toxique dans les urines est N-acetyl-S-(4-hydroxy-2-méthyl-2-buten-1-yl)-L-cystéine, un acide mercapturique. Il a été analysé par un système UHPLC-MS/MS [152]. La crotonaldéhyde est un puissant irritant qui affecte les yeux, la peau et les voies respiratoires. Trois isomères de l'acide mercapturique de ce composé ont été analysés par HPLC dans des urines humaines [153]. Par LC-MS/MS, l'acide mercapturique et d'autres dérivés de l'acrylonitrile ont été aussi quantifiés dans les urines humaines [154]. De même pour le styrène, un des composés les plus importants dans l'industrie chimique, une

méthode analytique a été développée pour quantifier les acides mercapturiques de ses métabolites qui sont considérés comme des biomarqueurs d'exposition [155].

Lors d'expériences *in vitro*, il a été montré que l'ypérite est bien métabolisé *via* sa conjugaison au glutathion. Cette conjugaison peut aussi se faire chimiquement par réaction directe de l'ypérite avec le glutathion dans les conditions physiologiques. Les auteurs, parmi les premiers à avoir détecté et identifié ce conjugué à l'ypérite, suggèrent son étude comme potentiel biomarqueur [156]. Cependant, à ma connaissance, le conjugué au GSH, le conjugué à la cystéine et à la NAC de cette voie de métabolisation n'ont pas été utilisés comme biomarqueurs d'exposition à l'ypérite.

3.6. Tableaux de synthèse des méthodes de détection des biomarqueurs

De nombreuses méthodes analytiques ont déjà été développées pour parvenir à identifier l'ypérite, ses produits de dégradation ou ses métabolites comme preuve de contamination. Les laboratoires accrédités par l'Organisation d'Interdiction des Armes Chimiques vérifient rétrospectivement une intoxication à l'ypérite en recherchant soit dans le sang soit dans les urines : l'ypérite, des métabolites β - lyase, des adduits à l'ADN, des adduits à l'hémoglobine [4].

Ypérite libre							
Métabolites	Matrice	Modèle	Préparation	Analyse	Intervalle de temps	Gamme	Référence
Ypérite libre	Sang	<i>In vivo</i> (rat)	Précipitation Dérivation	HPLC-MS/MS	6h	1 µg/L	Qi 2016 [157]
Ypérite libre	Plasma	<i>In vitro</i>	Centrifugation Incubation	GC-MS/MS	/	0,120–100 ng/mL	Young 2020 [135]

Conjugués aux protéines							
Métabolites	Matrice	Modèle	Préparation	Analyse	Intervalle de temps	Gamme	Référence
Alb-Yp	Plasma	<i>In vitro</i>	Digestion	UHPLC-MS/MS	/	0,500 ng/mL (LOD)	Chen 2019 [133]
Val-Yp	Plasma	<i>In vitro</i>	Dégradation SPE Dérivation	GC-MS	/	3 nmol/L	Nie 2011 [134]
Alb-Yp Val-Yp	Plasma	<i>In vivo</i> (rat)	Digestion Dégradation	HPLC-MS/MS	7 jours 28 jours		Noort 2008 [130]
Alb-Yp	Plasma	<i>In vitro</i> (humain)	Digestion SPE	UHPLC-MS/MS	/	1,06 ng/mL	Pantazides [128]
Alb-Yp	Plasma	<i>In vitro</i> (humain)	Digestion	UHPLC-MS/MS	/	1 ng/mL	Liu 2015 [158]
Alb-Yp	Plasma	<i>In vivo</i> (humain)	Ultrafiltration Digestion	µLC-MS/MS	29 jours		Steinritz 2016 [75]

Produits de dégradation & d'oxydation							
Métabolites	Matrice	Modèle	Préparation	Analyse	Intervalle de temps	Gamme	Référence
TDG TDGO	Urine	Humain	Précipitation	GC-MS	3 à 7 jours	30-3000 ng/mL	Xu 2014 [131]
SMO	Sang	Humain	Précipitation	UHPLC-MS/MS	0 jours	30-3000 ng/mL	Xu 2014 [131]
TDG	Urine	<i>In vitro</i> (humain)	SPE	UHPLC-MS/MS	/	0,50 ng/mL	Liu 2017 [159]
SMO TDG TDGO	Plasma	<i>In vivo</i> (rat)	Précipitation	UHPLC-MS/MS	12h	0,05 µg/L 5 µg/L 0,5 µg/L	Li 2013 [160]
TDG TDGO	Urine	<i>In vivo</i> (rat)	SPE	GC-MS	7 jours	1 ng/mL	Koryagina 2018 [161]
SMO SMO2	Sang	<i>In vivo</i> (rat)	Précipitation Dérivation	HPLC-MS/MS	12h	1 µg/L 0,2 µg/L	Qi 2016 [157]
TDG	Urine	<i>In vivo</i> (Humain)	SPE Dérivation	GC-MS	/	0,2 ng/mL	Riches 2007 [162]

Adduits à l'ADN							
Métabolites	Matrice	Modèle	Préparation	Analyse	Intervalle de temps	Gamme (LOQ)	Référence
N7Gua-Yp N3Ade-Yp N7Gua-Yp-N7Gua	ADN (isolé sang)	<i>In vitro</i>	Extraction Digestion	HPLC-MS/MS	/	0,1-4 pmol	Batal 2013 [116]
N7Gua-Yp N3Ade-Yp N7Gua-Yp-N7Gua	ADN (divers)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Extraction Lyse acide	UHPLC-MS/MS	48h 12h	0,02-20 µg/L 0,10-20 µg/L 0,05-20 µg/L	Wang 2015 [113]
N7Gua-Yp O6Gua-Yp N7Gua-Yp-N7Gua N3Ade-Yp	Urine	<i>In vivo</i> (humain)	SPE	UHPLC-MS/MS	32 jours	0,005 - 0,01 ng/mL	Xu 2014 [131]
N7Gua-Yp O6Gua-Yp N7Gua-Yp-N7Gua N3Ade-Yp	ADN (Sang)	<i>In vivo</i> (humain)	Extraction Digestion	UHPLC-MS/MS	14 jours	0,005 - 0,01 ng/mL	Xu 2014 [131]
N7Gua-Yp O6Gua-Yp N7Gua-Yp-N7Gua N3Ade-Yp	ADN (divers)	<i>In vivo</i> (rat)	Extraction Digestion	UHPLC-MS/MS	14 jours	0,24 fmol 0,24 fmol 0,39 fmol 1,26 fmol	Yue 2015 [121]
N7Gua-Yp O6Gua-Yp N7Gua-Yp-N7Gua N3Ade-Yp	Urine	<i>In vivo</i> (lapin)	SPE	UHPLC-MS/MS	29 jours	5 ng/L 5 ng/L 10 ng/L 5 ng/L	Zhang 2014 [123]

N7Gua-Yp N7Gua-Yp-N7Gua N3Ade-Yp	ADN (cellules sang)	<i>In vitro</i>	Extraction Digestion	UHPLC-MS/MS	6 jours	1 fmol 0,5 fmol	Zubel 2019 [163]
N7Gua-CEES N3Ade-CEES	ADN (cellules sang)	<i>In vitro</i>	Extraction Digestion	UHPLC-MS/MS	6 jours	0,25 fmol 0,25 fmol	Zubel 2019 [163]
N7Gua-Yp N7Gua-Yp-N7Gua N3Ade-Yp	ADN (peau)	<i>In vivo</i> (souris)	Extraction Digestion	HPLC-MS/MS	21 jours	0,1 pmol	Batal 2013 [30]
N7Gua-Yp	Urine	<i>In vivo</i> (rats)	SPE	UHPLC-MS/MS	/	10 ng/mL	Orlova 2020 [164]

Les dérivés de la voie des β -lyases et conjugués aux glutathion

Métabolites	Matrice	Modèle	Préparation	Analyse	Intervalle de temps	Gamme	Référence
SBSNAE SBMTE MSMTESE SBMSE	Urine	Humain	Dérivation SPE	GC-MS/MS UHPLC-MS/MS	/		Xu 2014 [131]
SBSNAE SBMTE MSMTESE SBMSE	Sang	Humain	Précipitation	UHPLC-MS/MS	/	30-3000 ng/mL 6,8 nmol	Xu 2014 [131]
SBSNAE MSMTESE SBMSE	Urine	<i>In vitro</i> (humain)	SPE	UHPLC-MS/MS	/	0,50 ng/mL 0,05 ng/mL 0,05 ng/mL	Liu 2017 [159]

SBMTE MSMTESE SBMSE SBSNAE	Plasma	<i>In vivo</i> Rat	Précipitation	UHPLC-MS/MS	8h 48h 48h 8h	0,05 µg/L 0,01 µg/L 0,01 µg/L 1 µg/L	Li 2013 [160]
SBSNAE	Plasma	<i>In vitro</i> (humain)	Précipitation	HPLC-MS/MS	/	30 ng/mL (LOD)	Rodin 2011 [110]
SBSNAE	Urine	<i>In vivo</i> (rat)	SPE	HPLC-MS/MS	22 jours	0,05 ng/mL (LOD)	Rodin 2011 [110]
MSMTESE SBMSE	Urine	<i>In vivo</i> (humain)	SPE	HPLC-MS/MS	5 jours		Steinritz 2016 [75]
SBSNAE	Urine	<i>In vitro</i> (humain)	SPE	HPLC-MS/MS	/	1 ng/mL	Read 2004 [111]
SBSNAE	Urine	<i>In vivo</i> (rats)	SPE	HPLC-MS/MS	/	10 ng/mL	Orlova 2020 [164]
MSMTESE SBMSE	Urine	<i>In vitro</i> (humain)	Dilution	UHPLC-MS/MS	/	1 ng/mL	Rodin 2015 [165]

Tableau 7 : Liste non exhaustive de méthodes analytiques déjà développées pour quantifier des marqueurs de l'ypérite présentant leurs principales caractéristiques.

4. Le processus analytique pour les adduits et conjugués à l'ypérite dans les fluides biologiques

Cette revue de la littérature sur les biomarqueurs d'exposition de l'ypérite montre la performance des méthodes associant chromatographie et détection par spectrométrie de masse. C'est en particulier le cas du couplage LC-MS qui reçoit un nombre croissant d'applications. Comme pour toutes les méthodes, son application à des matrices biologiques est associée à une étape importante de préparation d'échantillons.

Partie intégrante d'une analyse, la préparation des échantillons est sans aucun doute l'étape la plus délicate du processus analytique. Des études ont montré que cette étape représente environ 60 % du temps de travail au sein d'un laboratoire d'analyse. C'est également l'étape qui engendre le plus d'erreurs entachant le résultat de l'analyse. Ainsi, une optimisation de la préparation d'échantillon permet de gagner en reproductibilité, en répétabilité. Elle influe également sur la limite de détection. Pour ce faire, la préparation des échantillons a pour objectif de purifier et de concentrer les analytes. Ils sont souvent présents en très faibles quantités dans des matrices complexes telles que les matrices biologiques. Le traitement d'échantillon fait appel à de nombreuses techniques dont les plus courantes en bioanalyse sont : la précipitation, la filtration, l'extraction liquide-liquide et l'extraction sur phase solide (SPE).

4.1. La préparation d'échantillon par Extraction sur Phase Solide (SPE)

L'extraction sur phase solide est une méthode au cours de laquelle des composés en solution ou en suspension dans une phase liquide sont séparés des autres éléments du mélange par adsorption sélective sur une phase solide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Cette méthode a gagné en popularité à la fin des années 1970 avec la commercialisation de cartouches pré-remplies et non remplies par les utilisateurs eux-mêmes. Les méthodes développées pour l'analyse de biomarqueurs spécifiques à l'ypérite comportent très souvent une étape de SPE. Cette étape est utilisée pour diverses matrices telles que le sang et les urines. Quelques méthodes pour la détection d'adduits à l'ADN de l'ypérite libre incluant une étape de SPE ont été développées [102, 123, 164]. Il existe aussi des

protocoles de SPE pour les produits de dégradation [161, 162, 166] dans les fluides biologiques mais aussi dans l'eau pour des analyses environnementales [167]. La SPE est aussi majoritairement utilisée pour la quantification des dérivés de la voie des β -lyases et de conjugués au glutathion [75, 110, 111, 166]. Une autre méthode SPE a été mise au point pour détecter des métabolites de l'ypérite dans l'urine humaine. Ainsi, TGD, MSMTESE, SBMSE et SBSNAE sont purifiés et concentrés sur des cartouches SPE de charbon actif ; la majorité des interférents sont éliminés sans perte en analytes [168].

La SPE a pour objectif d'augmenter la durée de vie de la colonne analytique, d'améliorer la reproductibilité de l'analyse, de diminuer la limite de quantification en diminuant le bruit de fond, d'améliorer l'exactitude de l'analyse et d'augmenter la sélectivité et diminuer les effets matrices [169].

Cette dernière peut se faire de façon classique manuellement sur des colonnes de purification. Une approche plus moderne, basée sur un jeu de commutation de vannes au sein du système HPLC permet de réaliser la SPE en ligne. Cette technique en ligne est déjà utilisée pour des analyses environnementales [170].

4.1.1. Effets matrices

Toute technique d'analyse peut être sujette à des effets de matrice. Lors de l'utilisation d'un couplage LC-MS, l'évaluation de tels effets est indispensable. Ils se manifestent soit par une diminution soit par une augmentation du signal des composés dans la matrice par rapport aux composés dans le solvant. On parle d'effets matrice inhibiteurs ou stimulateurs. L'effet de matrice résulte de l'extraction de contaminants issus de la matrice et/ou de la co-élution d'autres composés avec les analytes d'intérêt. Ainsi, la matrice influe positivement ou négativement sur l'ionisation du composé. Dans le cas d'un effet inhibiteur, la limite de détection se trouve augmentée et la sensibilité diminuée.

1.1.1. Les différentes étapes de la SPE

La plupart des extractions SPE sont « rétentives » c'est-à-dire l'analyte est retenu par la phase stationnaire tandis que les contaminants ont moins d'interactions avec la colonne et en

sont éliminés (*Figure 26*). Par contre, dans le cas d'une extraction « non-rétentive », l'analyte n'a pas d'affinité avec la phase stationnaire mais les contaminants, eux, sont retenus sur la colonne. Pour résumer, l'analyte traverse la colonne sans être retenu, tandis que les contaminants y sont liés.

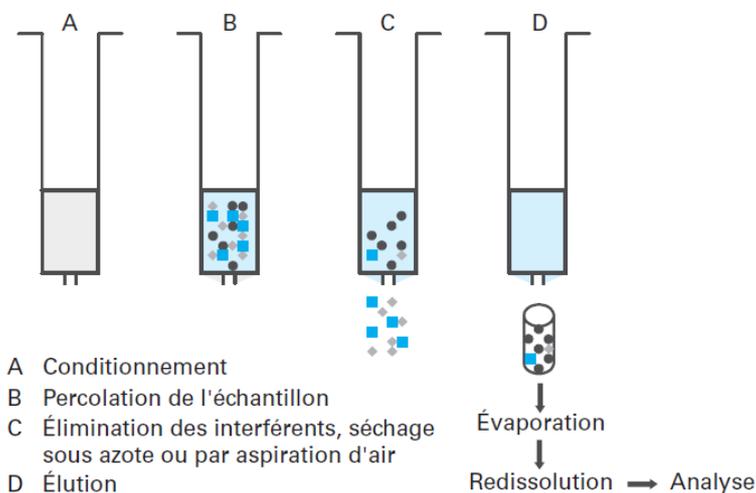


Figure 26 : Schématisation des différentes étapes de la SPE dans le cas d'une extraction « rétentives », figure issue de [171].

La colonne est d'abord conditionnée afin d'équilibrer et de mouiller la phase solide. L'échantillon est déposé sur la partie supérieure de la phase. Les impuretés sans affinité avec la phase ne sont pas retenues. Au contraire, les analytes d'intérêts ainsi que d'autres impuretés sont plus ou moins fortement retenus. Certaines impuretés ont moins d'affinité avec la phase que les analytes alors que d'autres ont plus d'affinité. Ces dernières resteront dans la cartouche SPE même après l'élué. Ensuite il y a l'étape de lavage. Cette étape a pour objectif d'éliminer les impuretés qui sont retenues sur la phase et de rincer les composants résiduels de l'échantillon non retenus encore présents après l'étape de dépôt. Le solvant de lavage idéal élimine toutes ces impuretés sans affecter la rétention des analytes. Le solvant de lavage doit ainsi avoir une force éluante suffisante pour entrainer le maximum de la matrice de l'échantillon sans entrainer les analytes. De plus, le solvant de lavage doit être miscible avec l'échantillon dilué ainsi qu'avec le solvant d'élué. Il est souvent préférable de sécher la colonne entre les étapes de lavage et d'élué. L'objectif de l'étape d'élué est de récupérer 100 % des analytes d'intérêt retenus par l'adsorbant. Le solvant d'élué doit avoir le

maximum d'interactions avec les analytes et le moins possible avec les impuretés qui peuvent dans certains cas rester adsorbés.

4.1.2. Les différentes phases en SPE

L'extraction liquide-solide est basée sur la distribution des composés entre la phase liquide (échantillon) et la phase solide (adsorbant). Les phases SPE sont généralement classées selon la nature de leur principal mécanisme d'interaction ou de rétention avec l'analyte. Les trois mécanismes d'extraction les plus fréquents en SPE sont la phase inverse, la phase normale et l'échange d'ions. Toutes les méthodes de SPE pour la détection de biomarqueurs de l'ypérite utilisent des phases inverses que ce soit pour les adduits à l'ADN, les dérivés des β -lyases, les produits de dégradation et pour les adduits aux protéines après digestion.

4.1.2.1. La phase inverse

La séparation sur phase inverse permet d'extraire des analytes moyennement polaires ou apolaires d'une matrice polaire ou moyennement polaire telle que les échantillons aqueux. La phase stationnaire est apolaire. Les analytes sont retenus sur la colonne par la force de dispersion de faible énergie de van der Waals *i.e.* il y a des interactions entre les chaînes hydrocarbonées qui se trouvent sur l'analyte et sur la phase stationnaire. Les groupes hydrophiles silanols de la silice ont été chimiquement modifiés par greffage de molécules des chaînes hydrocarbonées saturées, tels que C18 et C8, ou des cycles aromatiques tels que phényle (Ph) ou styrène-divinylbenzène (SDB). Les analytes retenus sur une phase inverse sont élués avec des solvants organiques comme le méthanol ou l'acétonitrile, des bases, des acides, et modificateurs organiques.

D'autres colonnes de SPE en phases inverses sont constituées de phases polymériques de qui permettent de travailler avec une gamme de pH plus large. Les silices greffées ont toujours un pourcentage de silanols résiduels qui engendrent des interactions secondaires qui peuvent retenir de façon irréversible des analytes. Les phases polymériques éliminent ce problème. De plus, ces phases ont des capacités de charge supérieures ce qui permet de retenir plus d'analytes avant saturation de la colonne et de travailler avec des cartouches plus petites pour

le même volume d'échantillon. Avec des cartouches ayant moins de phase, il est possible de travailler avec des volumes de lavage et d'élution plus petits.

Dans le cas des biomarqueurs de l'ypérite, les phases inverses utilisées sont variées : C18, C8 et polymérique notamment.

4.1.2.2. La phase normale

La séparation sur phase normale permet d'extraire des analytes polaires d'un échantillon organique non-polaire. La phase stationnaire est polaire. Les analytes sont retenus sur la colonne par des interactions de type liaison hydrogène, dipôle-dipôle entre les analytes et les phases normales telles que la silice, l'alumine et Florisil®. Les analytes sont élués à l'aide de concentrations relativement faibles de solvants organiques polaires comme le méthanol ou l'isopropanol dans des solvants organiques non polaires.

4.1.2.3. L'échange d'ions

La séparation avec une phase à échange d'ions permet d'extraire des analytes chargés d'échantillons à faible force ionique, aqueux ou organiques. Des surfaces chargées sont utilisées afin de retenir les analytes ayant une charge opposée. Par exemple, les analytes chargés positivement sont retenus sur des phases chargées négativement. À l'inverse, les analytes chargés négativement sont retenus sur des phases chargées positivement. Les mécanismes d'échange d'ions sont basés sur des interactions de Coulomb à haute énergie entre la surface de la phase et l'analyte. Pour être retenu, les composés doivent avoir la charge appropriée, ainsi la plupart des contaminants de la matrice sont simplement éliminés lors des étapes de dépôt et de lavage. Pour cette raison, la SPE par échange de cations est souvent choisie pour l'extraction de composés basiques comme certains médicaments dans les échantillons biologiques.

4.1.3. SPE en ligne

La SPE en ligne semble judicieuse pour réduire les temps de préparation d'échantillon et augmenter la cadence analytique. La tendance est à l'utilisation de méthodes automatisables à des fins stratégiques, économiques et pratiques. De telles méthodes ont commencé à être développées au début des années 1980 pour les fluides biologiques [172]. Pour la mise en place de cette méthode, il faut un instrument permettant d'avoir deux systèmes de chromatographie en parallèle.

Deux étapes sont nécessaires pour purifier un échantillon en ligne : son chargement sur la colonne SPE avec un temps de charge et de lavage, et l'élution des composés de la colonne SPE vers la colonne analytique, qui sont ensuite dirigés vers la source du spectromètre de masse (*Figure 27*). Cette préparation se fait au niveau du four de la colonne de la chaîne HPLC. Après une préparation au préalable de l'échantillon (ex : filtration, centrifugation), l'échantillon est injecté dans le système UHPLC-MS/MS. Il est tout d'abord poussé dans la colonne SPE par une première pompe (position LOAD). Après lavage de l'échantillon, les analytes sont concentrés en tête de colonne SPE. Le mode élution (position INJECT) est enclenché par permutation de la vanne. Dans cette configuration la colonne SPE est connectée à la colonne analytique. Les composés fixés au support SPE sont ainsi transférés en mode « BackFlush » (sens inverse du lavage) sur la colonne analytique par la phase mobile de la seconde pompe. Après quelques minutes d'analyses, la vanne d'injection commute à nouveau en position LOAD, pour laver et ensuite rééquilibrer la colonne SPE avec le solvant de lavage avant l'injection d'un nouvel échantillon.

Dans un tel système, de très nombreux paramètres sont à optimiser comme les débits, les solvants, les temps de percolation, la nature des phases des colonnes [173]. En effet, la colonne SPE doit avoir une affinité plus faible avec les analytes que la colonne analytique pour que les analytes soient refocalisés à l'entrée la colonne analytique. En effet, si les analytes ont trop d'affinité avec la colonne SPE, le solvant pour les transférer vers la colonne analytique ne sera pas adapté à cette colonne ce qui limitera la refocalisation ; les pics s'élargiront. Au contraire, si les analytes n'ont pas assez d'affinité avec la colonne SPE, il y a des risques de pertes et un lavage moins efficace.

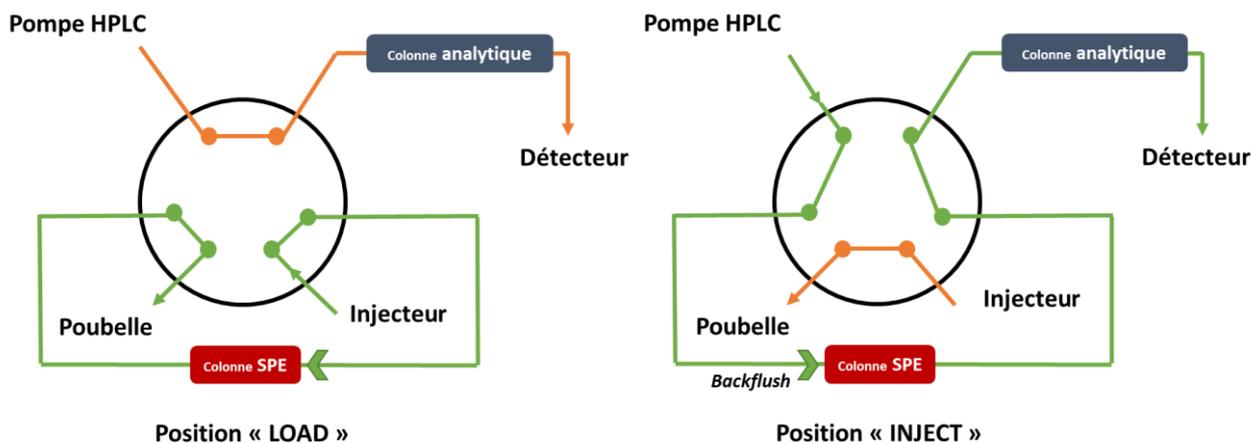


Figure 27 : Principe de le SPE en ligne dont la première étape est le chargement de l'échantillon dans la colonne SPE grâce à la position « LOAD », la seconde étape, après lavage de la colonne SPE, est le transfert des analytes vers la colonne analytique grâce à la position « INJECT ».

Cette préparation d'échantillons intégrée au système d'analyse a déjà été utilisée pour la détection de l'olanzapine, de la fluoxétine et son métabolite (la norfluoxétine), des antidépresseurs, dans le sang humain. L'analyse robuste et quantitative de ces composés se fait en 11 min en incluant la SPE [174].

4.2. La chromatographie liquide

Des méthodes utilisant la technique d'immuno-slot-blot (ISB) ont été mises au point afin de détecter des adduits de l'ADN de l'ypérite. Cette technique est très spécifique et sensible. L'une d'entre elles permet de détecter le mono-adduit à la guanine de l'ADN issue soit du sang soit de la peau [123]. Cependant, l'ensemble du processus analytique dure environ 36h [124].

Maintenant, les deux techniques majoritairement utilisées sont, pour l'analyse des biomarqueurs de l'ypérite : la chromatographie gazeuse (GC) et la chromatographie liquide (LC). La GC est presque seulement utilisée dans le cas des produits de dégradation [131, 161, 162]. La très grande majorité des méthodes utilisent la LC que se soit pour les adduits à l'ADN [30] ; les dérivés des β -lyases et des conjugués au glutathion [75, 110, 111] ; des adduits aux protéines ; les produits de dégradation [157].

La chromatographie liquide, technique d'analyse séparative permet de séparer des mélanges complexes par distribution de composés entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire et la phase mobile. La chromatographie liquide est désormais une technique devenue presque incontournable des laboratoires d'analyses.

4.2.1.1. Quelques principes théoriques

Les principes de la séparation des composés sur une colonne sont :

- les analytes se répartissent entre les deux phases jusqu'à l'établissement d'un équilibre. Cette partition dépend des propriétés de chaque analyte vis-à-vis des phases considérées.
- le renouvellement continu de la phase mobile, remet en cause l'équilibre et entraîne, par une succession d'autres équilibres, les analytes tout au long de la phase stationnaire.
- la séparation des différents analytes tient au fait que chaque molécule migre avec une vitesse qui lui est propre.

On obtient un tracé que l'on appelle chromatogramme où l'élution des composés du mélange correspond à une série de pics qui est utilisé en analyse qualitative (temps de rétention) et en analyse quantitative (aire des pics).

Lorsque l'on assimile une colonne de longueur L à une succession de N plateaux théoriques identiques, il est possible d'attribuer à tout plateau une dimension qui est une fraction de cette longueur. Cette longueur H est appelée Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique ou HEPT (*Équation 4*). Il est également classique de rendre compte de l'efficacité d'une colonne en indiquant le nombre de plateaux N . Plus HEPT est petite, meilleure est l'efficacité de la séparation.

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

Équation 4 : Relation entre HEPT et la longueur de la colonne et son nombre de plateaux théoriques. HEPT s'exprime généralement en mm.

La théorie cinétique de Giddings lie le nombre de plateaux d'une colonne ou plus exactement la HEPT (Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique) à la vitesse d'écoulement de la phase mobile et à différents facteurs dépendant [175]. Cette théorie cinétique est représentée par l'équation de Van Deemter :

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Équation 5 : Equation de Van Deemter. A exprime la diffusion turbulente due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile à travers la phase stationnaire. B/u rend compte de l'influence de la diffusion longitudinale, i.e. dans le sens d'écoulement de la phase mobile. C représente les inégalités de passage des molécules d'une phase à l'autre, il est encore appelé facteur de résistance aux transferts de masse. u est la vitesse linéaire de la phase mobile.

4.2.1.2. L'UHPLC

La tendance actuelle se dirige vers des systèmes UHPLC. Dans le contexte des biomarqueurs à l'ypérite, les dernières méthodes développées avec l'HPLC remontent à 2016. Depuis, dans l'ensemble des méthodes, l'UHPLC est utilisée pour les biomarqueurs à l'ypérite. L'utilisation de l'UHPLC permet notamment de réduire fortement la largeur des pics chromatographiques, et de diminuer les temps nécessaires à la séparation en gardant une bonne résolution. Une petite granulométrie au sein de la colonne permet des plateaux théoriques de hauteur inférieure donc une meilleure efficacité de séparation que dans les colonnes HPLC classiques. De plus, l'effet de l'augmentation du débit sur l'efficacité de séparation est moindre (*Figure 28*). L'utilisation de hauts débits avec l'UHPLC permet de limiter l'effet de dispersion qui peut être observé avec un système HPLC (terme B/u de *Équation 5*) et de réduire le temps d'analyse. Cependant, les colonnes UHPLC reposent sur des diamètres de particules relativement faibles (inférieur ou égale à 2 µm) qui génèrent une pression relativement élevée qui demande des instruments adaptés. Il sera alors important de maintenir la colonne à haute température (entre 30 et 50°C par exemple) pour limiter la pression et assurer des temps de rétention reproductibles d'une analyse à l'autre. Il est également important de s'assurer que l'échantillon injecté ne comporte pas de particules pour préserver les colonnes.

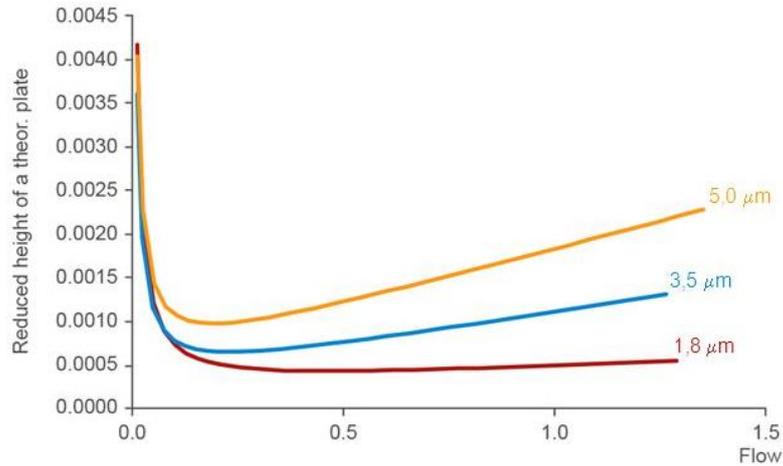


Figure 28 : Courbe de Van Deemter pour différentes granulométries de colonne. Plus celle-ci est faible, plus il est possible de travailler avec un débit élevé sans trop augmenter la hauteur de plateau théorique.

4.2.2. Couplage LC-MS

Le couplage de la LC avec la spectrométrie de masse (MS) est un outil intéressant car les composés peuvent être directement identifiés et quantifiés de façon sélective et spécifique, même dans le cas d'une préparation de l'échantillon simplifiée. Même si d'autres couplages (GC-MS, GC-IR...) sont présents dans les laboratoires, le couplage LC-MS s'impose comme un outil essentiel et incontournable dans de nombreux domaines (environnement, pharmacie, médecine, dépistages, protéomique). En effet, ce couplage offre de nombreuses applications comme par exemple :

- Quantification d'ultra traces en utilisant la sélectivité et la sensibilité de l'outil
- Identification et suivi de métabolites ou produits de dégradation dans des matrices complexes
- Caractérisation de la structure primaire de peptides ou protéines

4.3. Détection par spectrométrie de masse

4.3.1. Principe général

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet l'identification et la quantification de composés. Elle est basée sur la transformation des molécules en ions, à l'état gazeux, pour connaître leur masse moléculaire en mesurant leur rapport masse sur nombre de charges, noté m/z (m : masse du composé ; z : charge associée à son ion moléculaire). La spectrométrie de masse repose sur 3 étapes essentielles : l'ionisation, l'analyse (séparation des ions) et la détection (*Figure 29*). L'appareil est donc composé de 3 parties principales :

- **La source d'ion** où les ions sont produits en phase gazeuse à partir des états solides, liquides ou gazeux.
- **L'analyseur** où sont séparés les composés chargés, générés lors de l'ionisation, en fonction de leur rapport m/z .
- **Le détecteur** où le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse doit être détecté et transformé en un signal utilisable. C'est pourquoi le signal de chacun des composés y est intégré et amplifié, l'intensité mesurée, afin d'obtenir un spectre de masse après traitement du signal.

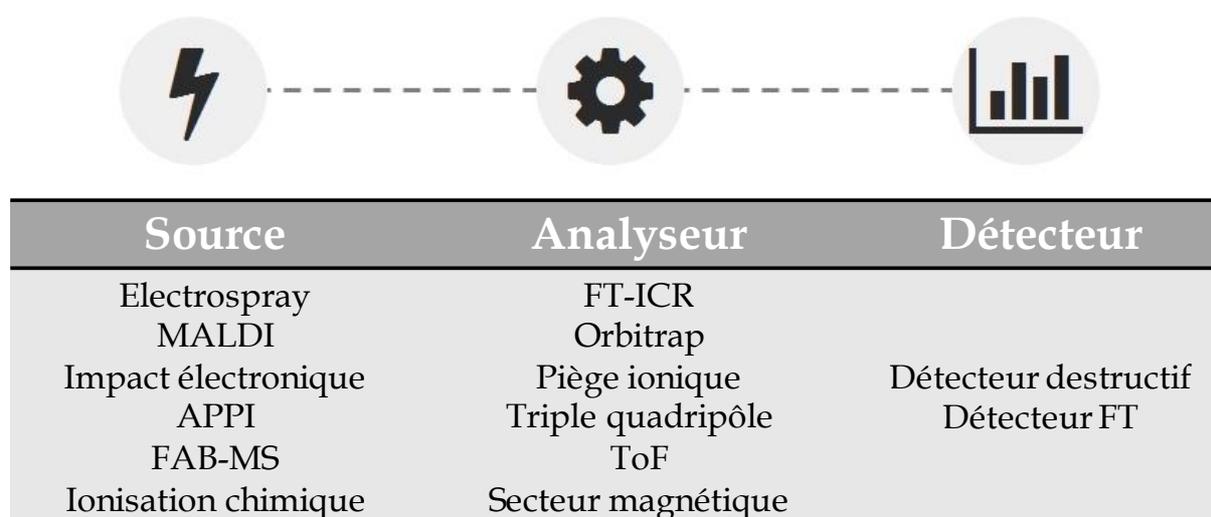


Figure 29 Parties composant un spectromètre de masse et les différentes technologies utilisées

4.3.2. Les sources électrospray (ESI)

La source d'ionisation, premier élément constitutif d'un spectromètre de masse, permet d'ioniser les substances à analyser. Il en existe aujourd'hui une grande variété. Une des caractéristiques les plus importantes de ces différents types de sources est l'énergie interne transférée lors du processus d'ionisation. Elle peut être très élevée et occasionner une forte fragmentation de la molécule ionisée, ou être plus faible et produire majoritairement des ions moléculaires. Une autre caractéristique importante des sources d'ionisation est la nature physico-chimique de l'analyte qu'elles peuvent ioniser. Pour les composés non volatils et thermolabiles, les ions doivent être directement extraits de la phase condensée à la phase gazeuse. Dans le cas des sources d'ions en phase liquide, couramment utilisées lors de couplage avec la chromatographie liquide, la solution contenant l'analyte est introduite dans le spectromètre de masse grâce à sa nébulisation, sous forme de gouttelettes. Plusieurs systèmes de pompage permettent de maintenir un vide adéquat dans le spectromètre. La source dite électrospray (ESI) permet de réaliser simultanément une telle ionisation et la désolvatation des analytes (*Figure 30*). Cette source est adéquate pour les différents types de biomarqueurs de l'ypérite : les adduits à l'ADN [113, 116], les dérivés des β -lyases et conjugués du glutathion [75, 110, 166], les produits de dégradations [166].

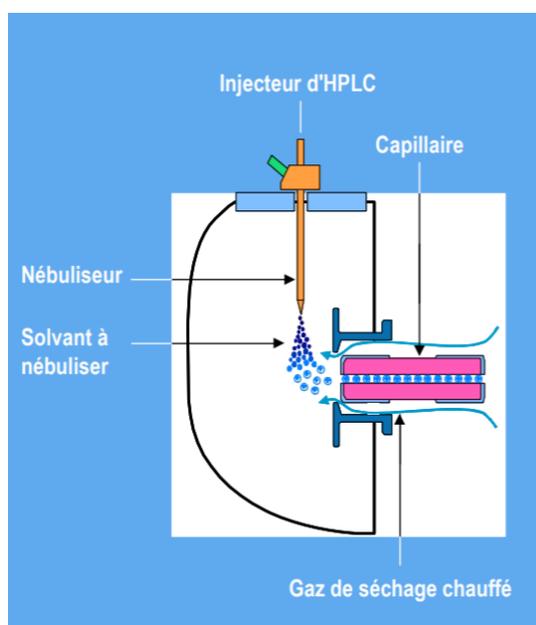


Figure 30 : Fonctionnement d'une source électrospray.

L'échantillon liquide est introduit dans la source ESI par un capillaire très fin (aiguille d'introduction) soumis à une différence de potentiel élevée (positif ou négatif selon le mode d'ionisation). La combinaison de ce champ électrique et d'un courant de diazote N_2 forme un nébulisat caractérisé par la présence de gouttelettes chargées (positivement ou négativement). Leur accumulation à l'extrémité de l'aiguille forme un cône allongé nommé cône de Taylor (*Figure 31*). La solution se disperse ensuite en générant de fines gouttelettes pour former un spray. Le flux d'azote chauffé permet d'évaporer le solvant et *in fine* produire les ions. Ces derniers sont refocalisés au moyen de barres multipolaires afin de les transférer de la source vers l'analyseur.

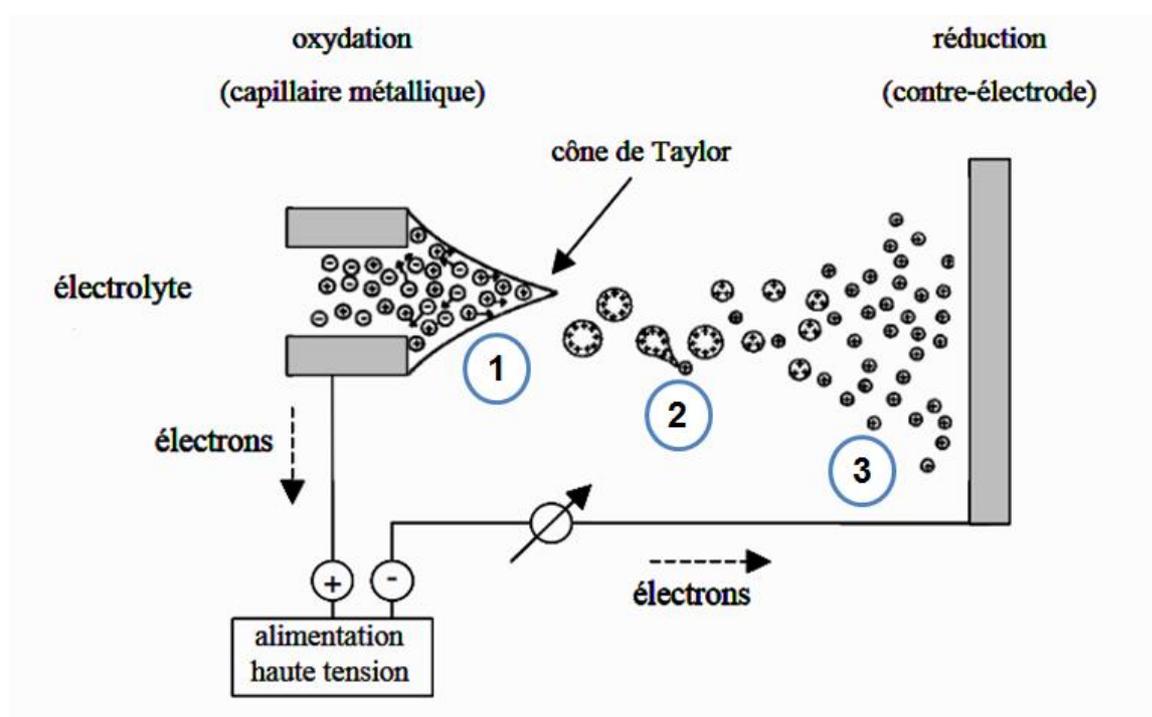


Figure 31 : Représentation schématique d'une source électrospray en mode positif. 1 : La production des gouttelettes ; 2 : La fission des gouttelettes ; 3 : L'émission des ions en phase gazeuse.

L'inconvénient majeur de la source électrospray réside dans les phénomènes d'effets de matrice, c'est-à-dire une modulation du rendement d'ionisation d'une molécule par les autres composants du mélange [176]. L'effet de matrice peut conduire à une quantification erronée en sous estimant ou en surestimant les concentrations réellement présentes dans l'échantillon. Il peut également mener à l'identification de faux positifs.

4.3.3. Analyseur : Triple quadripôle

Après avoir introduit les ions dans le spectromètre, ceux-ci sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge. Tout comme il existe une grande variété de sources, il existe de nombreux analyseurs.

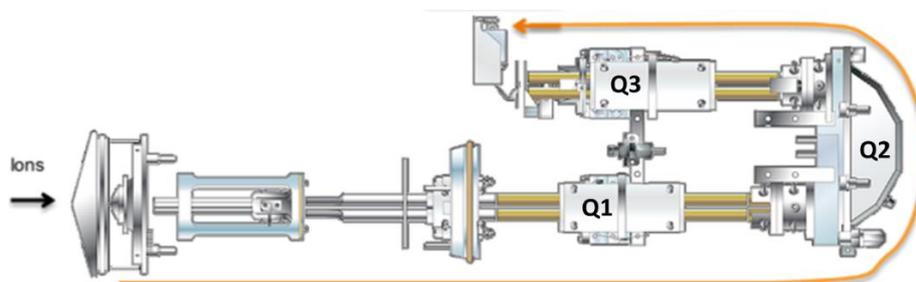


Figure 32 Schéma du triple quadripôle (Q1, Q2, Q3) du spectromètre de masse 6500+ QTrap de Sciex.

Le triple quadripôle est l'analyseur le plus couramment utilisé pour l'analyse ciblée de molécules de faible masse moléculaire (< 1000 Da). Pour atteindre une forte sensibilité et une grande spécificité, l'approche favorisée est une utilisation en mode tandem, c'est-à-dire un analyseur contenant trois quadripôles. Un triple quadripôle résulte de l'association en série de deux analyseurs quadripolaires (Q1 et Q3), séparés par une cellule de collision qui est en fait un quadripôle incurvé (Q2). Un quadripôle est constitué de quatre électrodes hyperboliques métalliques et parallèles. Elles sont raccordées électriquement deux à deux et soumises à un potentiel composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V . Les deux tensions sont à l'origine de la formation du champ quadripolaire entre les deux électrodes de même potentiel. Ainsi, les ions formés dans la source sont accélérés et focalisés avant leur entrée dans l'analyseur, puis subissent l'effet du champ quadripolaire. Dans ce quadripôle, suivant les valeurs de tension du champ, seuls les ions ayant des trajectoires stables sont isolés ; les autres, instables, terminent leur course dans les barres hyperboliques, se déchargent et sont entraînés par un système de pompage qui les élimine. La stabilité de la trajectoire d'un ion est dépendante de sa masse et de sa charge. Il est alors possible de séparer les ions d'un mélange complexe en fonction de leur rapport m/z puisqu'il est possible de balayer toute une gamme de masse en variant les tensions.

Travailler avec un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle permet de travailler soit en MS simple, soit en mode MS/MS. Dans le cas d'une analyse en MS simple,

deux modes d'analyses sont possibles : le mode balayage (full scan) où tous les ions formés sont observés et le mode d'acquisition d'un rapport m/z donné (SIM, Simple Ion Monitoring) où certains ions formés sont sélectionnés.

A l'opposé, dans la configuration en tandem, les quadripôles (Q1 et Q3) sont « actifs » et la cellule de collision est remplie de gaz inerte afin de fragmenter les ions sélectionnés par le premier quadripôle. Le premier et le troisième quadripôle fonctionnent comme des filtres de masse qui laissent passer selon le mode utilisé tous les ions ou certains ions choisis. On distingue alors le mode balayage des ions fragments (« Product Ion Scan »), le mode balayage des ions précurseurs (« Precursor Ion Scan »), le mode perte de neutre (« Neutral Loss »), et le mode de balayage de plusieurs transitions (« MRM, Multiple Reaction Monitoring »).

Le mode d'acquisition sélectionné dans le cadre de ces travaux est le mode MRM car il s'agit du mode de choix pour la quantification pour deux raisons :

- La sélectivité : ce mode assure une double sélectivité puisque nous sélectionnons à la fois l'ion parent (premier quadripôle) et les ions fils (fragments), voir Figure 33. Le passage de l'ion parent à l'ion fils est appelé transition MRM. Ce mode permet de suivre précisément et simultanément les transitions MRM de plusieurs ions parents.
- La seconde raison qui rend l'utilisation du mode MRM intéressante est la meilleure sensibilité par rapport aux autres modes de fonctionnement.

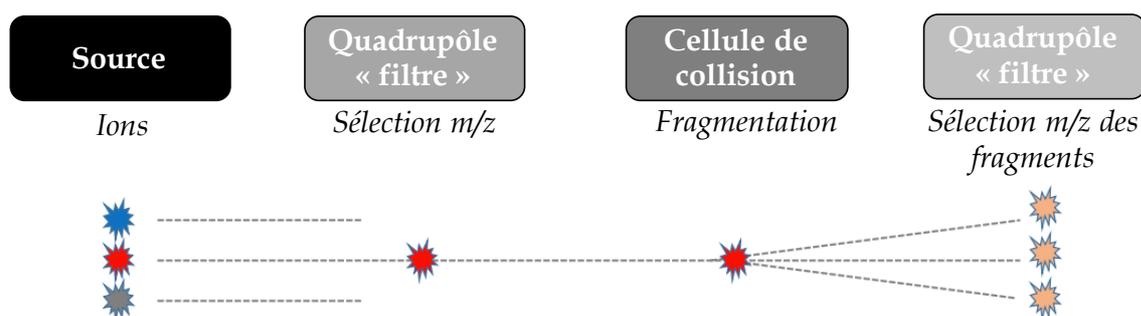


Figure 33 Principe de fonctionnement d'un analyseur triple quadripôle utilisé en mode MRM.

4.4. Les méthodes par dilution isotopiques

4.4.1. Etalonnage interne

Sur une gamme de concentration choisie, il est possible que la réponse du détecteur ne soit pas proportionnelle à la quantité d'analyte. Cela peut être le cas lorsque le détecteur est un spectromètre de masse.

La perte d'analytes et les effets de matrice lors de l'analyse sont les inconvénients majeurs de la SPE, que ce soit dans sa version classique ou en ligne. Comme pour les méthodes de LC-MS par dilution isotopique, l'ajout d'étalons internes marqués par des isotopes stables est une stratégie efficace pour limiter ces effets.

L'étalon interne (EI) doit avoir les propriétés suivantes : ne pas être initialement présent dans l'échantillon, être analytiquement différentiable des analytes, avoir des propriétés physico-chimiques proches de l'analyte.

L'étalonnage interne repose sur l'ajout dans l'échantillon d'une molécule unique en quantité parfaitement connue qui joue le rôle de référence. Cette molécule est communément appelée étalon interne ou standard interne. Il est ajouté à l'échantillon avant le début de l'étape de préparation de l'échantillon afin de s'affranchir des pertes liées à cette étape. Pour réaliser un étalonnage en utilisant des étalons internes, il est nécessaire de les ajouter à tous les échantillons ainsi qu'aux points de gamme. Ainsi, la quantification se fait de façon relative par rapport à l'étalon interne et non de façon absolue à partir d'une droite d'étalonnage de l'analyte (*Équation 6*).

$$\text{Concentration de l'analyte} = \text{Concentration de EI} \times \frac{\text{Aire de l'analyte}}{\text{Aire du EI}}$$

Équation 6 : Principe du calcul de la concentration d'un analyte en utilisant un étalon interne (EI).

4.4.2. Utilisation d'étalons internes marqués

Une stratégie répandue utilisable avec la spectrométrie de masse pour s'assurer de la qualité d'une analyse est d'utiliser des étalons marqués comme étalons internes. Ces standards, communément marqués à l'aide d'isotopes lourds comme le carbone 13 et l'azote 15, ont le même comportement et les mêmes affinités au niveau du système

chromatographique et du spectromètre de masse (à l'exclusion de leur rapport m/z) que leurs équivalents naturels. Ils permettront alors de corriger l'effet matrice ainsi que les variations du spectromètre de masse, engendrées essentiellement par son encrassement. Lorsqu'un ion précurseur est fragmenté, il donne en proportion le même ratio entre les différents ions fragments. C'est-à-dire que si une transition MRM est 2 fois plus intense qu'une autre transition MRM issue du même ion précurseur, alors ce ratio sera conservé quel que soit la concentration initiale du biomarqueur dans l'échantillon. Ainsi, en calculant les ratios entre différentes transitions issues du biomarqueur lourd, il est possible de les comparer à ceux obtenus pour l'équivalent léger. Si les ratios sont conservés, le risque que les transitions utilisées soient interférées est minimal. Le principal avantage de cette méthode est de pouvoir calculer facilement la concentration des analytes dans l'échantillon de départ.

4.5. Validation de méthode

4.5.1. Critères d'identification des composés

L'identification des composés lors d'une analyse par LC-MS/MS en mode MRM doit être assurée selon différents critères. Les normes européennes recommandent l'utilisation d'un minimum de trois points d'identification [177]. Nous avons donc fait le choix dans le cadre de ces travaux de thèse d'identifier chaque composé par :

- Leur temps de rétention (T_r)
- Deux transitions MRM (T_1 et T_2) : La transition MRM T_1 est associée à la transition ion parent et ion fils la plus intense, elle est alors utilisée pour la quantification du composé dans l'échantillon. La transition MRM T_2 est associée à la transition ion parent et ion fils la deuxième plus intense, elle est employée pour confirmer l'identification du composé dans l'échantillon. Le nombre d'ions d'identification peut même être supérieur à 2.
- Le rapport des aires des deux transitions (T_1/T_2) : la tolérance sur ce rapport est fonction de l'intensité relative du pic chromatographique détecté dans l'échantillon. Ainsi, la gamme de tolérance entre le rapport mesuré dans l'échantillon et celui mesuré dans le standard analytique du composé peut être comprise entre 20 et 50 %.

Ces trois critères permettent de s'assurer de la sélectivité de la méthode, définie comme la capacité à identifier sans ambiguïté et à quantifier un composé d'intérêt dans un mélange complexe sans interférence de la part des composés présents dans la matrice, des impuretés ou encore des produits de dégradation, la méthode ainsi validée pourra donc être qualifiée de spécifique.

4.5.2. Critères de validation analytique

Après avoir correctement identifié les analytes, il faut s'assurer que la méthode permet de les quantifier de façon fiable *i.e.* concentration la plus proche de la concentration réelle, concentration identique lors d'analyses répétées d'un même échantillon. Pour cela, des critères ont été définis pour valider une méthode analytique. La référence en bioanalyse est un document de la FDA (Food and Drug Administration) [178].

Il est d'abord nécessaire de construire une droite de calibration dans la matrice d'intérêt, celle des échantillons réels. La modélisation mathématique de la droite doit être la plus simple possible en privilégiant la régression linéaire. La droite doit comporter entre 6 à 8 points en prenant en compte la LOQ.

Ensuite, il est important de vérifier l'exactitude des analyses. La concentration en analyte trouvée doit être la plus proche de la concentration réelle dans l'échantillon. Ce paramètre est évalué en utilisant un échantillon dont la concentration réelle en analyte est connue. La concentration déterminée est comparée à la concentration réelle. Cette comparaison doit être faite pour la totalité des points de gamme de la droite de calibration, en réalisant 5 déterminations par point. L'écart maximum accepté est 15% pour l'ensemble des points de la gamme et de 20% pour la LOQ.

L'ensemble de cet état de l'art a permis de faire un point sur les connaissances que nous avons sur l'ypérite tout spécialement ses propriétés chimiques, ses mécanismes d'action biologiques, ses biomarqueurs déjà étudiés. Cependant, les conjugués issus de la voie de l'acide mercapturique n'ont pas été explorés malgré leurs utilisations dans d'autres domaines. Leur étude a été faite grâce à des expériences biologiques et aux outils analytiques expliqués précédemment. Les résultats sont présentés dans la partie suivante : Réalisations.

Réalisations

1. Développement et validation d'une méthode de quantification des biomarqueurs du CEES dans les milieux de culture

1.1. Choix des biomarqueurs

L'ypérite absorbée dans l'organisme se dégrade ou se lie à de nombreuses biomolécules endogènes. Les produits obtenus peuvent servir de biomarqueurs d'exposition. Parmi la multitude des adduits et des conjugués formés, 4 métabolites ont été choisis pour ce travail.

L'ypérite alkyle facilement l'ADN pour donner différents adduits. Le plus abondant est l'adduit à la position N7 de la guanine pour donner le N7-hydroxyéthylthioéthyl-guanine. Cet adduit est nommé dans ces travaux de thèse N7Gua-Yp, dans la littérature il est souvent nommé ETE-N7Gua. Par analogie, dans le cadre de la recherche de biomarqueurs au CEES, l'adduit N7-éthylthioéthyl-guanine, nommé dans ces travaux N7Gua-CEES, a été sélectionné. Son nom dans la littérature est souvent HETE-N7Gua. Certes, les adduits à l'ADN ont déjà été très souvent étudiés mais généralement après extraction de l'ADN nucléaire. La quantification de ces adduits de tissus ou d'organes est intéressante pour l'étude de la formation des dommages à l'ADN de l'ypérite et pour la compréhension de la toxicité de cet agent. Cependant, ce n'est pas une méthode viable comme moyen de détection pouvant servir de diagnostic où il faut privilégier les matrices facilement accessibles. Son analyse dans les biofluides a été finalement peu réalisée. Cet adduit est connu pour être détectable pendant au moins deux semaines, ce qui en fait potentiellement un bon biomarqueur. De plus, son analyse dans l'ADN dans le cas d'étude en toxicité, montre sa capacité à être facilement analysé par LC-MS/MS [46].

Trois autres métabolites ont été choisis, issus de la voie de métabolisation dite de l'acide mercapturique autres que ceux de la voie des β -lyases qui ont été déjà explorés. Elle s'inscrit dans le devenir physiologique du produit d'addition de l'ypérite sur le glutathion. L'efficacité de ce processus est démontrée par des études montrant l'impact sur le stress oxydant de la déplétion du glutathion par l'ypérite. Pour autant, bien que la formation du conjugué glutathion-ypérite (GSH-Yp) soit connue pour être rapide dans l'organisme, aucune méthode analytique n'a été développée pour le quantifier dans les fluides biologiques après exposition.

Après la conjugaison de l'ypérite sur le glutathion s'en suit une cascade de réactions de métabolisation afin d'éliminer l'ypérite par les urines. Parmi les différents produits formés dans ce processus de détoxification se trouvent les conjugués cystéine-ypérite (Cys-Yp) et N-acétylcystéine-ypérite (NAC-Yp). Ce dernier est aussi nommé dérivé de l'acide mercapturique de l'ypérite. Les conjugués à l'acide mercapturique spécifiques à d'autres composés exogènes ont déjà été étudiés comme potentiel marqueur d'exposition. Ils ont l'avantage de se trouver dans les urines et d'être normalement persistants puisqu'ils ne subissent plus de réactions métaboliques. Dans mon travail, ces métabolites ont été recherchés dans le cas du CEES. Les trois marqueurs issus de la voie des acides mercapturiques étudiés sont donc GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES (*Figure 34*).

Les métabolites du CEES choisis peuvent théoriquement être formés car une seule liaison covalente est créée entre l'ypérite et la biomolécule. Le CEES a une réactivité très proche de celle de l'ypérite. La différence majeure est son incapacité à former des bi-adduits ou des bi-conjugués. Comme le CEES est chimiquement très proche de l'ypérite, il est lui aussi fortement toxique. En effet d'après sa fiche de sécurité, le CEES est toxique en cas d'ingestion, par contact cutané et par inhalation. Il provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. C'est une substance CMR puisqu'il peut provoquer le cancer. Son emploi nécessite une grande attention, de préférence il est manipulé dilué sous sorbonne avec toutes les protections individuelles. Les déchets contaminés sont emballés avant dépôt dans les poubelles de déchets chimiques.

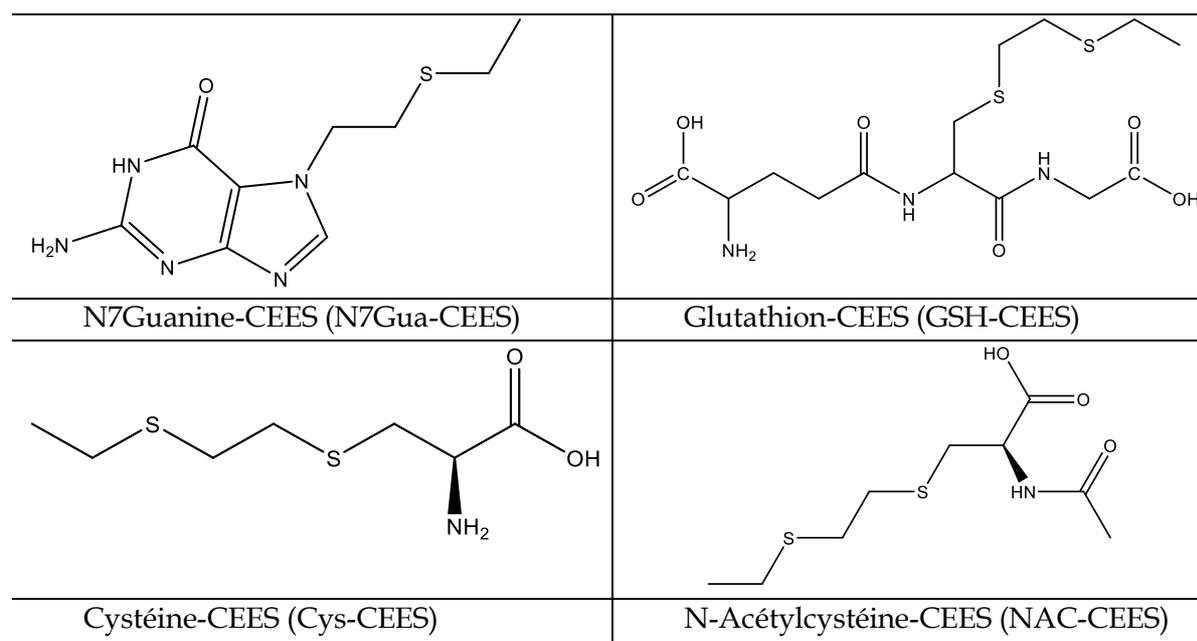


Figure 34 : Formule topologique des biomarqueurs du CEES choisis.

1.2. Préparation de solutions calibrées de standards

Ces composés chimiques ne sont pas disponibles dans le commerce, ils ont donc été synthétisés. Ces synthèses ont été faites en une seule étape par réaction directe du CEES sur les biomolécules d'intérêts. Dans une solution de 5 mL de tampon de phosphate (10 mM, pH=7) a été dissout soit 10,8 mg de cystéine, soit 10,9 mg de NAC, soit 10 mg de dGuo soit 10,4 mg de GSH. Du CEES (5 μ L, 2,9 mM) a été ajouté dans chaque tube. La réaction a duré toute la nuit à température ambiante avec une agitation magnétique. Plusieurs étapes de lavages ont été effectuées par extraction avec du dichlorométhane pour éliminer toutes traces de CEES. Il a fallu dépuriner le produit de la réaction entre le dGuo et le CEES par hydrolyse thermique (90°C pendant 20 min dans un bloc chauffant) afin d'obtenir le composé N7Gua-CEES en utilisant la méthode de Batal *et al.* [179]. Les standards ont été purifiés par un système HPLC-UV (détails du système et du gradient dans la partie Conditions Expérimentales p.236). Ce système de purification est adéquat pour les faibles quantités de produits obtenues. De plus, ce sont des molécules qui absorbent en UV (λ = 220 nm pour GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES ; λ = 260 nm pour N7Gua-CEES), ce qui a permis de les collecter en sortie de colonne par identification de pics sur les chromatogrammes. Lors de la purification, des fractions de 2 mL ont été collectées dans des tubes à essai. Pour savoir si le produit était présent dans la collection, 20 μ L de chaque tube ont été analysés par UHPLC-MS/MS. La détection par masse en mode MS2 est plus spécifique que l'UV et a permis d'identifier clairement les fractions où le produit attendu était présent. Les fractions d'intérêt, ont été regroupées et purifiées par HPLC-UV une seconde fois pour obtenir une solution plus pure. Les solutions finales ont été lyophilisées puis mise en solution dans de l'eau MilliQ.

L'étape suivante a été de vérifier la structure moléculaire des produits isolés et d'évaluer leur pureté. Pour cela, une analyse RMN du proton de chaque standard a été faite (*Tableau 8*). L'étude des spectres RMN ont pu confirmer les structures des standards synthétisés. La pureté a été estimée en faisant le ratio entre la somme des intégrations des impuretés sur la somme des intégrations de tous les pics du spectres (impuretés et standards). Ainsi, le standard de Cys-CEES est pur à 96%, le standard de NAC-CEES est pur à 83% et le GSH-CEES est pur à 32%. Pour vérifier que les impuretés de la solution de GSH-CEES n'influencent pas la détection et la quantification du standard, un analyse MS1 entre 200 et 450 m/z a été faite. L'ion moléculaire du GSH-CEES (396 m/z) a bien été observé ainsi que d'autres ions moléculaires à 261, 371, 245 et 415 m/z. D'après l'intensité des pics, GSH-CEES est largement le composé majoritaire dans la solution. De plus, les impuretés ayant des masses différentes de celles de

GSH-CEES, elles ne peuvent pas perturber la détection avec le mode MRM. En effet, en mode MS2 de l'ion pseudo-moléculaire, seul GSH-CEES a été détecté. L'analyse RMN du standard N7Gua-CEES n'a pas donné de résultat car la quantité était trop faible, le spectre RMN n'était pas interprétable. Par contre, la solution a été analysée en spectrophotométrie UV. Le spectre obtenu est caractéristique de celui des adduits à la guanine en position N7.

La caractérisation des solutions de standards a permis de valider les structures et d'avoir une estimation de leur pureté. Ces synthèses, nous ont donc permis d'avoir les standards recherchés : GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES. Il est ensuite nécessaire de connaître leur concentration pour avoir des analyses quantitatives.

Afin d'avoir une méthode quantitative, il est nécessaire de connaître la concentration exacte des standards. Ils ont été calibrés par UHPLC couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes. Comme références pour calibrer mes solutions, pour faire la gamme d'étalonnage, des solutions de standards calibrées précédemment synthétisés au laboratoire ont été utilisées. Le choix de la gamme d'étalonnage pour les calibrations a été faite en sorte de pouvoir la modéliser par une régression linéaire. Les concentrations des solutions mères des standards GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES sont 0,611 mM, 41,341 mM, 1,180 mM et 0,006 mM respectivement.

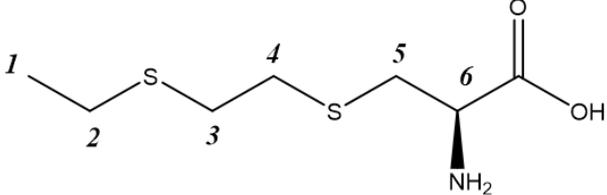
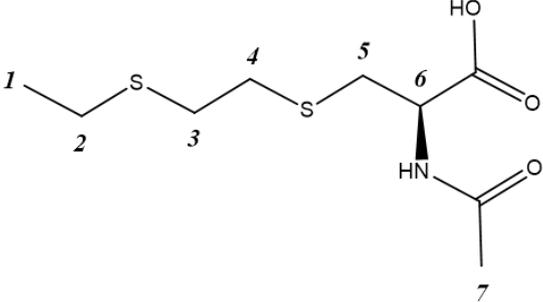
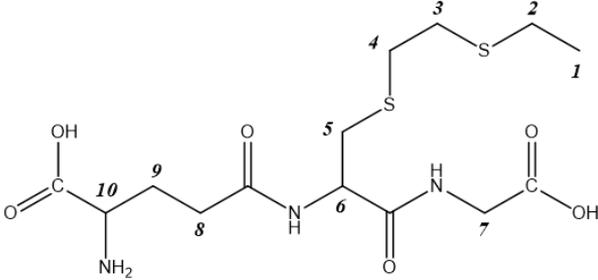
Cys-CEES				
Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Groupement
1,17	3H	t	7,4	1
2,56	2H	q	7,4	2
2,79	4H	t	3,1	3 & 4
3,05	2H	m	/	5
3,87	1H	dd	4,4 / 7,3	6
NAC-CEES				
Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Groupement
1,17	3H	t	7,4	1
2,00	3H	s	/	7
2,55	2H	q	7,2	2
2,76	4H	m	/	3 & 4
3,02 & 2,87	2H	m	/	5
4,36	1H	dd	4,6 / 8	6
GSH-CEES				
Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Groupement
1,17	3H	m	/	1
2,11	2H	m	/	9
2,55	4H	m	/	2 & 8
2,76	4H	m	/	3 & 4
2,85	1H	dd	9 / 14	5
3,05	1H	dd	5 / 14	5
3,7	2H	m	/	7
4,01	1H	m	/	10
4,53	1H	dd	4,6 / 9,1	6

Tableau 8 : Analyse des spectres RMN du proton de Cys-CEES, NAC-CEES et GSH-CEES.

1.3. Amélioration de la justesse des analyses par dilution isotopique

Etant donné que les matrices à analyser dans ces travaux sont des matrices biologiques, il a été nécessaire d'optimiser les protocoles pour améliorer la justesse des analyses. En effet, les matrices biologiques sont complexes. Les plus courantes sont le plasma et les urines qui contiennent une multitude de composés. Pour valider biologiquement les biomarqueurs choisis, des expériences *in vitro* ont été réalisées où la matrice à analyser sont des milieux de culture. Ils contiennent eux aussi des concentrations importantes de sels et diverses petites molécules organiques. D'une part le plasma contient de nombreuses protéines, d'autre part l'urine est riche en sel, avec des variations de pH inter-individus. Tous ces paramètres peuvent influencer sur les effets de matrices, les interférences, ou la rétention sur les colonnes. L'étude des effets matrices des biomarqueurs dans du milieu de culture a été faite. Il n'y a pas d'effets matrices pour GSH-CEES et pour N7Gua-CEES. Les effets sont + 430 % pour Cys-CEES, - 30% pour NAC-CEES. Ils ne sont donc pas négligeables pour les biomarqueurs NAC-CEES et Cys-CEES. Par ailleurs, la sensibilité de la détection par spectrométrie de masse peut présenter des fluctuations lors de longues séries d'analyses. Pour pallier ces sources d'erreurs, des méthodes incluant la dilution isotopique ont été utilisées de façon systématique lors de ces travaux de thèse.

Les mêmes molécules que les standards synthétisés marquées par des isotopes stables sont un bon choix d'étalons internes (*Figure 35*). La masse des molécules marquées est différentes des standards. Cette différence est de 3 à 5 g/mol. Elle est suffisante pour différencier les standards des étalons internes lors de la détection par la spectrométrie de masse.

Nous avons donc synthétisé des étalons internes, qui ont été systématiquement ajoutés aux matrices avant les étapes de préparations des échantillons et aux standards d'étalonnage. Les synthèses sont similaires à celles utilisées pour les standards. Des solutions de 10 mM de chaque biomolécule marquée par des isotopes stables (^{13}C et/ ou ^{15}N) ont été préparées (Cys*, NAC*, GSH* et dGuo*) dans du PBS à 1/10. La cystéine marquée contient trois ^{13}C et un ^{15}N , pour la NAC* trois ^{13}C et un ^{15}N , pour le GSH* deux ^{13}C et un ^{15}N et pour la dGuo* cinq ^{15}N . Le CEES (20 μL) a été ajouté aux solutions de Cys*, de GSH*, de dGuo* et de NAC* à 10 mM. La réaction a duré toute la nuit à température ambiante avec une agitation magnétique. Plusieurs étapes de lavages ont été effectuées avec du dichlorométhane pour éliminer toutes traces de CEES. Il a fallu dépuriner le produit de la réaction entre la dGuo* et le CEES par

hydrolyse thermique (90°C pendant 20 min dans un bloc chauffant) afin d'obtenir le composé N7Gua*-CEES [179]. Les composés ont été purifiés par SPE. Le protocole de la SPE utilisé se base sur celui développé pour la purification des matrices (voir p.238). La purification par SPE est moins efficace que celle par HPLC-UV mais plus rapide. La pureté des SI est jugée moins critique que celle des standards. En effet, ils ne sont rajoutés qu'en quantité très faible dans les échantillons et leurs solutions peuvent être calibrées très précisément par comparaison avec la molécule non-marquée. L'élution a été faite par ajout de 1 mL solution d'eau contenant des proportions croissantes de méthanol. Des fractions de 20 µL de chaque fraction ont été analysées par UHPLC-MS/MS. Les fractions d'intérêt ont été regroupées. Les solutions finales ont été lyophilisées puis remises en solution dans de l'eau MilliQ. Les étalons internes purifiés ont été calibrés par UHPLC-MS/MS à partir des standards du CEES calibrés. Les concentrations des solutions mères d'étalons internes GSH*-CEES, Cys*-CEES, NAC*-CEES et N7Gua*-CEES sont respectivement de 0,287 mM, 1,209 mM, 0,156 mM et 0,240 mM.

Désormais, nous avons des solutions de standards calibrées ainsi que des étalons internes. Elles vont être utiles au développement de la préparation d'échantillon pour évaluer les rendements des différentes étapes avant injection en UHPLC-MS/MS.

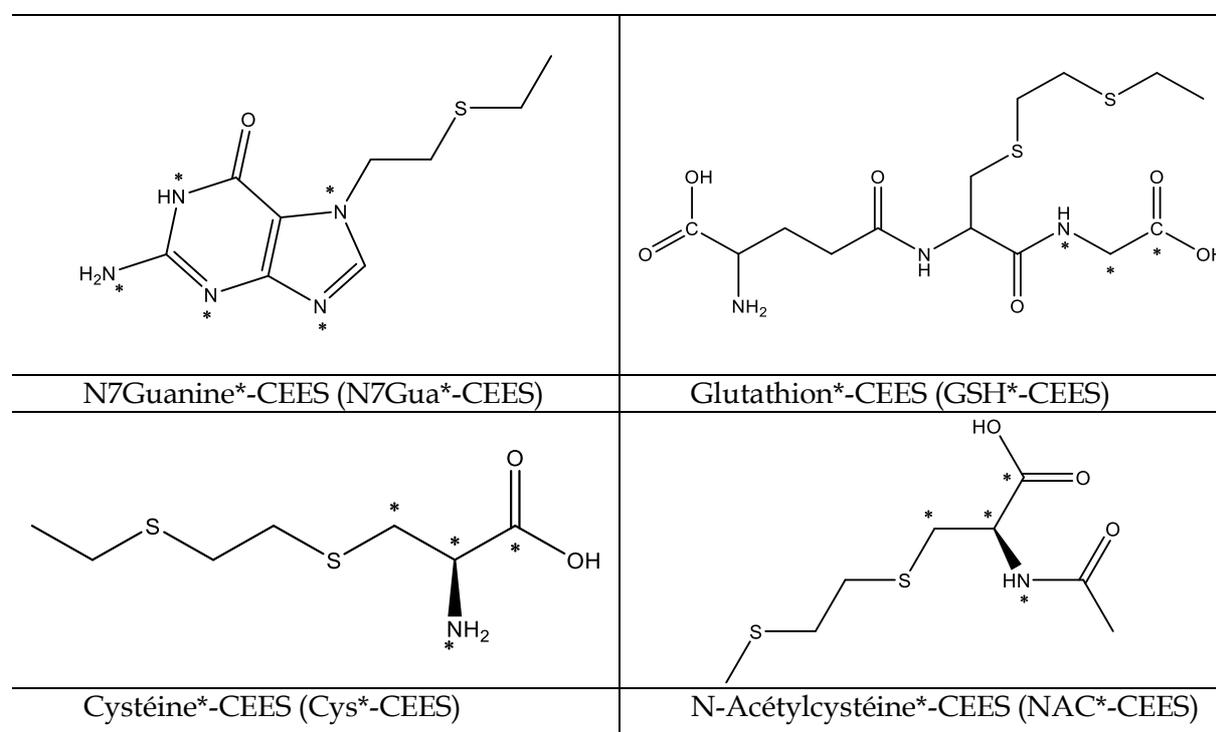


Figure 35 : Formule topologique des étalons internes des biomarqueurs du CEES, l'astérisque désigne les isotopes stables ^{13}C et ^{15}N .

1.4. Purification et concentration des biomarqueurs par SPE

L'ensemble de la préparation d'échantillon défini dans cette méthode se compose d'une étape de purification par SPE, d'une étape d'évaporation de l'éluât, d'une étape de reconstitution avant le transfert de l'échantillon dans les vials de chromatographie liquide. L'ensemble de ces étapes est représentée sur la *Figure 39*.

En utilisant les standards synthétisés, un protocole d'extraction sur phase solide a été développé. Il permet à la fois de purifier et de concentrer les analytes. Cette technique est couramment utilisée pour les matrices biologiques et des protocoles ont déjà été mis en place dans le domaine des toxiques de guerres. N'ayant aucun protocole d'établi au laboratoire, nous nous sommes basés sur le développement fait par Zhang *et al.* [123]. Leur méthode a été faite pour purifier des adduits à l'ADN de l'ypérite présents dans les urines. Pour les premiers essais, des cartouches SPE C18 de 500mg ont été utilisées. La première étape a consisté à suivre un profil d'élution. Après dépôt des standards dans de l'eau, des solvants d'élutions ayant un pourcentage de méthanol croissant sont percolés (*Figure 36*). Cette technique permet avec une seule cartouche de déterminer la composition à la fois du solvant de lavage (point A sur la *Figure 36*) et le solvant d'élution (point B sur la *Figure 36*). En effet, après le point A, des produits commencent à se décrocher de la colonne, ce qui engendrait des pertes de rendement de la SPE si le pourcentage de méthanol était dans cette zone. A partir du point B, l'ensemble du produit a été élué.

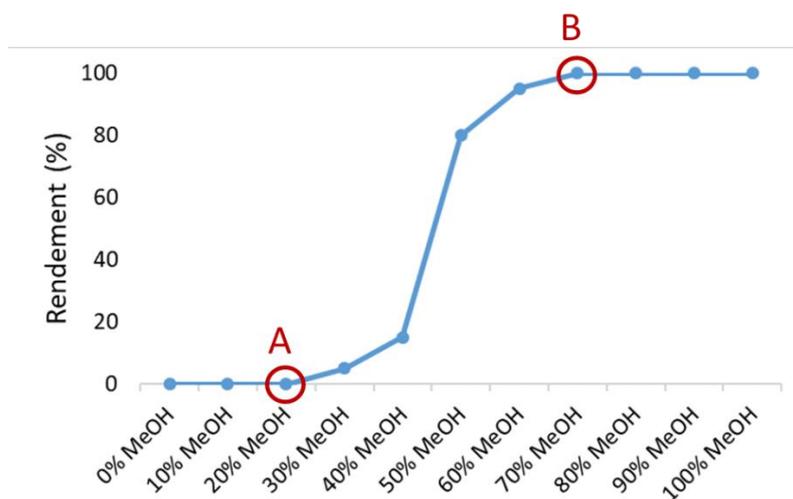


Figure 36 : Profil d'élution théorique en SPE qui montre la quantité de produit éluée en fonction du pourcentage de solvant organique. **A** composition du solvant idéal pour le lavage / **B** composition du solvant idéal pour l'élution.

Plusieurs types de cartouches ayant le même mécanisme de rétention, de type phase inverse, ont été utilisées. La cartouche C18 de 500 mg (HyperSep C18) et deux cartouches polymériques composées d'un copolymère sphérique hydrophobe de polystyrène-divinylbenzène de 100 et de 200 mg (phase Chromabond® HR-X) ont été comparées. C'est la cartouche polymérique de 100 mg qui permet d'avoir les meilleurs rendements et le moins de variabilité entre échantillons. Nous avons observé que la présence d'acide formique dans les solutions améliore la rétention des analytes sur le sorbant (*Figure 38*). Cependant, nous avons observé que la présence de cet acide pendant l'étape d'évaporation dégrade une partie des analytes GSH-CEES (perte en moyenne de 44%) et Cys-CEES (perte en moyenne de 29%). Ainsi, cet acide tamponne les solutions de lavage et non la solution d'élution.

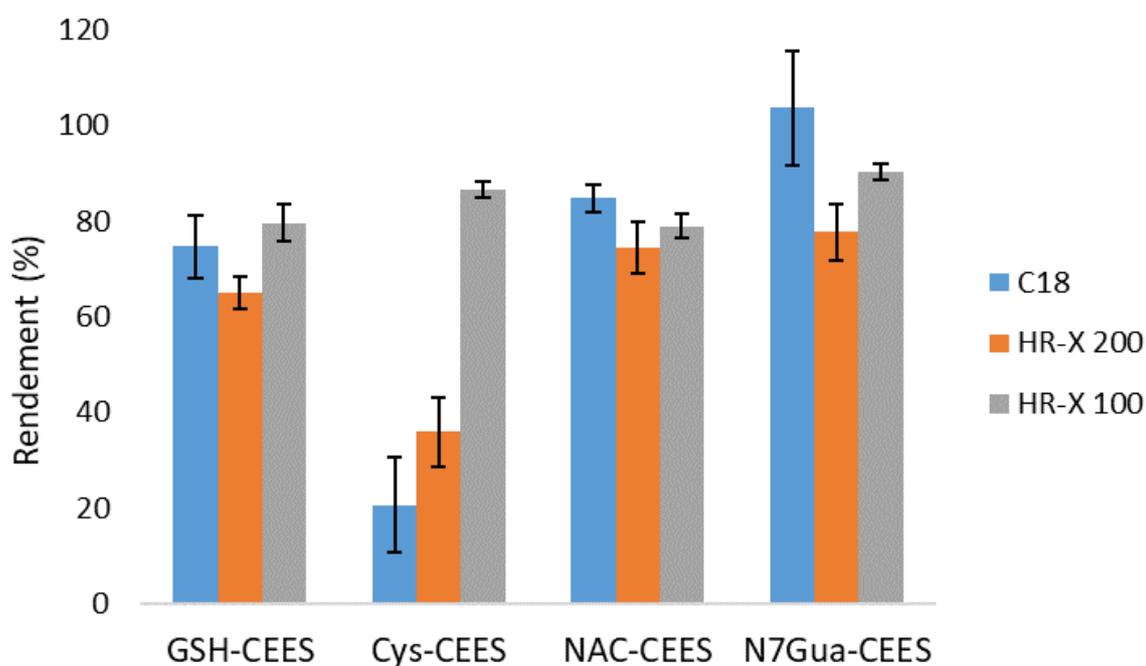


Figure 37 : Rendement de la SPE en fonction des standards et en fonction de la cartouche.

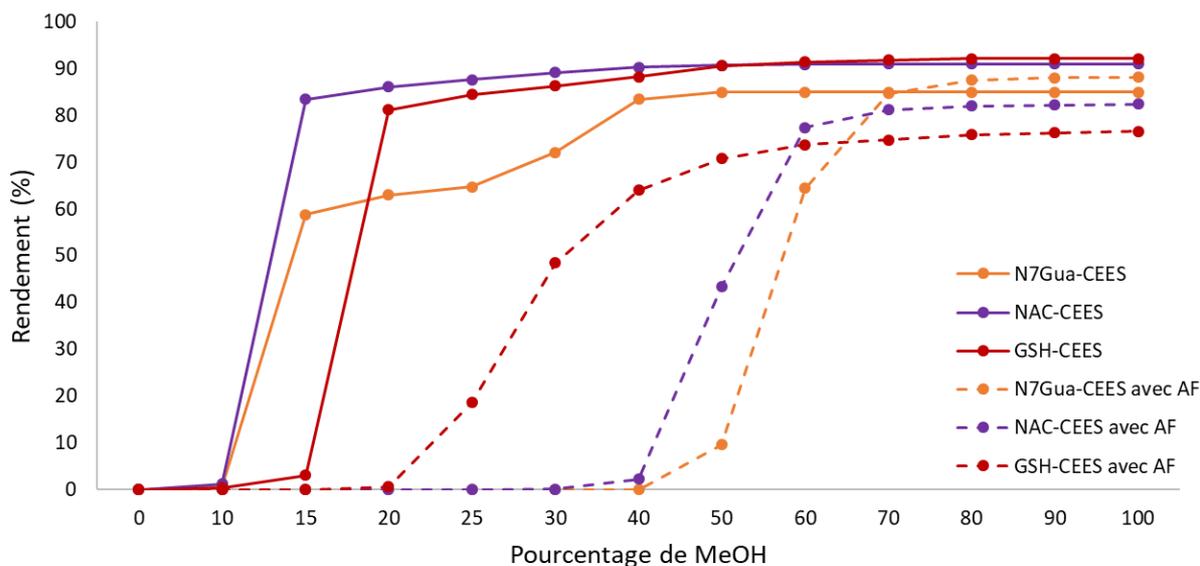


Figure 38 : Rendement de la SPE en fonction des standards et en fonction de la présence d'acide formique (AF) dans le solvant d'élution contenant du MeOH. Les résultats de Cys-CEES ne sont pas montrés à cause d'un effet matrice important qui fausse le rendement car les SI n'avaient pas encore été synthétisés.

L'étape d'évaporation de l'échantillon pour le concentrer est faite au concentrateur sous vide (Speed-Vac), ce qui est chronophage d'autant plus si l'échantillon contient de l'eau. Les premiers essais d'évaporation ont été fait par lyophilisation mais cette technique a engendré des pertes importantes en analytes (perte en moyenne de 51%, 66%, 57% et 47% pour GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES respectivement). Pour réduire le temps d'évaporation au concentrateur sous vide, l'idée est de n'utiliser que du solvant organique lors de l'élution au risque de décrocher plus d'impuretés. Le solvant d'élution choisi n'est composé que de méthanol.

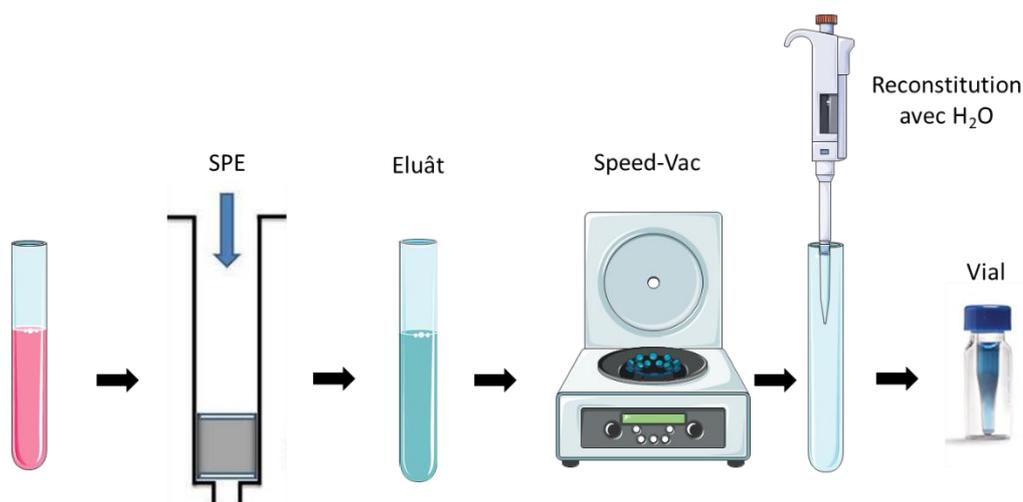


Figure 39 : *Processus de préparation de l'échantillon de sa collecte à sa mise dans les vials pour l'analyse en UHPLC-MS/MS.*

L'extraction sur phase solide dans sa version optimisée est donc réalisée sur les colonnes Chromabond® HR-X de 45 μm de 100 mg à l'aide d'un système manifold à vide. Tout d'abord, les colonnes sont conditionnées avec 1 mL de méthanol contenant 0,1% d'acide formique suivi d'1 mL d'eau acidifiée par 0,1% d'acide formique. Le milieu de culture (500 μL), ou un fluide biologique, à purifier, est d'abord dopé par ajout de étalons internes (10 μL , 0,2 μM) puis chargé sur la colonne. L'échantillon est lavé par 1 mL d'eau acidifiée suivi d'une solution de 5% de méthanol contenant 0,1% d'acide formique. La colonne est séchée pendant 10 min par aspiration sous vide. La dernière étape, l'élution, est faite par écoulement de 1 mL de méthanol tamponné par du formiate d'ammonium. Cette solution a été préparée en ajoutant 200 μL de formiate d'ammonium en solution aqueuse à 10 M dans 200 mL de méthanol. L'éluât est collecté dans des tube à hémolyse puis séché au Speed Vac à 35°C. Les échantillons sont reconstitués dans 200 μL d'eau et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par UHPLC-MS/MS.

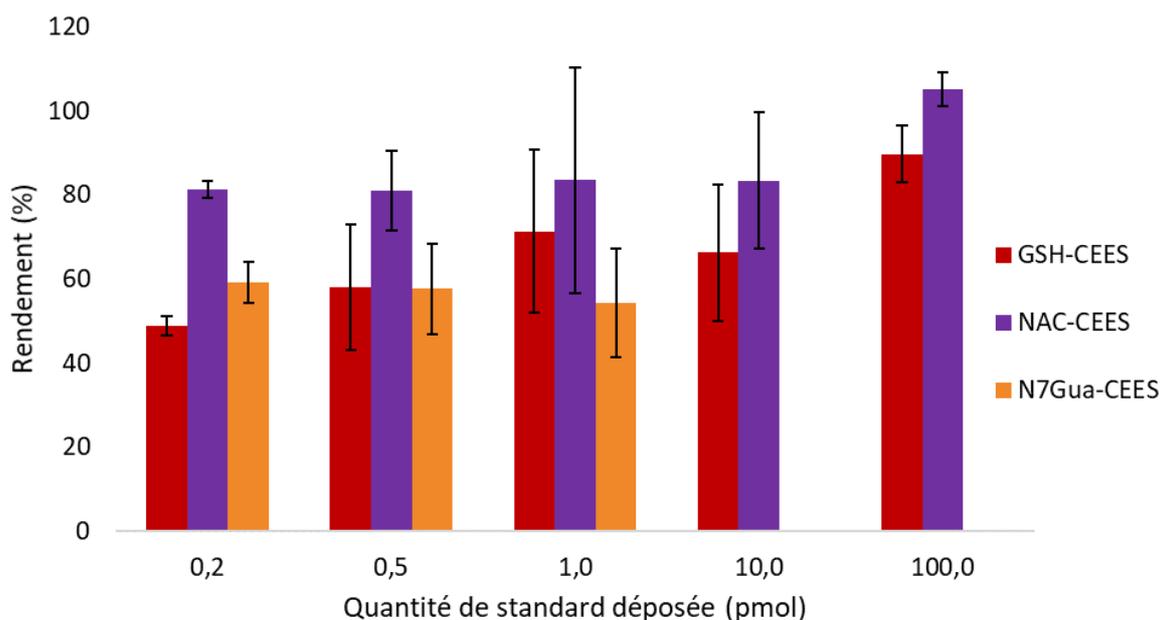


Figure 40 : Rendement de la SPE avec une cartouche polymérique HR-X de 100mg en fonction de la quantité de standard déposé. N7Gua-CEES n'a pas été mis dans les essais à 10 et 100 pmol à cause des faibles quantités disponibles de ce standard.

L'effet de la concentration sur les rendements de SPE a été étudiée. Il est peu probable de saturer la colonne SPE car dans notre contexte ce sont des traces d'analytes qui sont recherchés. Cependant, la colonne peut être saturée par les nombreux constituants de la matrice. Il est donc important de s'assurer de la validité du protocole sur la gamme de travail défini. Des traitements biologiques par le CEES impliquent des biomarqueurs présents avec des concentrations bien différentes en fonction des concentrations en toxique. Après dépôts de différentes quantités de standards sur les cartouches, de 0,2 à 100 pmol, les rendements sont satisfaisants car toujours supérieurs à 50% (**Figure 40**). Il n'y a pas d'effets majeurs de la concentration. A noter que ces rendements seront corrigés dans la méthode finale par la présence des étalons internes.

Afin d'évaluer l'efficacité de l'ensemble de la préparation d'échantillon, 5 matrices blanches de milieu de culture (utilisé lors des traitements des HaCaT, voir chapitre 2) ont été dopées avec les standards (5 pmol) et les SI. Ces échantillons ont été préparés par le protocole SPE développé et analysé par UHPLC-MS/MS. Le rendement de la préparation d'échantillon i.e. la SPE, l'évaporation, la reconstitution de l'échantillon est de 65 ± 5 % pour GSH-CEES, 84 ± 3 % pour Cys-CEES, 112 ± 4 % pour Cys-CEES et 106 ± 5 % pour NAC-CEES (**Figure 41**).

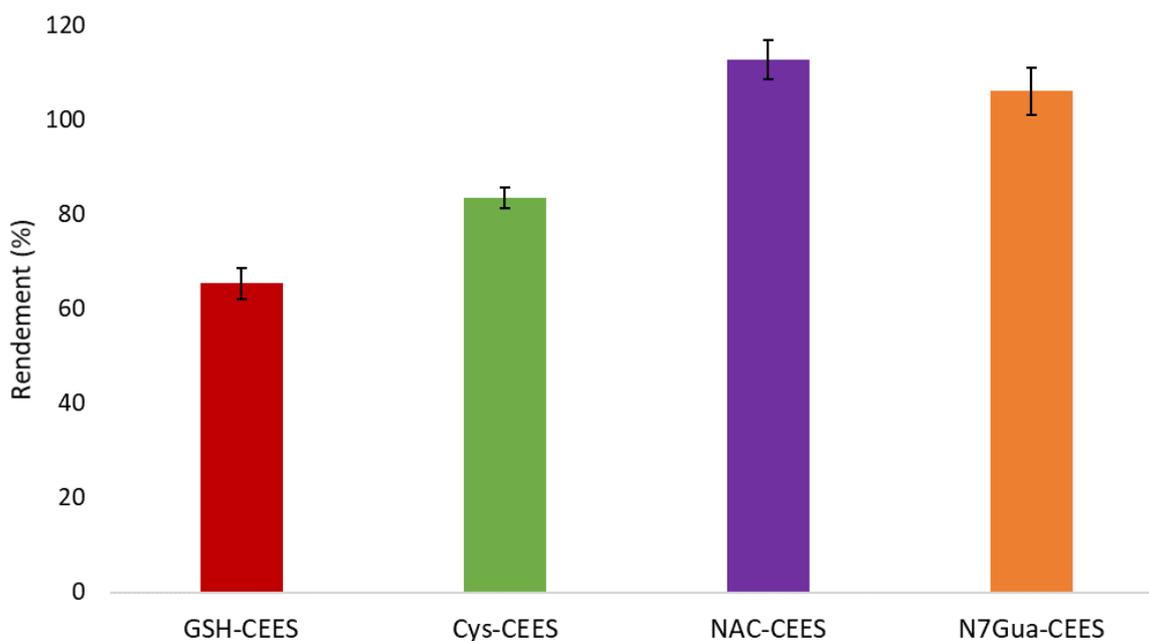


Figure 41 : Rendement de l'ensemble de la préparation d'échantillon. Les données représentées sont la moyenne \pm EC (n=5).

1.5. Développement d'une méthode LC-MS/MS pour les biomarqueurs du CEES

Grâce aux standards synthétisés, nous avons pu optimiser les paramètres de la chromatographie liquide et du spectromètre de masse. Le gradient de la chromatographie a été optimisé afin d'avoir une bonne séparation des pics des standards (**Figure 42**). L'UHPLC a été préférée à l'HPLC afin de réduire les temps d'analyses pour augmenter la cadence des analyses. Pour pallier la hausse de la pression (environ 450 bar) au sein de la colonne en UHPLC, la température du four à colonnes a été augmentée jusqu'à 50°C. Ainsi, la viscosité des phases mobiles diminue ce qui fait baisser la pression d'environ 30% par rapport à celle obtenue à température ambiante.

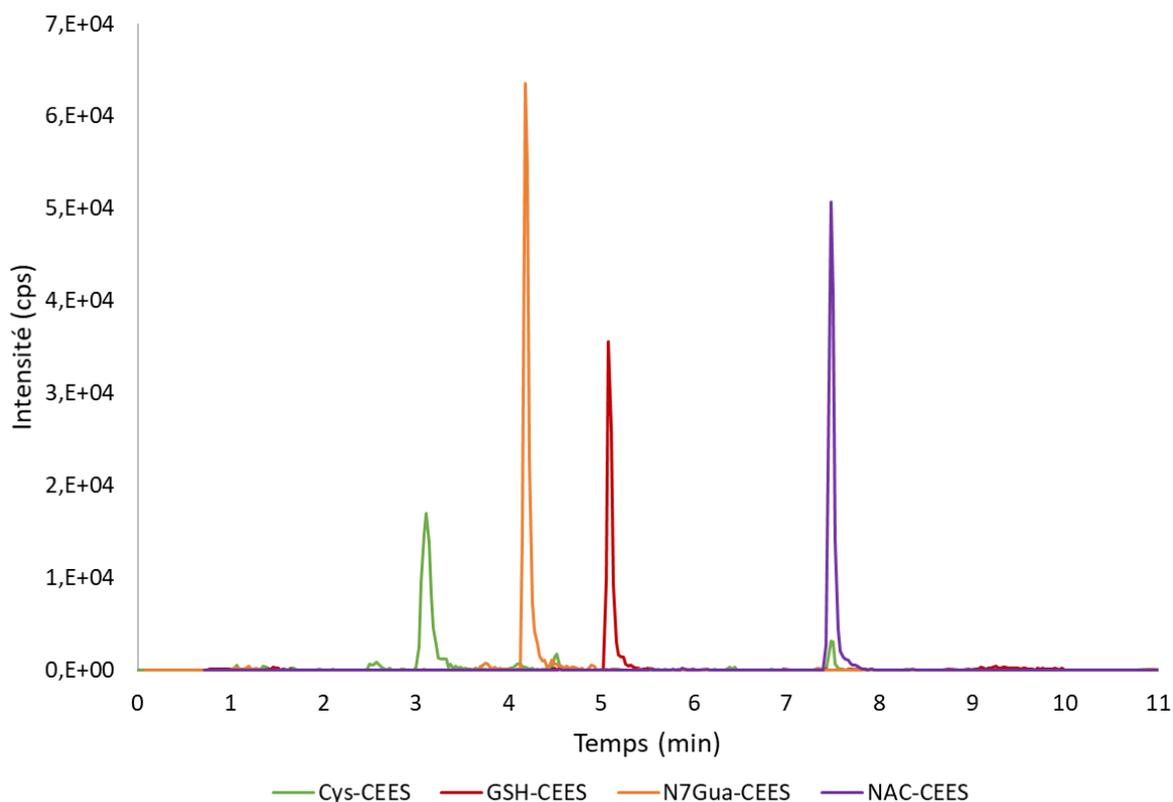


Figure 42 : Chromatogramme obtenu après injection en UHPLC-MS/MS de 0,5 pmol des biomarqueurs du CEES dans du milieu de culture. L'ordre d'élution est : Cys-CEES ($tr=3,1min$), N7Gua-CEES ($tr=4,2min$), GSH-CEES ($tr=5,0$), NAC-CEES ($tr=7,4min$).

Le spectromètre de masse est un triple quadrupôle utilisé en ionisation positive avec le mode de scan MRM, *Multiple Reaction Monitoring*. Les paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés par injection en continue à la seringue. Les paramètres de sources quant à eux ont été optimisé par FIA en mode MS/MS. Le logiciel de pilotage a un programme d'optimisation automatique qui permet de tester les éléments suivants : DP, EP, CE, CXP, CUR, IS, TEM, GS1, GS2. A la fin de ce programme, les données sont éditées dans un fichier. Il suffit de choisir les paramètres donnant les meilleures intensités de pics. L'étude de la fragmentation des standards avait été faite en enregistrant des spectres en MS2 lors purification des standards et des SI (**Figure 43**). Cette étude permet de déterminer les ions fils les plus intenses pour définir les fragments gardés en MRM. Certains ions semblent caractéristiques du CEES car ces ions fils, m/z de 61 et m/z de 89, se retrouvent pour tous les standards. En effet, les coupures se font autour des sulfures (du soufre du CEES et du soufre de la biomolécule) *via* le mécanisme des coupures en alpha favorisées par la présence d'atomes

électronégatifs. GSH-CEES a cependant à la place de l'ion m/z 61 un ion m/z de 121 qui est un ions fils majoritaire. Pour chaque standard, 3 ions fils ont été retenus pour les analyses en mode MRM. L'étude de la fragmentation permet de conforter la caractérisation des standards. Murphy *et al.* [180] ainsi que Xie *et al.* [181] ont étudié la fragmentation de nombreux conjugués au glutathion. Ils en ont identifié des fragmentations caractéristiques de ces composés : des coupures alpha autour des amines secondaires et du thiol. Ayant obtenu des fragments similaires aux leurs, cela nous conforte dans la caractérisation du standards GSH-CEES et dans l'étude de la fragmentation des autres standards.

Nom	Ion parent (m/z)	Ions fils (m/z)
GSH-CEES	396	89 / 121 / 177
Cys-CEES	210	61 / 89 / 120
NAC-CEES	252	61 / 89 / 162
N7Gua-CEES	240	55/ 61 / 89 / 105

Tableau 9 : Ions parents et ions fils lors de l'analyse en mode MRM des standards des biomarqueurs CEES.

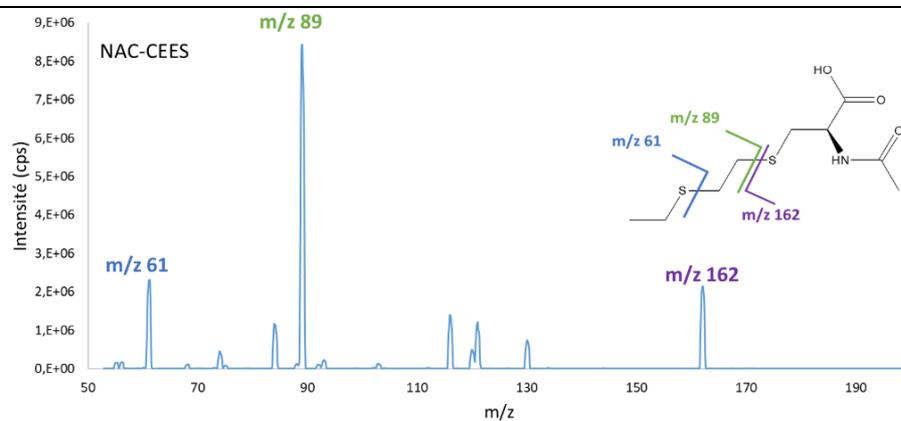
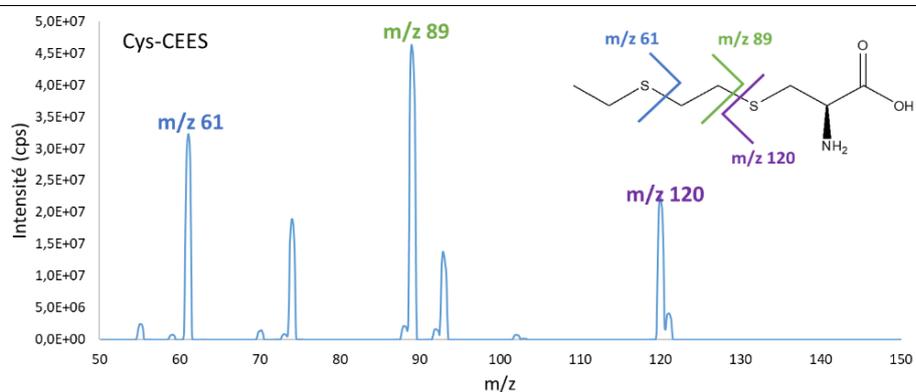
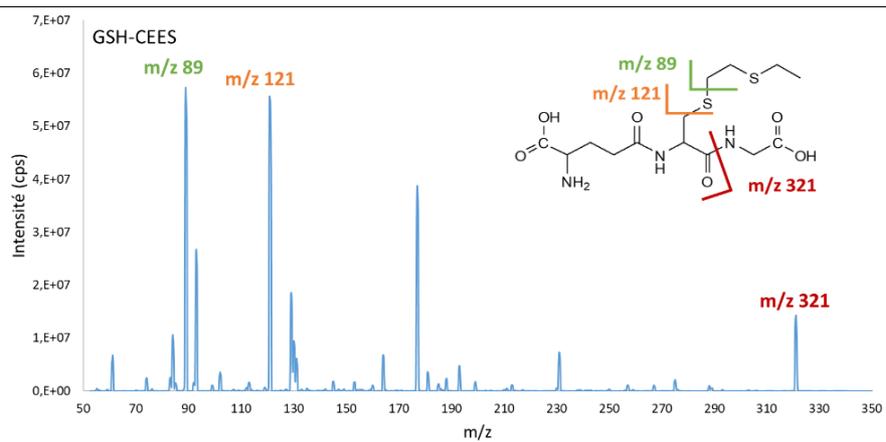
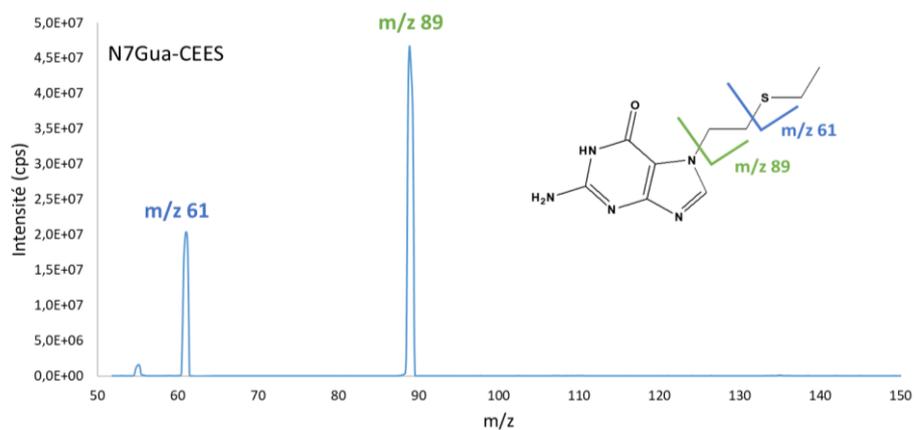


Figure 43 : Spectres de fragmentations des molécules GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES.

1.6. Validation de la méthode analytique pour quantifier les biomarqueurs du CEES présents dans les milieux de culture

Afin de s'assurer qu'une méthode développée peut être utilisée, il est nécessaire de s'assurer que celle-ci fournit toujours les mêmes résultats lorsqu'elle est appliquée plusieurs fois sur un même échantillon. Il est également nécessaire que les résultats obtenus soient proches de la concentration réelle au sein de l'échantillon. Ainsi, un certain nombre de critères ont été définis par la FDA (Food and Drug Administration) pour valider une méthode quantitative [178]. Nous nous sommes aussi appuyés sur un rapport d'une groupe de travail en toxicologie médico-légale [182]. Pour l'ensemble des expériences de validation la matrice a été du milieu de culture de HaCaT non traitées, c'est la matrice blanche. En effet, la méthode a été développée en vue d'analyser le milieu de culture d'expériences *in vitro* avec du CEES.

1.6.1. La droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage permet de décrire la relation concentration-réponse des standards. La régression mathématique doit être la plus simple pour décrire cette relation. Il a été ainsi choisi de travailler dans une gamme linéaire. Les courbes d'étalonnage des standards sont donc modélisées par une droite passant par zéro. La gamme de travail a été définie par rapport aux concentrations des solutions de standards synthétisés, à la linéarité, à la LOD et aux concentrations attendues dans les échantillons réels. Pour GSH-CEES (*Figure 44*), Cys-CEES et NAC-CEES, la gamme linéaire validée est entre 0,1 et 50 pmol injectés. Pour N7Gua-CEES, la gamme est de 0,1 à 0,5 pmol injectés. Cette dernière est plus petite car la concentration en N7Gua-CEES synthétisée est trop faible.

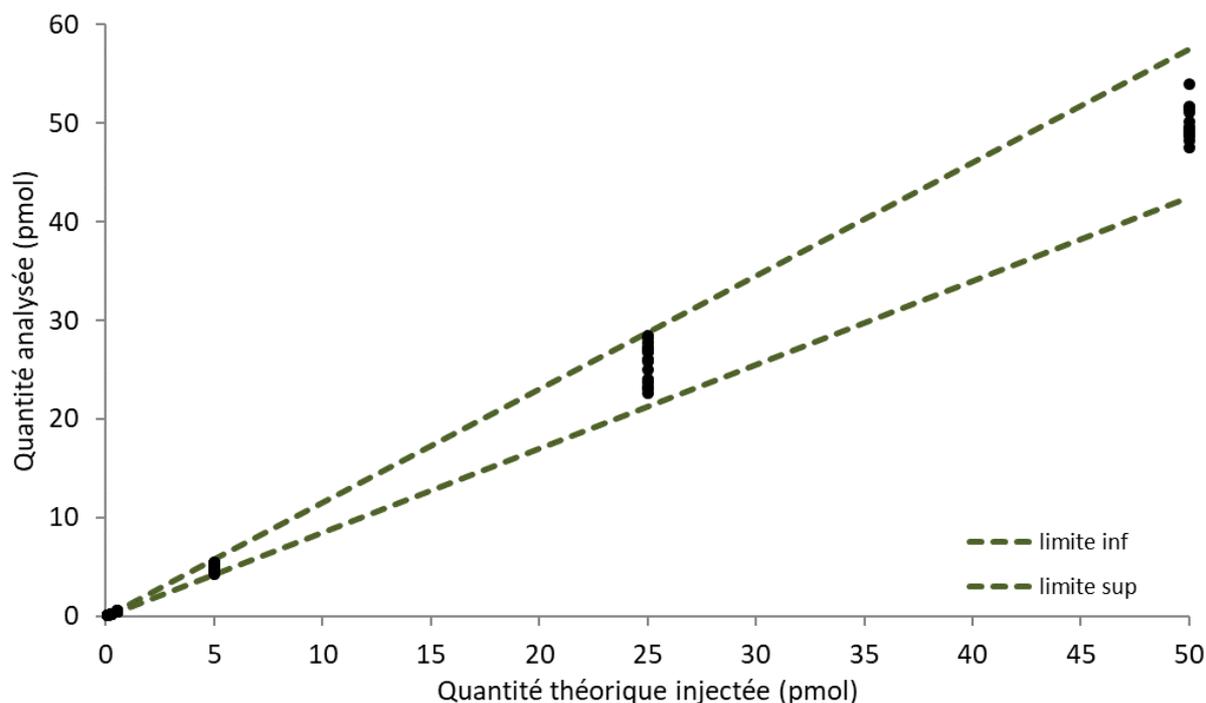


Figure 44 : Analyse des étalons de la droite d'étalonnage du GSH-CEES trois jours différents ($n=15$). Les limites (inférieure et supérieure) sont fixées à $\pm 15\%$ de la quantité d'étalon attendue.

1.6.2. La spécificité

L'étude de la spécificité permet de s'assurer que le signal de l'analyte détecté correspond bien à celui recherché. La spécificité peut être dégradée par la présence d'interférents, les risques de faux positifs et de vrais négatifs. Pour cela, des matrices blanches de milieu de culture ont été analysées ainsi que des matrices blanches de milieu de culture dopées avec les SI. Dans tous les cas, il n'y avait la présence d'aucun interférent aux temps de rétention des standards. Il n'y a pas eu d'effet mémoire, *carryover*, même après les concentrations les plus élevées en standards. L'effet mémoire est une contamination inter-échantillons *i.e.* une partie des analytes d'un échantillon est élué avec les échantillons suivants.

Les critères de sélection d'un analyte, au moment de l'intégration des pics, sont : l'adéquation du temps de rétention de l'analyte avec le temps de rétention du SI, les trois ions fils de chaque analyte qui doivent être détectables et dans les ratios attendus (ratio des ions fils dans les standards).

1.6.3. La fidélité

L'étude de la fidélité permet de s'assurer que les résultats de plusieurs analyses d'un même échantillon sont équivalents. Elle est estimée par l'intermédiaire du calcul des coefficients de variation (CV), c'est-à-dire le ratio entre l'écart-type et la moyenne. Sur un minimum de 3 séries de 5 répliquats, la valeur de CV observée doit être inférieure à 15%. Pour la valeur de concentration correspondant à la LOQ, cette valeur est tolérée jusqu'à 20% d'après la FDA. La fidélité se décompose en deux parties : la répétabilité et reproductibilité intra laboratoire. Ainsi, la répétabilité, encore appelée la précision intra-jour, est obtenue en analysant des répliquats d'échantillons de même concentration, préparés indépendamment un jour donné par le même manipulateur, avec le même équipement, analyses sur le même appareil de mesure, dans les mêmes conditions analytiques. La reproductibilité intra-laboratoire, encore appelée précision inter-jour, est obtenue en injectant des répliquats d'échantillons de même concentration préparés dans des conditions d'expérience différentes de celles qui ont permis d'évaluer la précision intra-jour.

Pour étudier ces variations intra-jour et inter-jour, un blanc, un blanc avec les SI et les six points de la gamme contenant la LOQ ont été analysés 5 fois lors d'une même série. Trois séries similaires ont été analysés à des jours différents. Tout d'abord, une analyse des variances des 3 séries a été faite par un test ANOVA afin de vérifier que les trois séries sont équivalentes. Puis, la répétabilité a été évaluée grâce au calcul du CV de répétabilité noté CV_r. Pour finir, la précision inter-jour, de la même façon a été déterminé par le CV de fidélité intermédiaire noté CV_R. En accord avec les critères de la FDA, les variations intra-jour et inter-jour ne dépassent ni 15% ni 20% pour la plus faible concentration *Tableau 10*.

1.6.4. La justesse

La justesse est nécessaire pour retrouver une concentration de l'analyte proche de celle réellement présente dans l'échantillon. L'estimation de ce paramètre est faite en utilisant un échantillon dont la valeur réelle de concentration de l'analyte est connue (ajout de l'étalon dans une matrice blanche par exemple), et en la comparant à la valeur de concentration déterminée à l'aide de la méthode développée. Cette stratégie doit être répétée pour la totalité des points de gamme utilisés pour construire la droite de calibration, en utilisant 5 déterminations par point de concentration. La méthode sera validée du point de vue de l'exactitude si l'écart entre la valeur réelle et la valeur déterminée est en moyenne inférieure à

15%, et est tolérée jusqu'à 20% pour le point de concentration correspondant à la LOQ. D'après le **Tableau 10**, la justesse des différents standards respecte les critères de validation. Comme attendu, la justesse est la meilleure avec l'étalon 6 qui correspond à la concentration la plus élevée. La justesse se détériore avec des concentrations proches de la LOD comme avec l'étalon 1.

		Intra-jour (n=6)				Inter-jour (n=18)		
	Echantillon	Conc. (µM)	Conc. Calc. (µM)	Justesse (%)	CVr (%)	Conc. Calc. (µM)	Justesse (%)	CVR (%)
GSH-CEES	Etalon 1	0,1	0,11	111	9,6	0,10	101	13,9
	Etalon 6	50	49,3	99	4,0	49,6	99	3,9
Cys-CEES	Etalon 1	0,1	0,11	113	5,5	0,11	105	7,5
	Etalon 6	50	49,2	98	4,7	49,8	100	4,6
NAC-CEES	Etalon 1	0,1	0,11	114	8,2	0,10	104	11,8
	Etalon 6	50	49,5	99	5,8	49,8	100	5,5
N7Gua-CEES	Etalon 1	0,1	0,10	98	9,8	0,09	87,3	17,5
	Etalon 6	0.5	0,51	101	7,6	0.50	99	7,1

Tableau 10 : Validation statistique de la méthode. La concentration calculée, la justesse et la répétabilité du plus petit et du plus grand point de la gamme sont présentés.

1.6.5. Limite de détection (LOD) et Limite de Quantification (LOQ)

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été établis pour chaque standard en utilisant la méthode de détermination des blancs, « blank determination », décrite par Shrivastana *et al.* [183]. Pour cela, il faut analyser des matrices blanches seulement dopée par les SI. Le bruit de fond de la détection est intégré sur les chromatogrammes sur une petite fenêtre autour du temps de rétention de l'analyte ciblé. Ce dernier peut être déduit de celui du SI. Ainsi, la LOD est définie comme la valeur de bruit plus trois fois l'écart-type de ce bruit de fond. La LOQ est définie comme la valeur moyenne du bruit plus dix fois l'écart-type de ce bruit de fond. Par cette méthode, la LOD et la LOQ de la méthode développée ont été déterminés en analysant 18 échantillons blancs de milieux de cultures dopés par les SI. Les LOD obtenues sont 9, 48, 46 et 37 fmol pour GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES respectivement. Les LOQ correspondantes sont 22, 111, 120 et 88 fmol.

1.6.6. La stabilité

L'étude de la stabilité des standards dans les matrices permet d'identifier les conditions de stockage dans lesquelles les analytes sont stables et celles où ils se dégradent. Dans les milieux de culture gardés à -20°C, après 6 mois, les standards sont stables à l'exception de N7Gua-CEES qui s'est dégradé à hauteur de 50%. Par contre, après 1 mois de congélation, aucune gradation n'est observée.

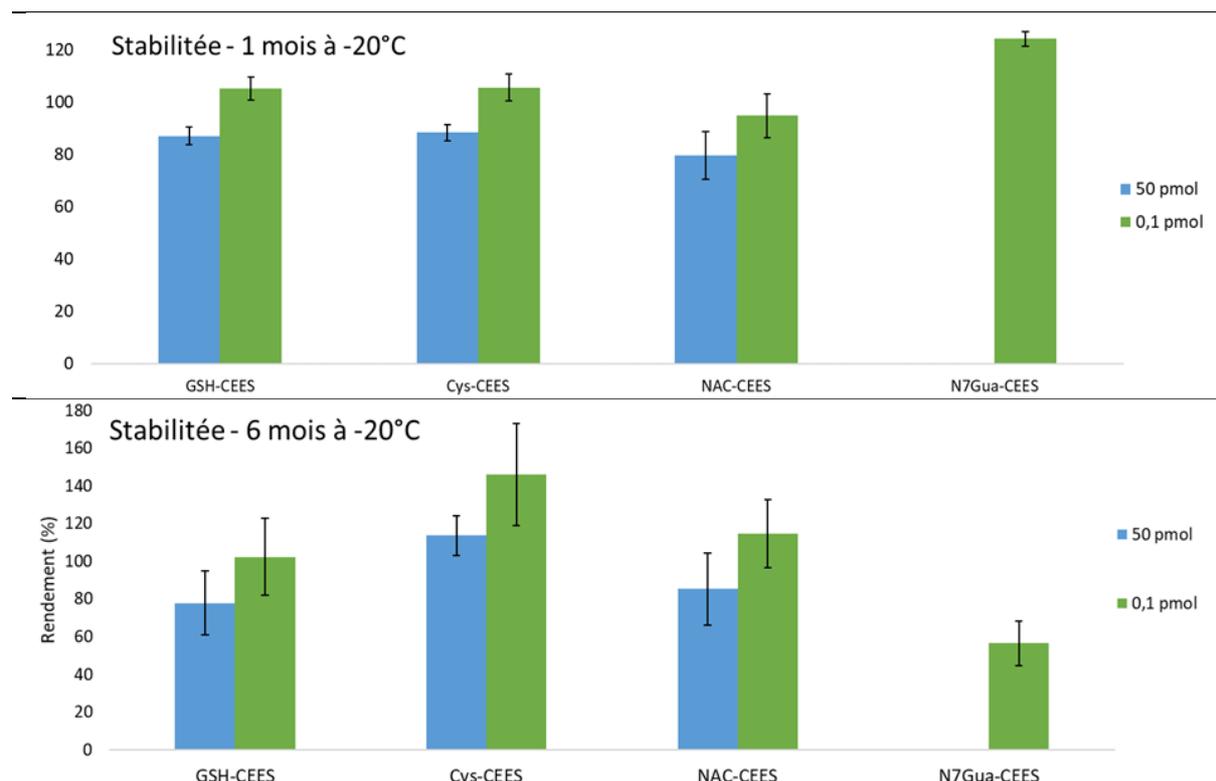


Figure 45 : Recouvrement des standards dans du milieu de culture après conservation 1 mois ou 6 mois à -20°C. N7Gua-CEES n'a pas été mis dans l'échantillon à 50 pmol. Les données représentées sont la moyenne \pm EC ($n=4$ pour 6 mois ; $n=3$ pour 1 mois).

1.7. Bilan

L'ensemble des outils d'analyse ont été mis en place pour être capable d'analyser dans des milieux de culture les biomarqueurs choisis : GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES. En effet, nous disposons, après synthèse, de solutions calibrées de leur standard. La préparation d'échantillon permet d'avoir un rendement supérieur à 60%. Les paramètres en chromatographie liquide et en spectrométrie de masse ont été optimisés afin de

pouvoir valider la méthode. Le développement de cette méthode a fait l'objet d'une publication [97]. Cette méthode a été utilisée pour quantifier les biomarqueurs du CEES dans les milieux de culture de cellules humaines immortelles HaCaT traitées au CEES afin de vérifier que ces biomarqueurs sont formés et excrétés par ces cellules.

2. Etude de la formation et de l'excrétion des biomarqueurs du CEES dans les cellules HaCaT.

La peau est un des organes les plus touchés par l'ypérite. C'est pourquoi, les premières expériences *in vitro* ont été réalisées avec une lignée cellulaire immortalisée de kératinocytes, les HaCaT. Les kératinocytes sont les principales cellules de l'épiderme, la couche supérieure de la peau (*Figure 3*). A la suite des traitements, les milieux de culture sont analysés. C'est pour cela qu'il a été décidé de réaliser le traitement dans du PBS et non dans du milieu de culture. Ce dernier contient de nombreux nutriments et acides aminés qui peuvent directement réagir avec le CEES. Cela peut engendrer la détection de conjugués, comme Cys-CEES, qui ne sont pas d'origine cellulaire. Au lieu de traiter les cellules dans leur milieu de culture sur des temps longs et avec de faibles concentrations en CEES, de l'ordre du micro ou du nanomolaire [113] comme couramment pratiqué en toxicologie, les cellules ont été traitées dans du PBS contenant des concentrations importantes de CEES sur un temps court, de 30 minutes (*Figure 47*). Il faut remarquer que lors d'intoxication réelle, la peau est exposée à des gouttelettes d'ypérite pure et donc à des concentrations locales très élevées. Les cellules sont ensuite mises en incubation dans du milieu de culture « frais ». L'analyse des milieux de culture par la méthode validée (Chapitre 1) permet de s'assurer que les adduits et des conjugués formés dans les cellules peuvent se retrouver dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la pertinence des biomarqueurs choisis : l'adduit N7Gua-CEES et les métabolites de la voie de l'acide mercapturique : GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES est évaluée.

1.1. Optimisation des conditions de traitement des cellules

Les cellules HaCaT sont des kératinocytes humains immortalisés mutés p53, adhérentes. La gamme de concentrations de CEES appliquée aux cellules a été déterminée par des tests de cytotoxicité au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Le principe de ce test est basé sur l'activité métabolique. Une augmentation ou une diminution du nombre de cellules viables est linéairement liée à l'activité métabolique. Elle est corrélée avec la conversion du sel de tétrazolium MTT en cristaux de formazan qui peuvent être solubilisés pour une mesure homogène. Ainsi, toute augmentation ou diminution du nombre de cellules viables peut être détectée en mesurant la concentration de formazan par

spectrophotométrie en utilisant un lecteur de plaques à 570 nm. Nous avons utilisé ce test pour définir une concentration en CEES assez élevée pour que la production de biomarqueurs soit significative, sans que la cytotoxicité soit trop élevée. Le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé par rapport aux cellules de contrôle non traitées au CEES. Un taux de survie minimum a été fixé. Pour le test, les cellules ont été traitées pendant 30 min avec différentes concentrations en CEES (de 0 à 100 mM) dans du PBS (voir détails des conditions du test dans la Partie Conditions Expérimentales p.226). Ensuite les cellules ont été incubées pendant 24h à 37°C avant d'ajouter le MTT. Après 24h, les taux de survie mesurés étaient supérieurs à 80% jusqu'à 5 mM de CEES (Figure 46). Une concentration en CEES de 10 mM engendre la survie de seulement 4,3 % \pm 1,0 des cellules. Les traitements des cellules HaCaT pour l'analyse des milieux de culture ont été faits avec des concentrations de CEES comprises entre 0 et 10 mM.

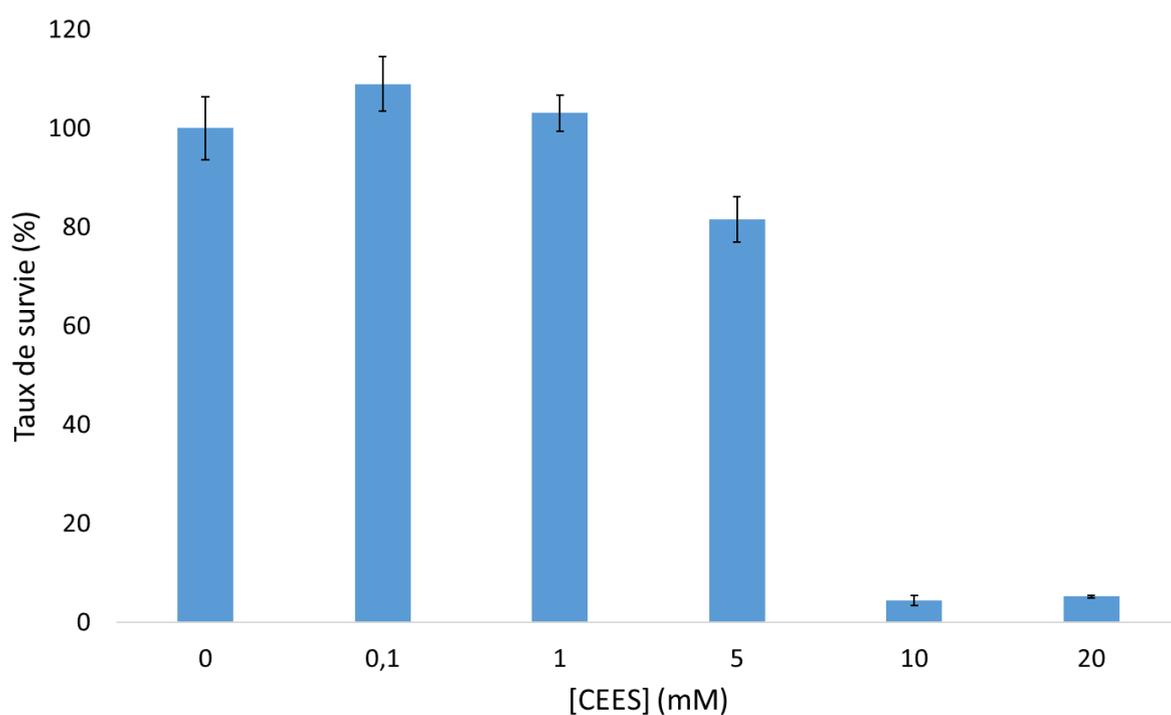


Figure 46 : Taux de survie des cellules HaCaT après un test de cytotoxicité au MTT après traitement au CEES. Les cellules ont été traitées pendant 30 min avec différentes concentrations en CEES dans du PBS. Elles ont été incubées pendant 24h à 37°C avant ajout du MTT. Les données au-delà de 20 mM ne sont pas montrées car le taux de survie est similaire à 10 et 20 mM. Les données représentées sont la moyenne \pm EC (n=6).

Après décongélation d'une ampoule de cellules HaCaT et mise en culture, elles ont été amplifiées (détails dans la Partie Conditions Expérimentales p. 225). Un passage, au minimum, a été réalisé avant traitement pour réaliser des expériences plus reproductibles. Les cellules ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre pour les expositions. Les HaCaT se multiplient en monocouche pour former un tapis cellulaire. Lorsque les cellules sont confluentes à 80% les traitements peuvent être réalisés. Le choix a été de réaliser des traitements avec des doses importantes en CEES sur des temps courts dans du PBS. Ils ont été faits avec trois ou quatre répliquats pour chaque concentration de CEES (0 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mM). Trois traitements ont été faits dans les mêmes conditions. Avant chaque traitement, le milieu de culture a été enlevé, puis remplacé par 3 mL de PBS, contenant les différentes concentrations de CEES. Le temps d'exposition est de 30 min. Ensuite, après deux lavages au PBS pour enlever toutes traces de CEES, les cellules ont été remises dans du milieu de culture pour assurer leur survie. Elles ont été incubées 6h à 37°C afin de les laisser agir et métaboliser le CEES. Pour finir, le milieu a été collecté et conservé à -20°C, avant d'être purifié par SPE. De leur côté, les cellules ont été récoltées par action de la trypsine, rinçage et centrifugation. Les culots de cellules ont été ainsi congelés à -20°C avant extraction de leur ADN.

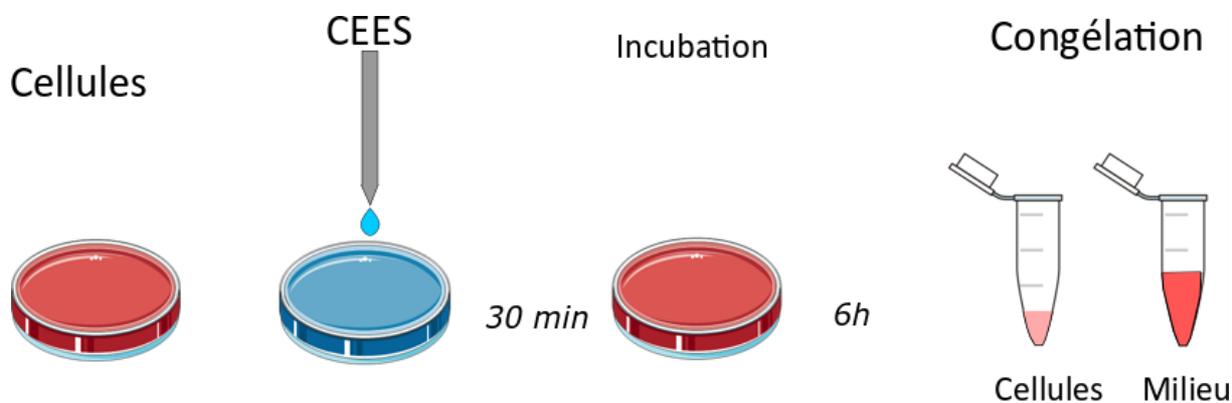


Figure 47 : Représentation schématique des différentes étapes des traitements des cellules HaCaT par du CEES.

1.2. Etude de la formation des dommages à l'ADN

Pendant le traitement, lorsque les cellules sont dans le PBS contenant du CEES, ce dernier entre dans les cellules. Il peut alkyler de nombreuses biomolécules dont l'ADN. De nombreux adduits à l'ADN sont ainsi formés. Par rapport à l'ypérite, le CEES ne peut pas produire des

bi-adduits, donc pas de pontages. Par contre, peuvent être formés l'adduit à la position N7 de la guanine (N7Gua-CEES), l'adduit à la position N3 de l'adénine. Seul l'adduit N7Gua-CEES a été quantifié car il est le plus abondant. C'est également le cas avec des traitements à l'ypérite [59, 179].

L'extraction de l'ADN des cellules HaCaT, selon des protocoles couramment utilisés au laboratoire, et l'analyse par UHPLC-MS/MS, permettent de détecter l'adduit N7Gua-CEES. Les nucléosides normaux ont été quantifiés de la même façon grâce à un détecteur UV situé en amont de spectromètre de masse. La quantité d'adduit s'exprime par le ratio du nombre d'adduits par million de nucléosides normaux. Ce calcul permet de normaliser les résultats car la quantité d'ADN, donc de bases normales varie d'un traitement à un autre. Le biomarqueur N7Gua-CEES a été détecté à toutes les conditions des traitements, même avec la concentration en CEES la plus faible (1 mM). La formation de N7Gua-CEES est dose-dépendante (*Figure 48*). La formation de ce biomarqueur augmente proportionnellement avec la concentration en CEES. La présence de ces adduits dans l'ADN laisse supposer qu'il est possible d'en détecter dans le milieu extracellulaire par dépurination et/ou élimination par les mécanismes de réparation de l'ADN.

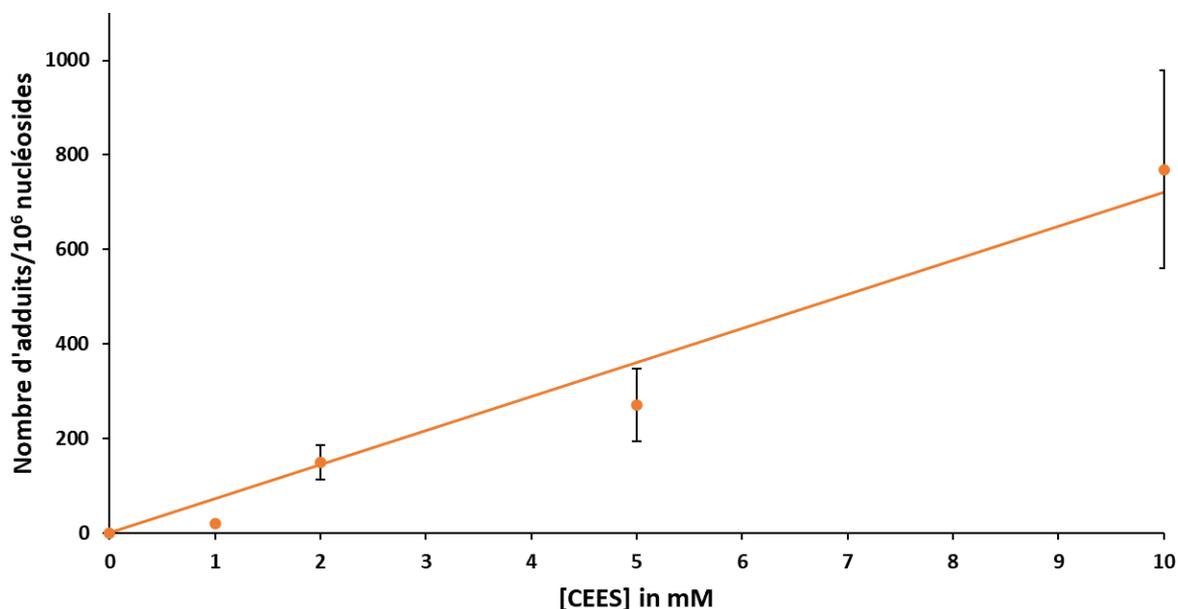


Figure 48 : Variation du niveau du biomarqueur N7Gua-CEES dans l'ADN des cellules HaCaT traitées par du CEES. Les cellules ont été en présence de CEES concentré à 1 / 2 / 5 et 10 mM pendant 30 minutes avant d'être incubées pendant 6h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=7$ pour 1 mM et $n=11$ pour 2 / 5 / 10 mM).

1.3. Présence de l'adduit N7Gua-CEES dans le milieu de culture

Les milieux de culture collectés ont été analysés par la méthode UHPLC-MS/MS après purification par la méthode de SPE validée précédemment. Le biomarqueur N7Gua-CEES y a été détecté (*Figure 49*). La présence de cet adduit peut être expliquée par différents mécanismes. Tout d'abord, les adduits à la position N7 de la guanine sont connus pour être peu stables, ils se dépurinent spontanément [12]. Cette réaction libère la base alkylée N7Gua-CEES et forme un site abasique au niveau de l'ADN [12, 13]. Il peut y avoir les mêmes réactions au niveau de l'ARN endommagé par du CEES [2] et au niveau de la déoxyguanosine triphosphate (dGTP). C'est un déoxyribonucléotide précurseur de l'ADN constitué de résidus de guanine et de 2-désoxyribose lié à un groupe triphosphate qui se trouve dans le *pool* de nucléotides. D'autre part, les adduits à la position N7 de l'ADN peuvent être éliminés par les mécanismes de réparation de l'ADN tel que le BER et le NER [14]. Sa concentration dans les milieux de culture est dose-dépendante, comme l'était le niveau d'adduits dans l'ADN. La quantité d'adduits augmente avec la dose de CEES. Il est spécifique puisqu'il n'a pas été détecté dans les milieux de culture de cellules non traitées. De plus, l'adduit libre N7Gua-CEES ne se dégrade pas pendant 24h à 37°C dans le milieu de culture des HaCaT (*Figure 50*).

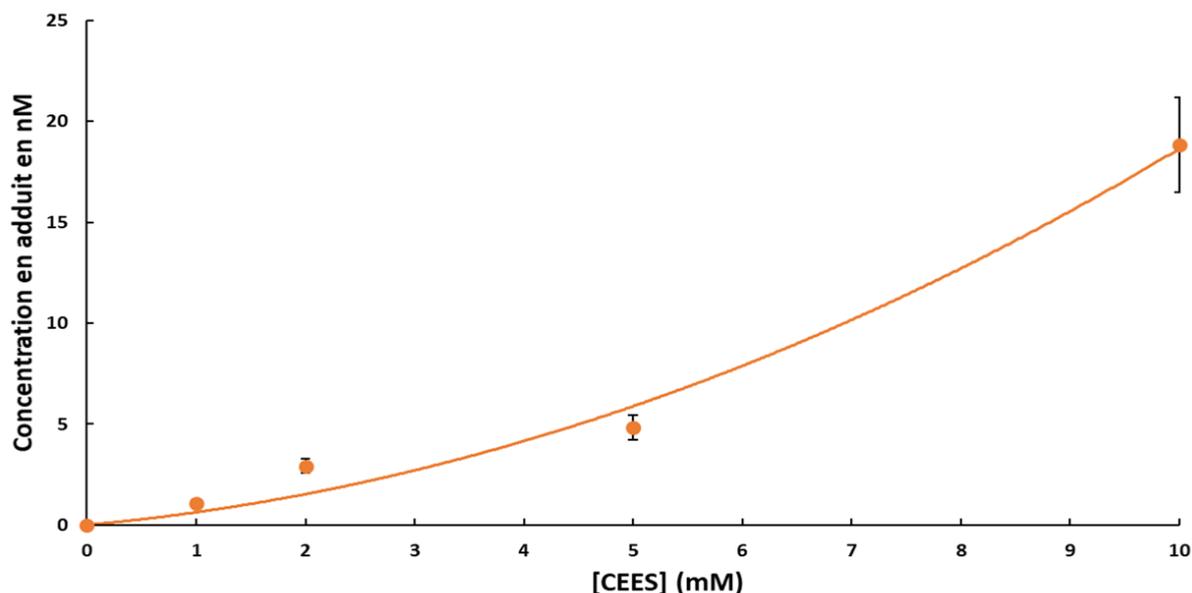


Figure 49 : Concentration du biomarqueur N7Gua-CEES dans les milieux de culture des cellules HaCaT traitées par du CEES. Les cellules ont été en présence de CEES concentré à 1 / 2 / 5 et 10 mM

pendant 30 minutes avant d'être incubées pendant 6h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=7$ pour 1 mM et $n=11$ pour 2 / 5 / 10 mM).

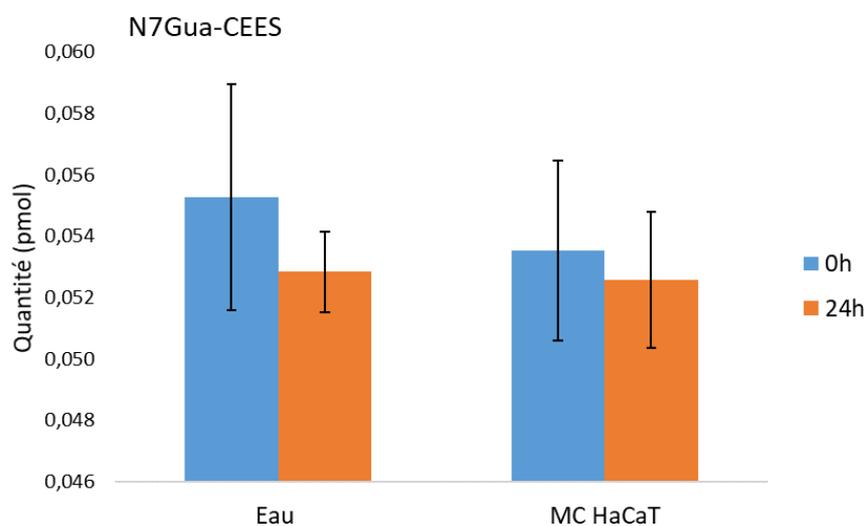


Figure 50 : Etude de la stabilité de l'adduit libre N7Gua-CEES dans le milieu de culture des cellules HaCaT pendant 24h à 37°C en présence des autres biomarqueurs. Les données sont les moyennes \pm CV ($n=3$).

1.4. Etude de la métabolisation du CEES *via* la voie des acides mercapturiques

Les milieux collectés ont été analysés par la méthode validée UHPLC-MS/MS après purification par SPE. Les biomarqueurs Cys-CEES et GSH-CEES (**Figure 51**) ont été détectés en quantités plus élevées que le biomarqueur N7Gua-CEES (**Figure 49**). Par contre, le biomarqueur NAC-CEES n'a pas été détecté lors de ces expériences cellulaires *in vitro*. Comme la formation de NAC-CEES est la dernière étape de la voie de métabolisation de la voie de l'acide mercapturique, nous pouvons conclure que les cellules HaCaT n'expriment pas toutes les enzymes impliquées dans cette voie de métabolisation. Les quantités de GSH-CEES et Cys-CEES dans les milieux de culture augmentent avec la dose. De plus, pour toutes les concentrations de CEES, la concentration en Cys-CEES est plus importante que celle de GSH-CEES. Le ratio entre les concentrations en Cys-CEES et GSH-CEES varie en fonction de la dose de CEES utilisée pour le traitement. Ce ratio est de 4,5 pour la dose la plus faible alors qu'il est de 2 pour la dose la plus élevée. Cette variation se reflète dans les courbes qui montrent la quantité de biomarqueurs en fonction de la concentration en CEES (**Figure 51**). La courbe du Cys-CEES est relativement linéaire alors que celle du GSH-CEES est plus quadratique. Cela

peut être expliqué par une saturation de l'activité enzymatique du GGT lorsque la dose de CEES dépasse une certaine valeur ou par la dégradation du conjugué dans les milieux de culture. A noter que les biomarqueurs choisis sont bien spécifiques du CEES puisqu'ils n'ont pas été détectés dans les milieux de culture de cellules non traitées.

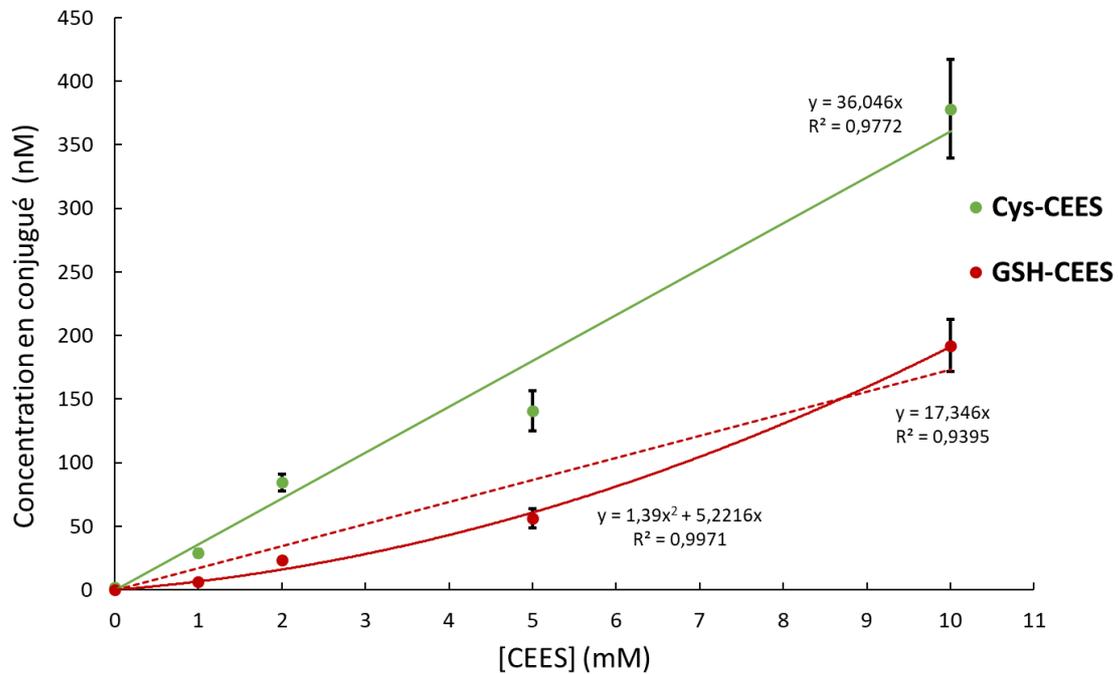


Figure 51 : Quantification des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES dans les milieux de culture des cellules HaCaT traitées par du CEES. Les cellules ont été en présence de CEES concentré à 1 / 2 / 5 et 10 mM pendant 30 minutes avant d'être incubées pendant 6h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=7$ pour 1 mM et $n=11$ pour 2 / 5 / 10 mM).

La stabilité des conjugués pendant 24h à 37°C dans le milieu de culture des HaCaT a été étudiée en ayant mis les biomarqueurs ensemble dans les milieux. La **Figure 52** montre que le conjugué GSH-CEES se dégrade dans ce milieu de culture. *A contrario*, la quantité de Cys-CEES augmente légèrement. Le conjugué NAC-CEES est stable dans ce milieu de culture. Cela confirme l'hypothèse, qu'il n'a pas été détecté lors des traitements parce qu'il n'est pas formé et non parce qu'il se dégrade très rapidement dans le milieu de culture.

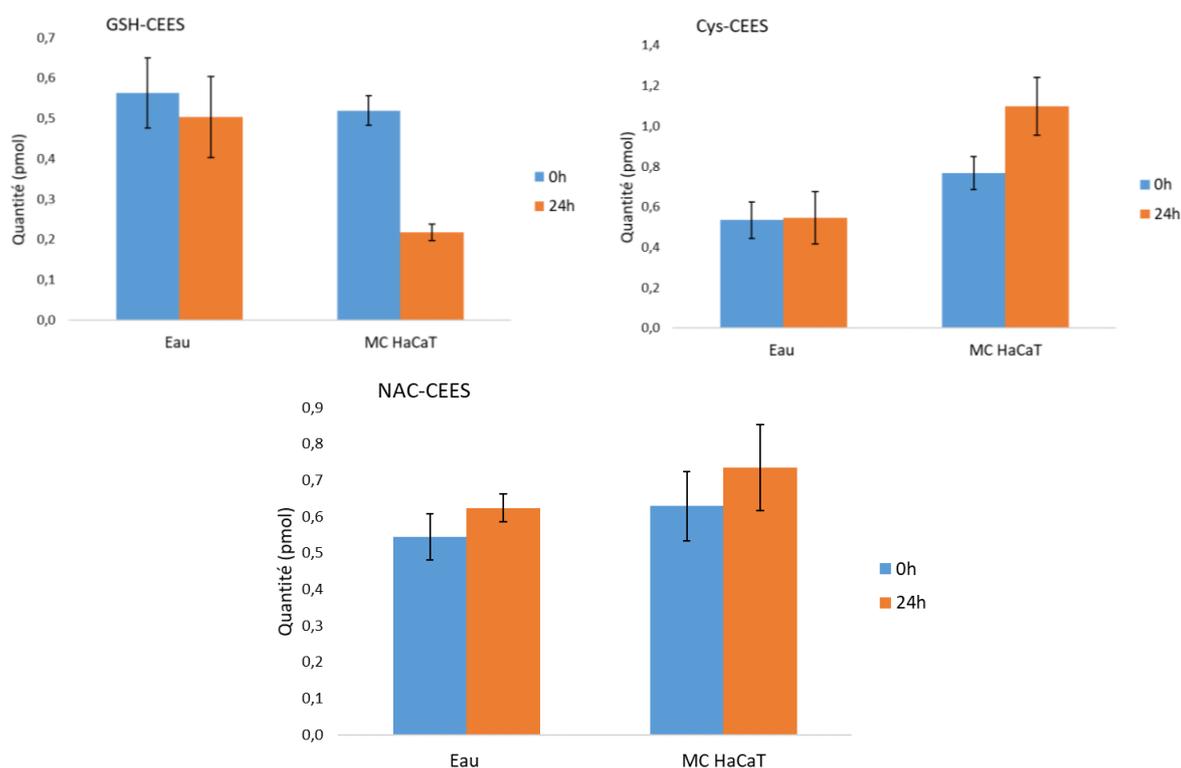


Figure 52 : Etude de la stabilité des conjugués GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES dans le milieu de culture des cellules HaCaT pendant 24h à 37°C en présence des autres biomarqueurs. Les données sont les moyennes \pm CV (n=3).

1.5. Bilan

Les traitements des cellules HaCaT par du CEES ont permis de valider biologiquement trois des quatre biomarqueurs sélectionnés. Nous avons tout d'abord pu montrer que l'adduit N7Gua-CEES est formé dans l'ADN nucléaire, ce qui avait déjà été fait. Sa détection dans le milieu de culture des cellules intoxiquées, montrant son excrétion, est nouvelle. Nous avons également retrouvé dans le milieu de culture les biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES. Les cellules HaCaT métabolisent donc le CEES *via* la voie de l'acide mercapturique. De plus, les produits de ces réactions biochimiques sont excrétés par les cellules pour se retrouver dans le milieu extracellulaire. Tous ces biomarqueurs sont spécifiques dans les milieux. Leur quantité reflètent la dose de CEES appliquée aux cellules. Le biomarqueur NAC-CEES n'a pas été détecté dans les milieux de culture même avec la dose de CEES la plus élevée. Dans ce modèle biologique, a priori l'enzyme N-acétyl-transférase n'est pas exprimée donc le métabolite Cys-CEES n'est pas converti en l'acide mercapturique. Ces résultats sont présents dans une publication [97]. Pour continuer dans la validation des biomarqueurs choisis, il est nécessaire

de vérifier leur présence après un traitement d'explant de peau humaine. Ce modèle biologique est plus proche de la réalité qu'une seule lignée de cellules. Ces expériences permettent de vérifier que les biomarqueurs formés diffusent bien à travers la peau pour se retrouver dans des fluides biologiques.

3. Pertinence des biomarqueurs du CEES dans des explants de peau humaine.

Dans le but de nous rapprocher de contaminations humaines, des explants de peau humaine ont été utilisés lors de nouveaux traitements avec du CEES. Ils représentent un modèle adapté en toxicologie cutanée. En particulier, ils nous intéressent pour l'étude de réaction de métabolisation de phase II de toxiques exogènes. En effet, il est connu que la peau exprime, entre autres, des enzymes pouvant catalyser des réactions de glucurono-conjugaison, de sulfatation, ou de conjugaison au glutathion [184]. L'objectif de cette partie du travail est de vérifier la formation des biomarqueurs choisis et d'étudier leur persistance à court terme après diffusion du CEES à travers de la peau humaine *in vitro*. Les explants ont été traités, de façon topique, avec différentes doses de CEES. Les explants, en présence de milieu de culture, ont été incubés jusqu'à 24h. Les milieux de culture ont été analysés afin d'y quantifier GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES. L'hypothèse sous-tendant ce travail est que les biomarqueurs présents dans les milieux seraient susceptibles d'être aussi présents dans les fluides biologiques *in vivo*, spécialement le plasma. Les explants ont été broyés et digérés pour quantifier l'adduit N7Gua-CEES dans l'ADN nucléaire. La mesure de cet adduit au sein de l'ADN sert de référence et d'élément de comparaison car la formation de cet adduit après exposition à l'ypérite *in vitro* et *in vivo* est mieux connue que celle des métabolites de la voie de l'acide mercapturique.

3.1. Optimisation des conditions de traitement des explants de peau

La peau humaine a été obtenue immédiatement après une opération de chirurgie plastique mammaire de patientes saines. Tous les donneurs sont Caucasiens, leur peau a un phototype II ou III selon la classification de Fitzpatrick. Après l'intervention chirurgicale, la peau a été transportée jusqu'au laboratoire à température ambiante dans des tubes de 50 mL. Afin de préserver au maximum la capacité métabolique de la peau, nous avons eu une attention particulière à utiliser la peau la plus « fraîche » possible. Les traitements ont été réalisés le jour même de l'opération ou le lendemain matin. En aucun cas, la peau n'a été congelée avant traitement car la congélation est néfaste pour les activités métaboliques. Lors

d'une étude, il a été montré que la peau décongelée avait perdu par exemple son activité de glucurono-conjugaison [185].

La peau a été préparée en la désinfectant et en enlevant la couche de gras par grattage sans retirer ni le derme ni l'épiderme (détails dans la Partie Conditions Expérimentales p.232). Les explants de peau ont été faits à l'aide d'un trépan appelé communément « punch », stérile à usage unique, qui correspond à un bistouri circulaire qui permet de récupérer une carotte de peau de 12 mm de diamètre. Les explants de peau ont été placés, côté derme vers le bas, dans des inserts ThinCert™ (*Figure 53*). Le fond des inserts est composé d'une membrane poreuse permettant des échanges efficaces entre les compartiments. Ces inserts ont été mis dans des plaques multi-puits de 12 puits. Le milieu de culture (600 µL) a été ajouté dans les puits sous les inserts. Le volume a été fixé de façon à ce que le milieu de culture soit juste en contact avec la membrane inférieure de l'insert sans mouiller le dessus de l'explant. Avec un volume supérieur, du CEES risque de couler directement dans le milieu.

Comme pour les cellules HaCaT, les doses de CEES appliquées aux explants ont été définies afin de s'assurer de l'activation des voies de métabolisation sans nuire de façon significative à la viabilité des cellules. Nous avons décidé d'appliquer des doses similaires à celles des traitements cutanés de souris réalisés avec l'ypérite par Batal *et al.* [30]. Il avait utilisé 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite, soit des doses de 0,25 ; 0,75 et 7,55 µmol pour des animaux de 20 g. La gamme finale de travail choisie a été 0 ; 0,08 ; 0,16 ; 0,40 µmol de CEES (*Figure 54*). A noter que des essais préliminaires (non discutés ici) ont été faits avec des doses comprises entre 0 et 250 mg/kg. Le CEES en solution dans 5 µL de dichlorométhane a été déposé sur la peau (face épiderme). Un volume de dépôt de 10 µL est déjà trop important car une partie de CEES déborde dans le milieu de culture. Un volume inférieur à 5 µL risque d'être moins reproductible.

Ensuite, les biopsies ont été incubées à 37°C. Trois temps d'incubation ont été choisis : 1 h, 6 h et 24 h. Après ces temps, le milieu des échantillons a été récupéré et directement congelé à -20°C avant la purification par SPE. Les biopsies de peau ont été aussi congelées à -20°C jusqu'à extraction de leur ADN. Ces expériences ont été faites avec deux donneurs, en effectuant des tripliquâts pour chacun.



Figure 53 : Photo des plaques multi-puits avec des inserts et du milieu de culture dans les puits (Photo de Dutscher).

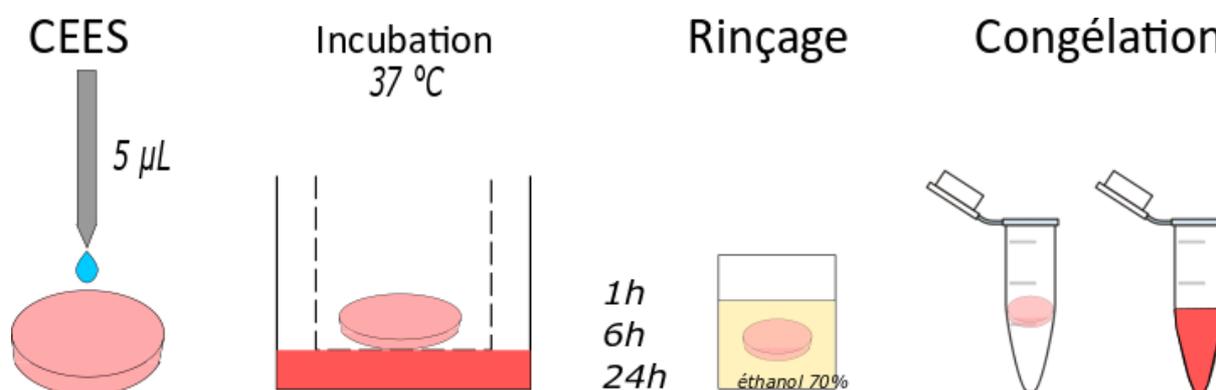


Figure 54 : Représentation schématique des différentes étapes des traitements des explants de peau humaine par du CEES.

3.2. Formation de dommages à l'ADN dans la peau après exposition au CEES

Comme lors du traitement des cellules HaCaT, le nombre d'adduits N7Gua-CEES dans l'ADN a été quantifié. Même avec la dose la plus faible de CEES (0,08 μmol), des adduits N7Gua-CEES sont présents dans l'ADN après 1h d'incubation (**Figure 55**). La présence de l'adduit N7Gua-CEES dans l'ADN nucléaire au bout d'1h confirme que le CEES, comme l'ypérite, pénètre rapidement dans les cellules de la peau de par son caractère lipophile [20]. L'ADN est endommagé très peu de temps après l'exposition. Comme ces expériences sont réalisées avec de la peau isolée *i.e.* sans système sanguin, le CEES se diffuse peu et atteint sans doute une concentration relativement stable dans l'explant au cours du temps. C'est peut-être

la raison pour laquelle la quantité de N7Gua-CEES dans l'ADN n'augmente pas pendant les 24h suivant le traitement. Plus précisément, les quantités mesurées lors des premières 24h, quelque soit la quantité de CEES déposée sur la peau (0,08 ou 0,16 ou 0,4 μmol), sont équivalentes. Les mesures entre 1h, 6h, et 24h ne sont pas statistiquement différentes. Au contraire, il y a bien des différences significatives entre les différentes doses de CEES. Une exposition à 0,08 ou 0,4 μmol n'induit pas des quantités équivalentes d'adduits. Nous n'avons pas observé un effet du temps mais un effet de la dose dans nos conditions d'exposition.

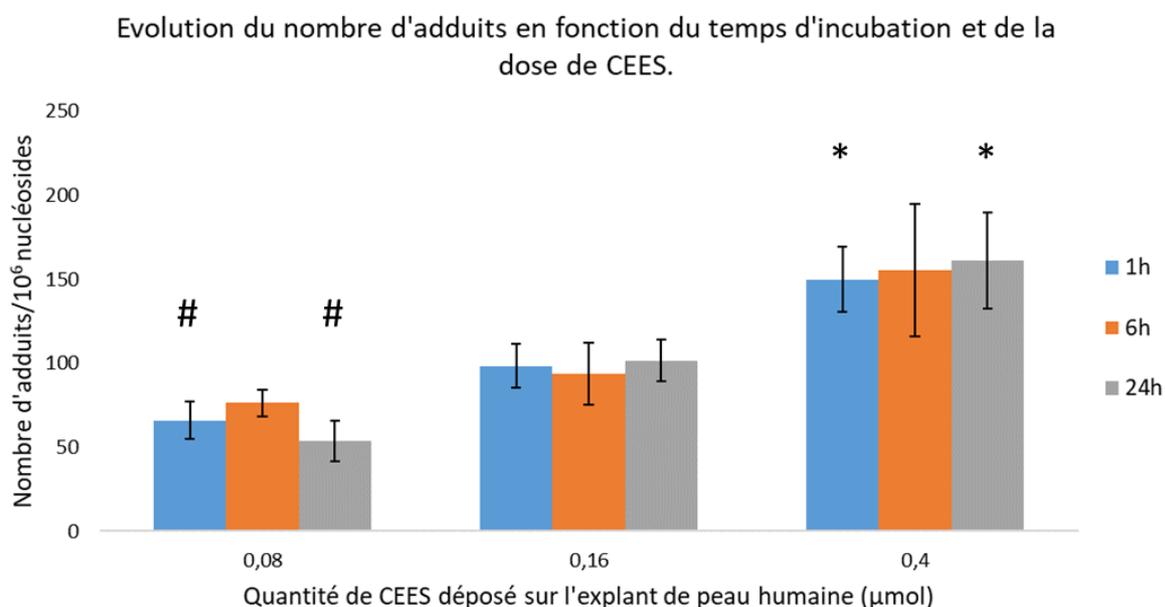


Figure 55 : Evolution du nombre d'adduits N7Gua-CEES en fonction du temps d'incubation et de la dose de CEES après exposition d'explants de peau humaine par du CEES. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=6$). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes pour $p<0,05$: * pour la comparaison avec la dose 0,08 μmol ; § pour la comparaison avec la dose 0,16 μmol ; # pour la comparaison avec la dose 0,4 μmol .

3.3. Excrétion de l'adduit N7Gua-CEES par les cellules de la peau humaine

Après analyse de l'ADN pour quantifier ses adduits, les milieux de culture ont été analysés afin d'y quantifier N7Gua-CEES. Ils ont été collectés après différents temps d'incubation (1h, 6h, 24h). Les échantillons ont été purifiés par la méthode validée SPE-UHPLC-MS/MS. L'adduit N7Gua-CEES a été détecté dans les milieux à partir de 6h d'incubation et non avant *i.e.* il n'est pas présent au temps d'incubation de 1h (**Figure 56**). Cette observation a été faite pour toutes les doses de CEES (0,08 ; 0,16 et 0,4 μmol). Sa quantité

augmente fortement avec le temps jusqu'à 24h après l'exposition. Comme lors des traitements de cellules, la quantité de N7Gua-CEES dans le milieu de culture est dose-dépendante. Elle augmente avec l'augmentation de la dose de CEES. L'observation d'un temps de latence avant la présence d'adduits dans le milieu valide l'idée que l'adduit N7Gua-CEES présent dans les milieux provient des adduits formés dans l'ADN, ainsi que dans l'ARN et le *pool* de nucléotides. Ce passage des adduits de l'ADN à des adduits libres dans le milieu est aussi visible par l'arrêt de l'augmentation des adduits de l'ADN après 1h pour former un plateau. L'adduit N7Gua-CEES est donc excrété par les cellules de la peau humaine. De plus, ils se diffusent à travers l'épaisseur de la peau pour se retrouver dans les milieux. L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt de quantifier ce biomarqueur dans les fluides biologiques.

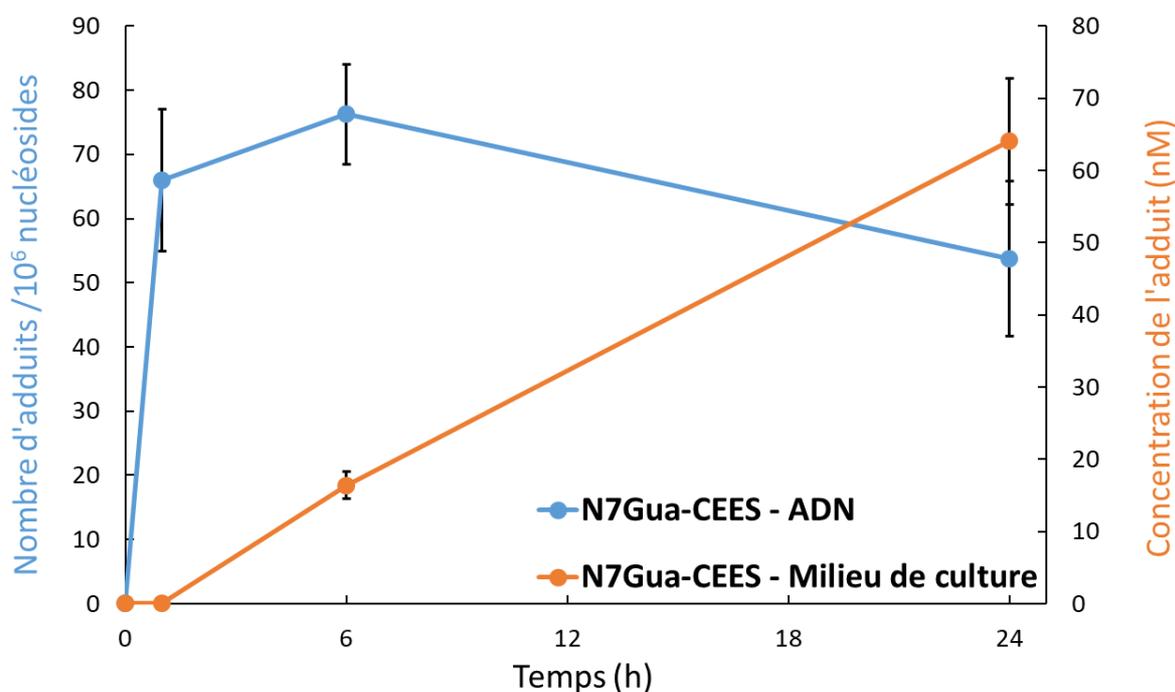
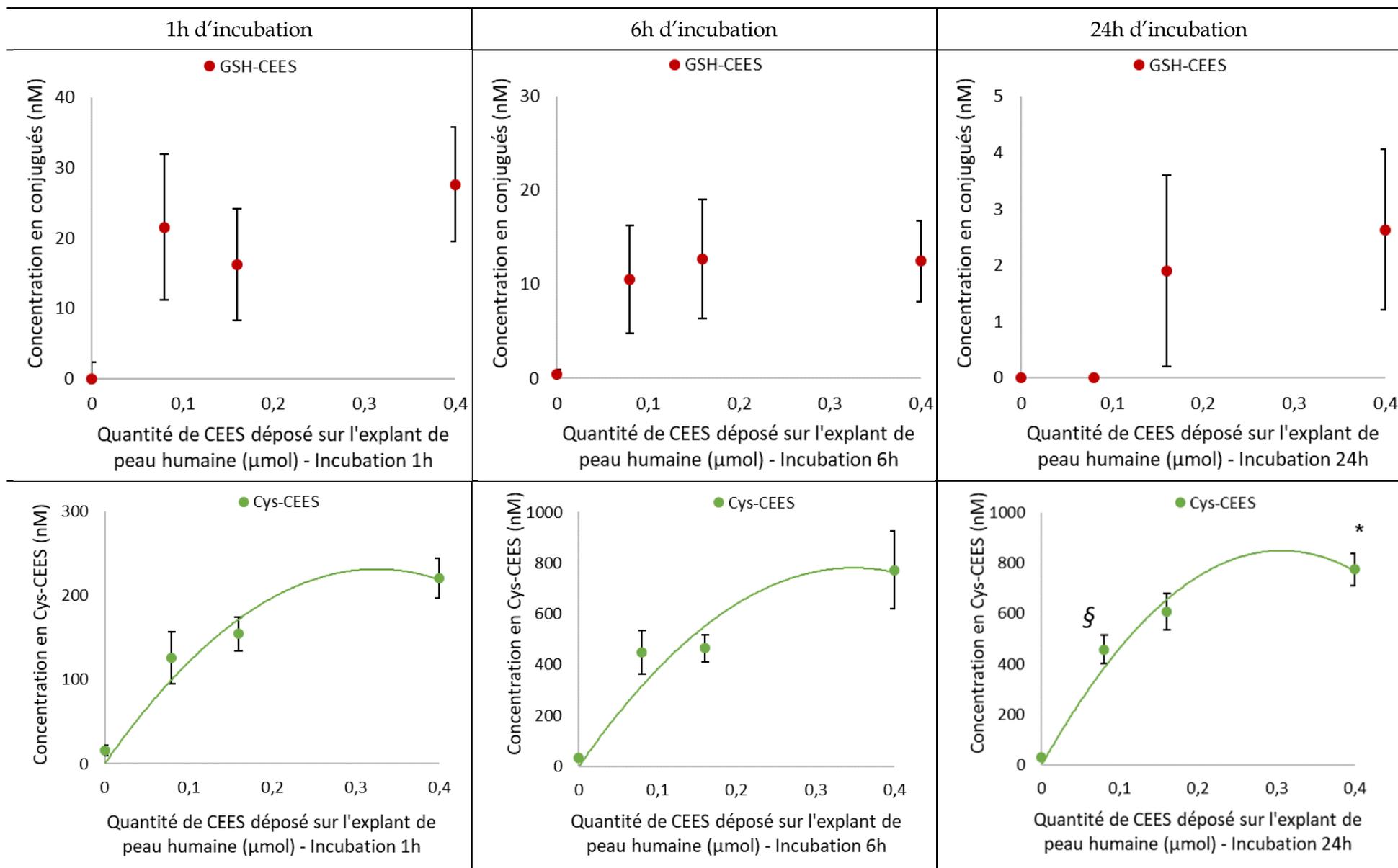


Figure 56 : Evolution du nombre d'adduit N7Gua-CEES dans les milieux de culture (courbe orange) et dans l'ADN (courbe bleue) des explants de peau humaine traités par 0,08 μmol de CEES. Les explants ont été incubés avec du milieu de culture soit pendant 1h soit 6h soit 24h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=6$).

3.4. Présence des biomarqueurs issus de la voie de métabolisation de l'acide mercapturique dans les milieux de culture.

Les milieux de culture, situés sous les explants de peau, ont été analysés par la méthode validée SPE-UHPLC-MS/MS. Les biomarqueurs de la voie de métabolisation de l'acide mercapturique ont été quantifiés afin de vérifier que ceux observés dans le milieu des HaCaT était également présent dans le milieu des explants. Une interrogation majeure était la capacité de ces métabolites à diffuser à travers la peau. Il est également intéressant de vérifier si le conjugué de l'acide mercapturique, NAC-CEES, est produit dans les explants de peau alors qu'il n'était pas présent dans les milieux des cellules HaCaT exposées au CEES. Comme lors des traitements des cellules HaCaT, GSH-CEES et Cys-CEES ont été détectés dans les milieux. A nouveau, le biomarqueur NAC-CEES n'y était pas présent. Que ce soit après un temps d'incubation de 1h, 6h, 24h, la quantité de GSH-CEES et Cys-CEES semble atteindre un plateau quand la dose de CEES augmente (*Figure 57*). Cette saturation peut venir de la limite de concentration de GSH libre dans les cellules et/ou de la saturation de l'activité enzymatique du glutathion-S-transférase.



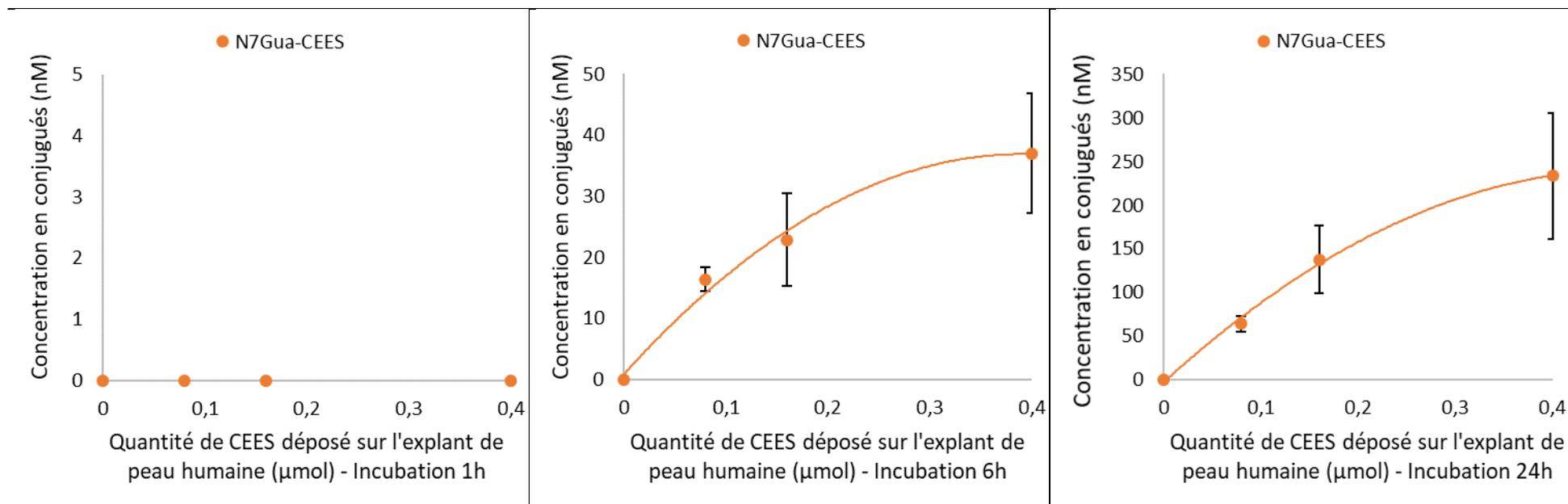


Figure 57 : Evolution de la concentration des biomarqueurs GSH-CEES, Cys-CEES et N7Gua-CEES dans les milieux de culture des explants de peau humaine traités par différentes doses de CEES (0,08 ; 0,16 et 0,4 μmol). Les explants ont incubé avec du milieu de culture pendant 1h ou 6h ou 24h. Les données représentées sont la moyenne ± SEM (n=6). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes pour $p < 0,05$ sont : * pour la comparaison avec 0,08 μmol; † pour la comparaison avec 0,16 μmol; § pour la comparaison avec 0,4 μmol.

3.5. Etude de la cinétique des biomarqueurs

La mesure des quantités de biomarqueurs au cours du temps montre que l'évolution du biomarqueur GSH-CEES est différente de celle du biomarqueur Cys-CEES (*Figure 58*). La concentration maximale de GSH-CEES dans les milieux se situe 1h après l'exposition puis diminue. Cette décroissance a été observée pour toutes les doses de CEES (0,08 ; 0,16 et 0,4 μmol). Au contraire, la concentration de Cys-CEES augmente jusqu'à 6h pour atteindre un plateau quel que soit la dose de CEES lors de nos traitements.

Suite à une exposition, le CEES pénètre dans les cellules de la peau et engendre des dommages comme des adduits à l'ADN dès la première heure après l'exposition. Le CEES réagit rapidement, avec ou non une catalyse enzymatique par les glutathion-S-transférases, avec la fonction thiol du glutathion pour former le conjugué GSH-CEES. Ce dernier est rapidement excrété des cellules puisqu'il est présent dans les milieux déjà après 1h. C'est à ce temps-là, que nous avons observé la concentration maximale de GSH-CEES. Après 1h, cette concentration dans les milieux de culture diminue. GSH-CEES n'est donc pas un biomarqueur très persistant. En effet, après 24h, il n'a été détecté dans les milieux que pour les doses les plus importantes de CEES (0,16 et 0,4 μmol) et en faible concentration. La concentration en Cys-CEES dans les milieux augmente jusqu'à 6h avant d'atteindre un plateau jusqu'à 24h. Sa concentration est plus élevée que celle de GSH-CEES d'un facteur 4 à 10 au temps d'incubation de 1h. Cette différence est observée dès la première heure après l'exposition.

Ces observations sont en accord avec les propriétés connues de la voie de métabolisation de l'acide mercapturique activée pour la détoxification de composés électrophiles tels que le CEES et l'ypérite. Après alkylation du GSH par le CEES, le conjugué GSH-CEES est converti en CysGly-CEES puis en Cys-CEES. Ces deux dernières réactions sont catalysées par des enzymes membranaires. C'est pourquoi ces conjugués se retrouvent en milieu extracellulaire. La présence des conjugués GSH-CEES et Cys-CEES dans les milieux nous permet de conclure que cette voie de métabolisation est active dans la peau pendant les 24h succédant une exposition au CEES. Cependant, le biomarqueur Cys-CEES est aussi produit *via* d'autres mécanismes. Il est par exemple possible que le CEES réagisse directement sur la cystéine au niveau de la fonction thiol.

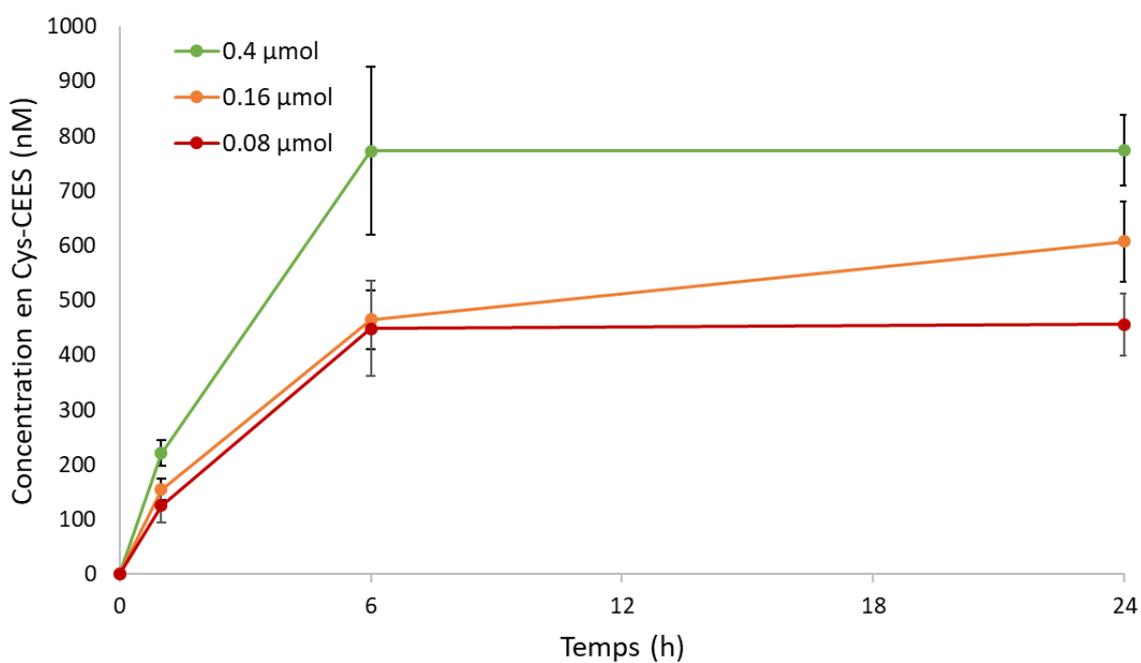
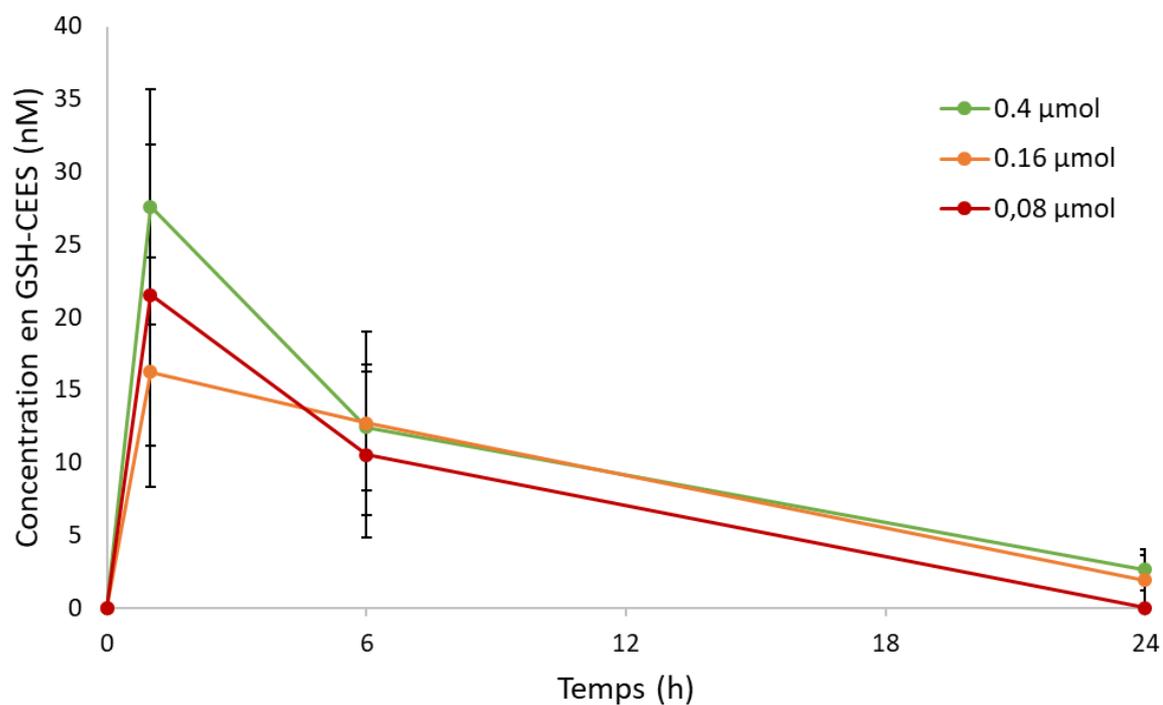


Figure 58 : Evolution de la concentration des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES dans les milieux de culture des explants de peau humaine traités par 0,08 / 0,16 / 0,4 μmol de CEES. Les explants ont incubé avec du milieu de culture soit pendant 1h soit 6h soit 24h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM (n=6).

Temps (h)		1	6	24
GSH-CEES	0,08 µmol	21,5 ± 10,3 [§]	10,6 ± 5,7 [§]	0 ± 0 ^{*,†}
	0,16 µmol	16,3 ± 7,9	12,7 ± 6,3	1,9 ± 1,7
	0,4 µmol	27,6 ± 8,1 [§]	12,4 ± 4,3	2,6 ± 1,4 [*]
Cys-CEES	0,08 µmol	126 ± 31 ^{†,§}	449 ± 87 [*]	457 ± 57 [*]
	0,16 µmol	155 ± 20 ^{†,§}	465 ± 54 [*]	607 ± 73 [*]
	0,4 µmol	221 ± 23 ^{†,§}	773 ± 154 [*]	774 ± 64 [*]

Tableau 11 : Concentration (en nM) des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES détectés dans le milieu de culture des explants de peau humaine traités au CEES. Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n=6). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes pour p<0,05 sont : * pour la comparaison avec 1h; † pour la comparaison avec 6h; § pour la comparaison avec 24h.

3.6. Une application de la méthode : le projet NALDERC

Le projet NALDERC, piloté par un autre laboratoire du CEA-Grenoble, consiste à réaliser un gel de décontamination à appliquer sur les surfaces du corps touchées par des toxiques de guerre. Le produit commercial actuel, le RSDL, ne peut s'appliquer sur les zones sensibles telles que les yeux à cause de son pH basique. Il est donc intéressant de développer un remplaçant au RSDL ayant un pH neutre qui inhibe la toxicité des agents toxiques. La formulation est composée de lipidots (des nanoparticules lipidiques) enrobant des composés actifs.

Pour évaluer l'efficacité des formulations, des expériences sur des explants de peau humaine permettent de simuler une intoxication à un vésicant ainsi que sa décontamination. Les protocoles d'évaluation demandent une exposition intense et courte. Deux types de traitements ont été faits.

3.6.1. Traitement 1

Une goutte de 1 μ L (8,6 μ mol) de CEES pur est déposée sur la peau (*Figure 59*). Il y a ensuite un temps d'attente de 5 minutes avant de commencer la phase de décontamination. Après, 100 μ L d'une solution de lavage sont déposés sur la peau. L'étalement de la solution, sur le terrain, faite avec une éponge, est effectuée avec un coton-tige pour un souci d'échelle pendant 10 secondes. On laisse le gel de décontamination agir pendant 2 min avant de répéter le processus de décontamination. Le contrôle correspond à un explant de peau non décontaminé après le dépôt de CEES en attendant 12 min avant sa congélation. Les peaux sont rincées et congelées à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Ce traitement a été fait pour un donneur avec 6 explants pour chaque solution de lavage (n=6).

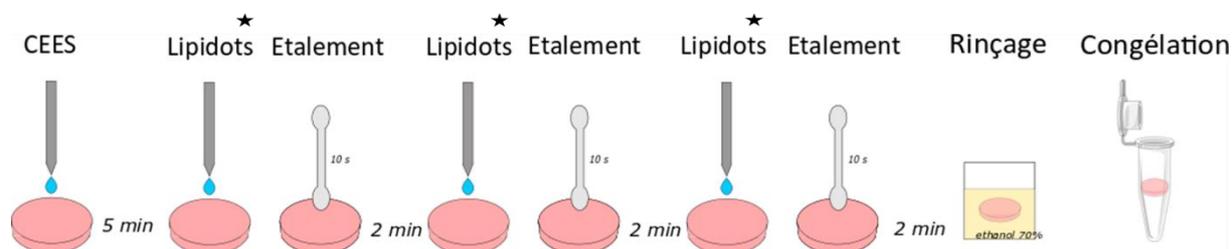


Figure 59 : Représentation schématique des différentes étapes du traitement 1 des explants de peau humaine par du CEES dans le cas du projet NALDERC. * Les différentes solutions de lavages sont : lipidots (20 mg/ml), lipidots (20 mg/ml) avec de la NAC (1 mol/L), savon (20 mg/mol), NAC (1 mol/L).

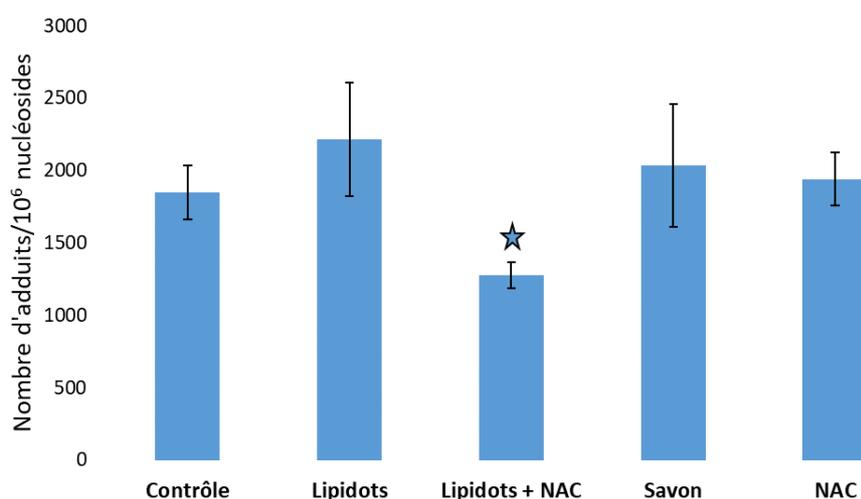


Figure 60 : Evolution du nombre d'adduits N7Gua-CEES en fonction des solutions de lavage après exposition d'explants de peau humaine par du CEES (8,6 μ mol). Les données représentées sont la moyenne \pm SEM (n=6). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes : * pour la comparaison avec le contrôle.

Après extraction de l'ADN des explants, l'adduit N7Gua-CEES a été quantifié (*Figure 60*). Nous remarquons que la quantité d'adduit par million de nucléosides diminue de façon significative lorsque la solution de lavage est le mélange de lipidots (20 mg/ml) avec de la NAC (1 mol/L). Il est intéressant de souligner que les lipidots seuls et la NAC seule n'entraînent pas une diminution des adduits. Ainsi, ces résultats supposent qu'il y a un effet de synergie entre les lipidots et la NAC.

3.6.2. Traitement 2

Le protocole est proche de celui du traitement 1. Une goutte de 1 μ L (8,6 μ mol) de CEES pur est déposé sur la peau (*Figure 61*). Après l'attente de 5 min, 100 μ L d'eau sont déposés sur la peau. Trois fois les solutions de lavages sont appliquées. Les peaux ont été mises en incubation sous la sorbonne à température ambiante pendant 6h avec du milieu de culture ajouté après les étapes de décontamination (600 μ L, DMEM-F12 avec 1% Pen/Strep). Les milieux sont collectés et congelés à -20°C jusqu'à la SPE. Ce traitement a été fait pour un donneur avec 4 explants pour chaque solution de lavage (n=4).

Après SPE, les milieux des explants ont été analysés. Les biomarqueurs y ont été quantifiés (*Figure 62*). La quantité de conjugué GSH-CEES est bien plus importante par rapport au contrôle lorsque la décontamination a été faite avec des solutions contenant de la NAC. La NAC est un précurseur dans la production de glutathion intracellulaire. Une augmentation de la NAC induit peut-être une augmentation du glutathion intracellulaire. Au contraire, la quantité de Cys-CEES est significativement inférieure au contrôle pour la solution de lavage composée de la NAC. Nous avons détecté le conjugué NAC-CEES seulement dans les cas où la NAC a été utilisée dans les solutions de lavages. Cela confirme que la peau ne peut transformer le conjugué Cys-CEES en NAC-CEES. Par contre, la réaction directe entre le CEES et la NAC peut avoir lieu. Les différentes solutions de lavages n'ont pas d'impact significatifs sur la quantité de N7Gua-CEES dans les milieux de culture après 6h.

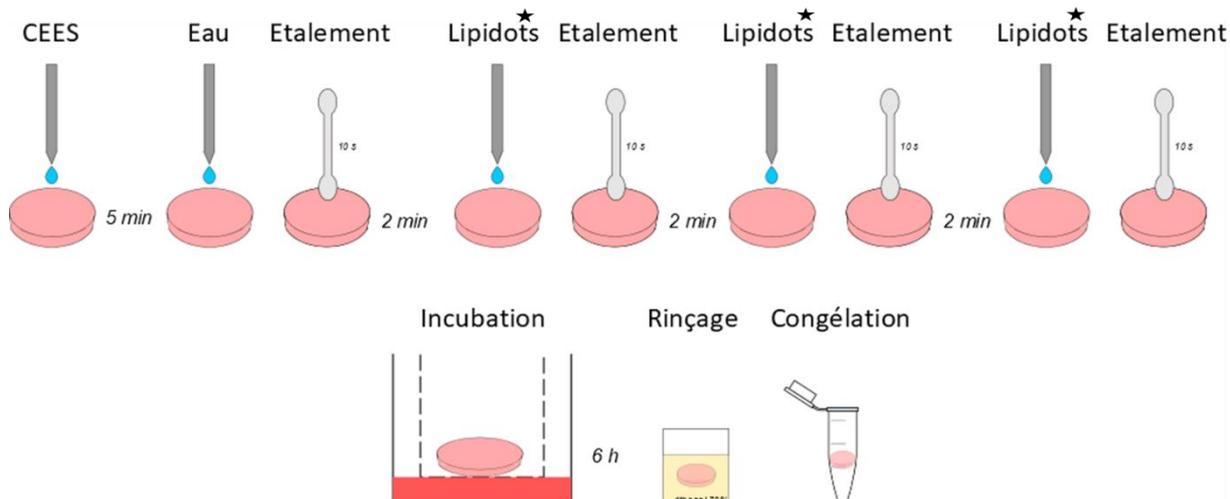


Figure 61 : Représentation schématique des différentes étapes du traitement 2 des explants de peau humaine par du CEES dans le cas du projet NALDERC. * Les différentes solutions de lavages sont : lipidots (20 mg/ml), lipidots (20 mg/ml) avec de la NAC (1 mol/L), savon (20 mg/mol), NAC (1 mol/L).

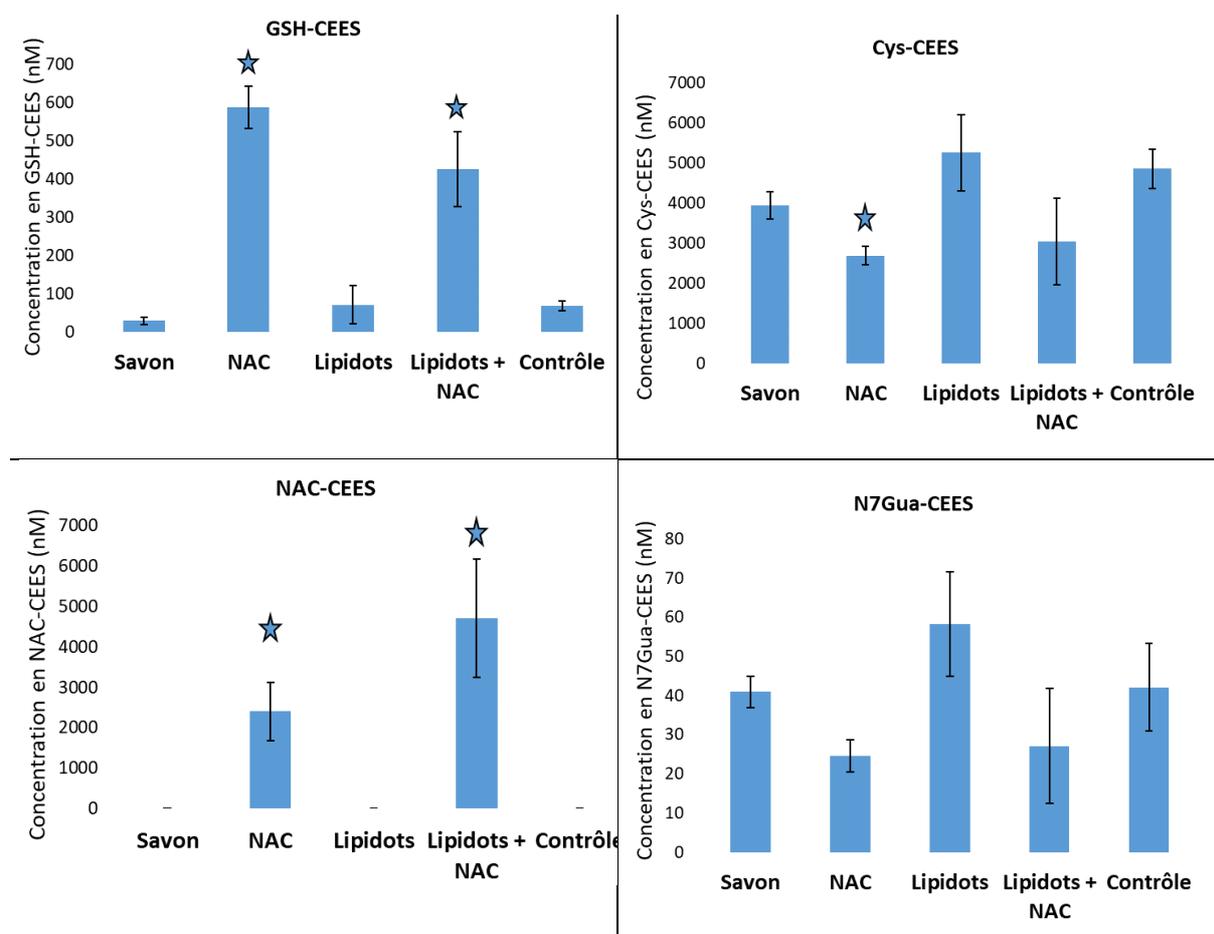


Figure 62 : Evolution du nombre biomarqueurs en fonction des solutions de lavage après exposition d'explants de peau humaine par du CEES (8,6 μmol). Les données représentées sont la moyenne ± SEM (n=4). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes : * pour la comparaison avec le contrôle.

3.7. Bilan

Cette étude confirme les observations faites dans les cellules HaCat. L'adduit N7Gua-CEES est formé dans l'ADN des cellules d'explants de peau humaine. Le biomarqueur NAC-CEES n'a pas été détecté dans les milieux de culture après traitement de la peau. L'observation de la formation des biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES montre l'activation de la voie de métabolisation de l'acide mercapturique. Cela met en lumière un des rôles physiologiques principaux de la peau : être une barrière contre les xénobiotiques. Les biomarqueurs choisis, hormis NAC-CEES, sont formés et excrétés des cellules humaines lors de ces expériences *in vitro*. La cinétique de formation des biomarqueurs du CEES entre 1h et 24h après exposition au CEES corrèle bien avec les mécanismes biologiques connues, d'un côté la dépurination des adduits à l'ADN et d'un autre côté la voie de métabolisation de l'acide mercapturique. D'après ce modèle biologique, le biomarqueur GSH-CEES est rapidement formé et peu persistant. Des quantités bien plus importantes de Cys-CEES sont formées lors des 24h suivant l'exposition. Ces résultats sont présents dans une publication [97]. En revanche, ce modèle biologique ne permet pas de conclure sur la pertinence du biomarqueur NAC-CEES puisque les cellules de peau ne semblent pas convertir le conjugué Cys-CEES en l'acide mercapturique. Une application de ces biomarqueurs chez l'Humain nécessitant une validation *in vivo*, il est maintenant nécessaire de faire une étude animale. Ceci a été réalisé par des traitements au CEES de souris sans poil.

4. Etude de la formation et de la persistance des biomarqueurs du CEES chez la souris.

Des expérimentations effectuées sur les souris SKH-1 ont été effectuées par l'IRBA sur leur site à Brétigny-sur-Orge. Sous une sorbonne, environ 80 souris ont été exposées sur une petite zone de la peau du dos à des vapeurs saturantes de CEES par un système occlusif réalisé à l'IRBA (Figures dans Conditions expérimentales p.233). Avec ce système, les souris sont exposées aux vapeurs générées par le CEES liquide. Les souris ont été exposées pendant 30 min. Après 4 h, les souris ont été décontaminées par du savon et de l'eau. Les souris ont été sacrifiées après 1 jour, 3 jours, 7 jours ou 14 jours (**Figure 63**). Du sang et les cerveaux des souris sacrifiées ont été collectés à ces différents temps. L'analyse du plasma sanguin permet d'étudier la présence et la persistance des biomarqueurs choisis dans nos travaux *i.e.* GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES. L'analyse des cerveaux complète des études sur la diffusion et sur l'impact neurologiques du CEES, donc par analogie, de l'ypérite. Cette étude a également été l'occasion de mettre en place l'utilisation de la SPE en ligne qui permet notamment de diminuer le temps de préparation des échantillons de plasma.

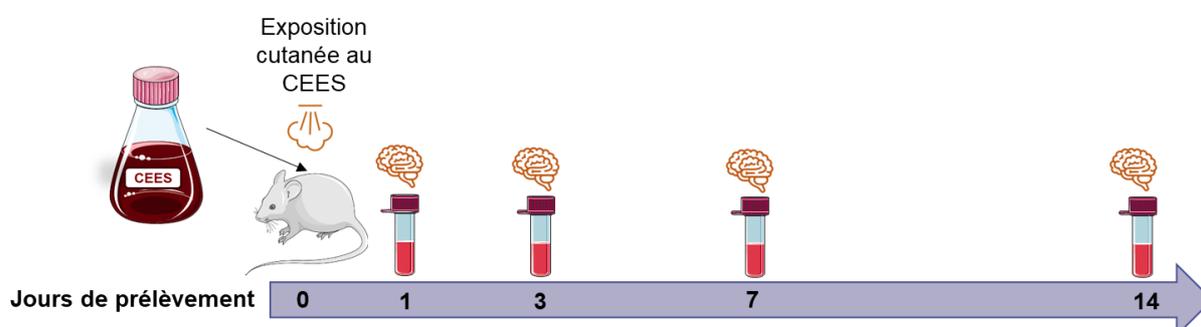


Figure 63 : Représentation schématique de l'expérimentation sur les souris sans poil et des jours de collecte des échantillons. Du sang et le cerveau des souris sacrifiées ont été collectés 1 jour, 3 jours, 7 jours ou 14 jours après l'exposition.

4.1. Amélioration de la robustesse des analyses : le cas du plasma.

Le plasma correspond à la fraction liquide du sang, c'est-à-dire celle qui a été débarrassée des cellules (hématies, plaquettes et leucocytes) après ajout d'anticoagulant et centrifugation.

Le plasma représente 55% du volume total de sang (*Figure 64*). Le nombre de protéines contenues dans le plasma sanguin est évalué à environ 20 000, avec une concentration totale comprise entre 60 et 80 mg/mL [186]. Le pré-traitement des échantillons est donc une étape fondamentale pour ce type d'analyse.

Nous avons remarqué après avoir analysé quelques échantillons de plasma que les colonnes se bouchaient rapidement malgré la filtration avec des filtres de 0,22 μm et la purification par SPE en ligne. Il a été donc nécessaire d'améliorer les étapes de préparation de l'échantillon avec l'injection. En effet, le plasma contient de protéines qui peuvent précipiter dans les colonnes au moment des analyses à causes des changements de pH induit par les phases mobiles et de la présence d'acétonitrile dans le gradient. Nous avons donc cherché à éliminer le maximum de protéine avant injection. Souvent leur précipitation est faite par ajout de solvants organiques mais cette méthode ajoute une étape d'évaporation de l'échantillon, alors que c'est précisément une étape que nous souhaitons éliminer de la préparation d'échantillon grâce à la SPE en ligne. Il a été décidé de réaliser plutôt une ultrafiltration. Le plasma est centrifugé dans des filtres Nanosep® (Pall Laboratory) de 30 kDA pendant 30 min à $8\,000 \times g$ (*Figure 65*). D'après le fabricant, ces filtres contenant une membrane semi-perméable permettent d'éliminer 99 % des protéines. Seules les petites molécules passent, les protéines sont retenues à la surface du filtre en fonction de la porosité de la membrane choisie. Les filtres de 30 kDA sont les plus adaptés car la protéine la plus abondantes dans le plasma est l'albumine qui a une masse d'environ 65kDa. Elle sera donc retenue sur le filtre qui ne laisse passer dans le filtrat que les composés de moins de 30kDa. Il faut cependant faire attention à la formation d'un dépôt de protéines à la surface de la membrane qui est un facteur limitant de la vitesse et au rendement du processus. Au-delà de 200 μL de plasma, le filtre a tendance à se boucher. La solution incolore obtenue est transvasée dans les vials pour l'analyse. La mise en place de l'utilisation systématique de cette ultrafiltration a éliminé les problèmes de robustesse de la technique même lors de séries supérieures à 80 échantillons.

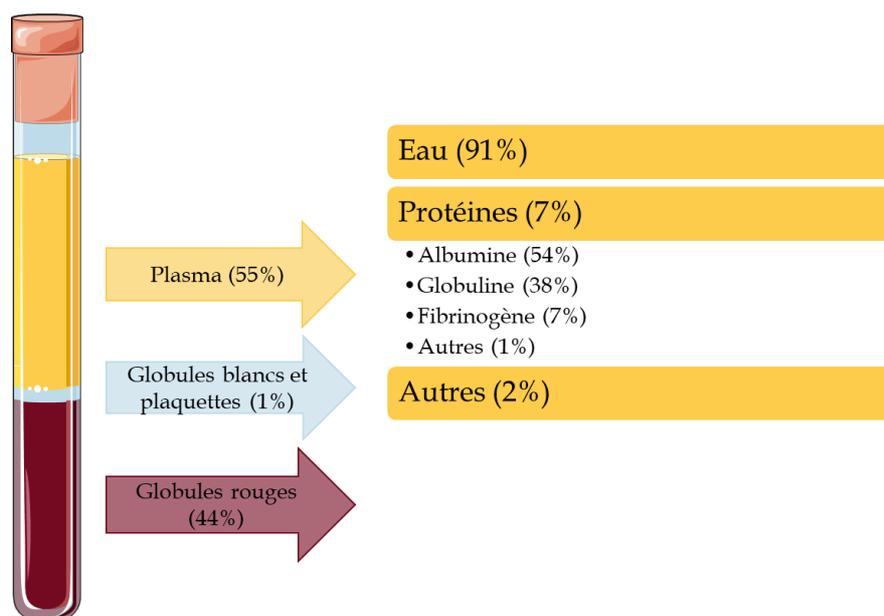


Figure 64 : Composition du sang humain typique en détaillant la composition du plasma.

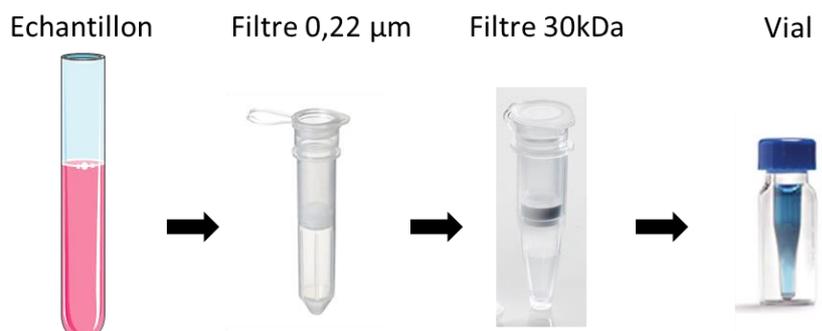


Figure 65 : Processus de préparation de l'échantillon de sa collecte à sa mise dans les vials avant la SPE en ligne au sein de la chaîne HPLC. Il y a une étape d'ultrafiltration grâce à des filtres de 30kDa.

4.2. Réduction du temps de préparation d'analyse grâce à le SPE en ligne

Après avoir développé un protocole de SPE spécialement pour les milieux de culture, il a fallu l'adapter au plasma. Afin de réduire le temps de préparation d'échantillon, nous avons décidé de réaliser la SPE en ligne au sein de la chaîne HPLC. En effet, l'étape la plus chronophage de la préparation d'échantillon avec la SPE « manuelle » est le temps d'évaporation après l'étape d'éluion des analytes. Cette étape dure entre 4h et 6h. Un autre avantage de la SPE en ligne est la réduction de la variabilité induite par les manipulateurs car

le processus est automatisé. Le développement d'une méthode de SPE en ligne est facilité par le protocole validé en SPE « manuelle » car les principes de le SPE en ligne sont les mêmes que ceux de la SPE « manuelle ».

La réalisation de la SPE en ligne au sein de la chaîne HPLC implique la présence d'une deuxième colonne dite « SPE » en amont de la colonne dite « analytique ». L'échantillon de plasma (50 μL) est injecté dans une colonne Nucleodur® PFP de petite taille et de granulométrie classique (50 mm x 2.0 mm ID, 5 μm) de Macherey-Nagel utilisée comme colonne SPE. Sur une colonne Pentafluorophényle (PFP), les analytes peuvent être retenus par différents mécanismes : les liaisons hydrogènes, interactions dipôle-dipôle, aromatiques (π - π), hydrophobes (phase inverse) (*Figure 66*). La phase mobile A est de l'eau MilliQ tamponnée par 5 mM de formiate d'ammonium. La phase mobile B est du méthanol avec 5 mM de formiate d'ammonium. Le méthanol a été préféré à l'ACN pour sa capacité moins éluante. Les analytes retenus sur la colonne SPE sont purifiés par un gradient de 0 à 50% de la phase mobile B pendant 1 minute avec un débit de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ et une température de four fixée à 50°C. La détermination du temps de purification et le débit s'est faite après de très nombreux essais en faisant varier ces paramètres. Nous avons recherché un temps de purification et un débit permettant de laver au maximum l'échantillon sans pertes en analytes. Après cette étape, les analytes sont transférés par permutation d'une vanne six voies dans la colonne dite « analytique ». La même colonne que la méthode validée pour les milieux de culture, à savoir une colonne UHPLC C₁₈, a été utilisée pour le plasma.

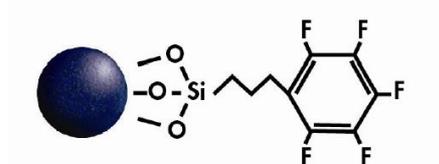


Figure 66 : Représentation de la chimie de surface d'une colonne PFP.

Avec une surface PFP, des interactions π - π sont possibles grâce au noyau aromatique. Les atomes de fluor très électronégatifs appauvrissent le cycle en électrons. Le noyau aromatique PFP agit alors comme un acide de Lewis capable d'interagir avec les donneurs d'électrons (base de Lewis). Les liaisons carbone-fluor du cycle PFP sont extrêmement polarisées. C'est pourquoi les phases PFP permettent des interactions dipôle-dipôle et des liaisons hydrogènes

entre l'analyte et l'atome de fluor électronégatif. Le cycle aromatique rigide du PFP, combiné aux différents mécanismes de rétentions, confère des phénomènes de sélectivité stérique.

Une comparaison a été faite entre une préparation d'échantillon basée sur la SPE manuelle et la SPE en ligne dans le cas du plasma de souris. Parmi les échantillons de plasma de souris, reçus de nos collaborateurs, ceux ayant les plus grands volumes ont été utilisés pour cette étude (n=14). Ils ont été analysés avec la méthode validée au chapitre 1 pour les milieux de culture *i.e.* avec le même protocole de SPE. Ils ont été ensuite analysés en utilisant la méthode SPE en ligne présentés ci-dessus et les paramètres UHPLC-MS/MS de méthode validée au chapitre 1. Seule la préparation d'échantillon diffère. Les deux méthodes permettent de détecter les mêmes quantités de NAC-CEES et de N7Gua-CEES (*Figure 67* et *Figure 68*). De plus, leur LOD et LOQ déterminées en matrices réelles sont équivalentes (*Tableau 12*). Pour ces deux biomarqueurs, la SPE en ligne est pertinente puisqu'elle permet d'avoir des performances analytiques similaires avec un gain de temps important. La SPE en ligne améliore même la détection de GSH-CEES grâce à une meilleur LOD et LOQ. Cependant, pour Cys-CEES, il y a la présence d'un interférent en SPE en ligne qui explique la différence d'un facteur 5 à 10 entre les quantités détectées par les deux méthodes. Le calcul de la LOD confirme ce problème.

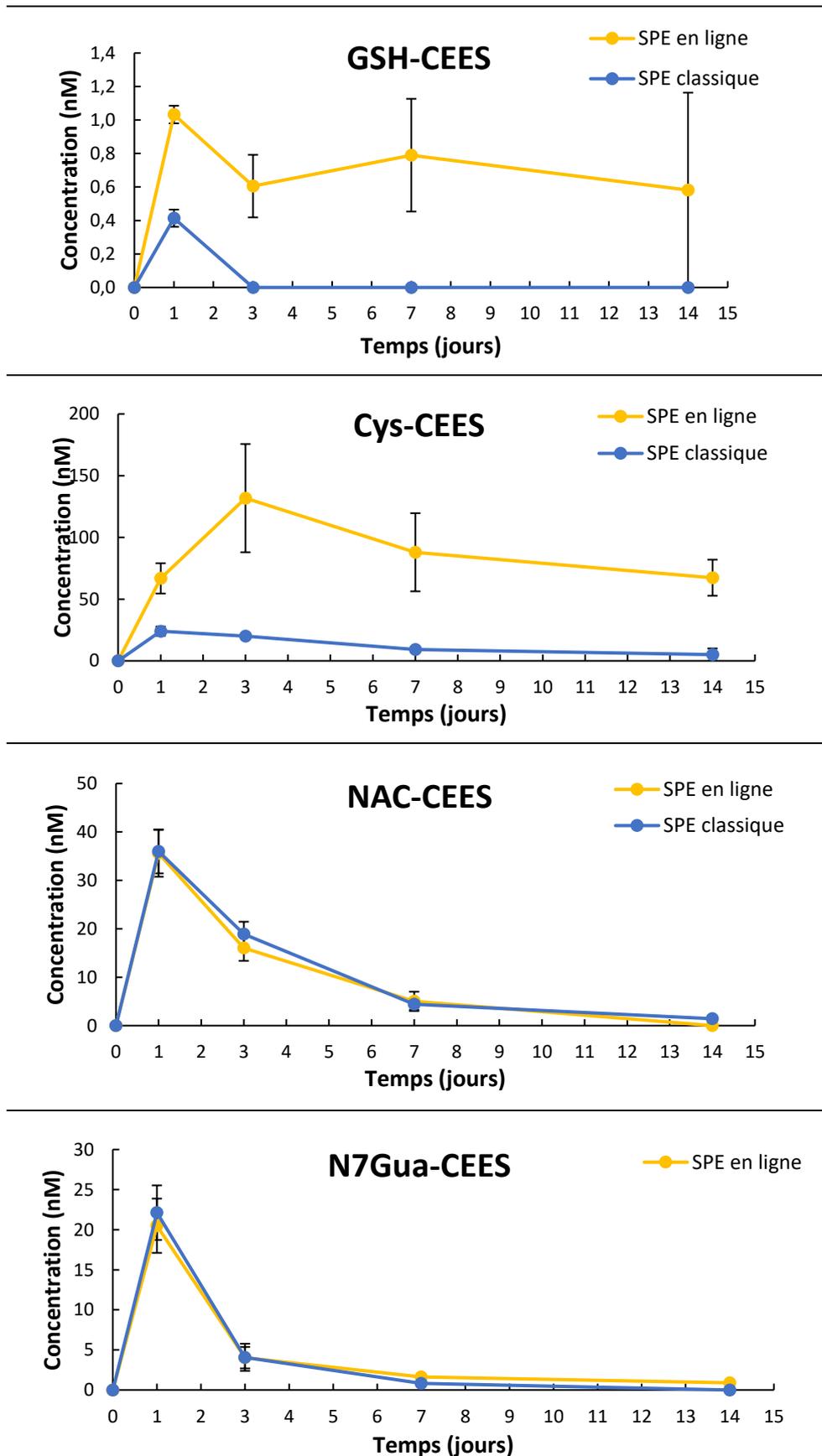


Figure 67 : Comparaison entre la quantité de biomarqueurs dans le plasma de souris traitées au CEES purifié par la SPE "classique" et par la SPE en ligne. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=4$ pour le jour 1 et le jour 3 ; $n=2$ pour le jour 7 et le jour 14).

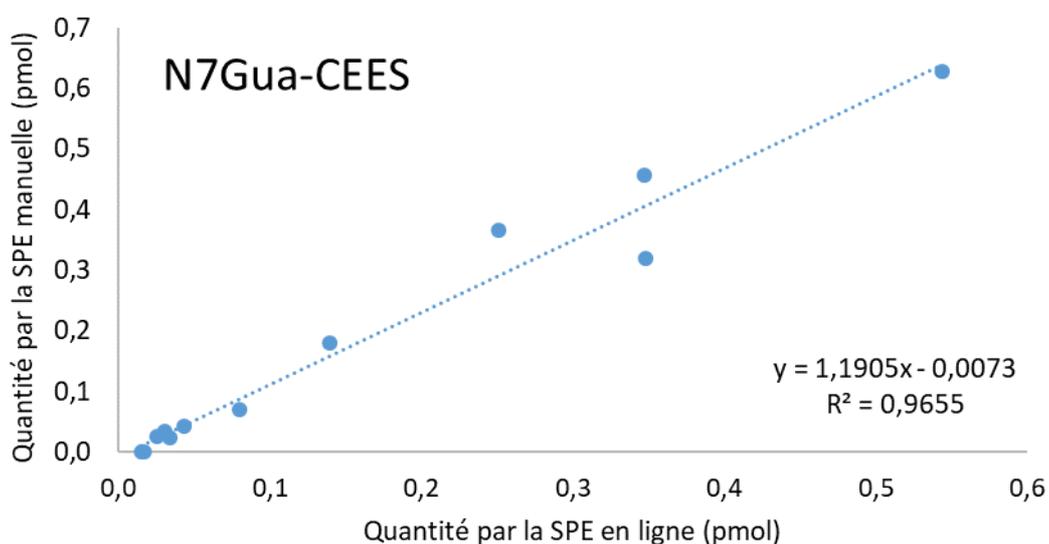
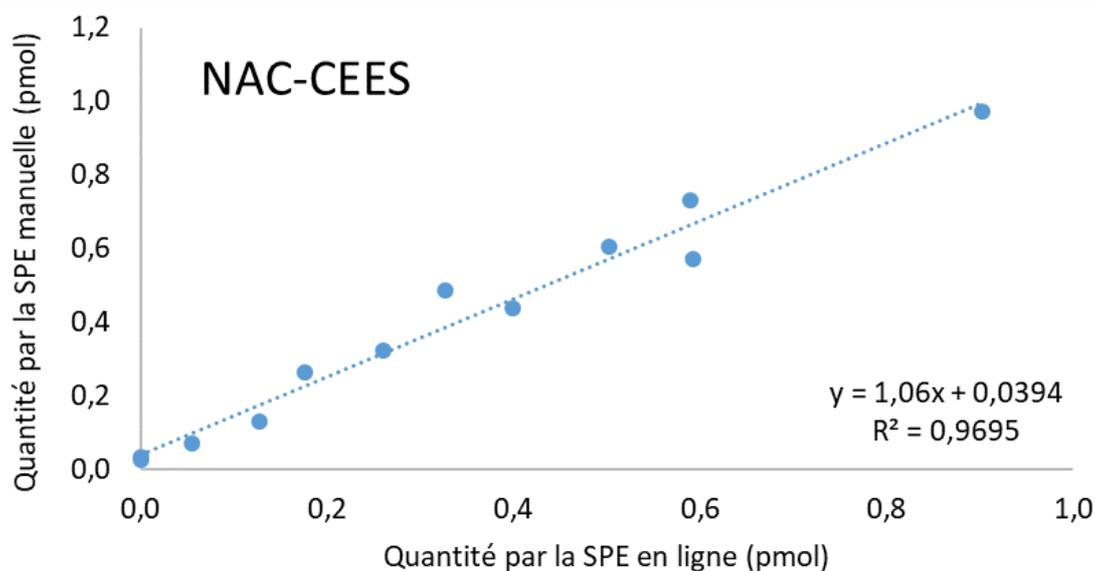


Figure 68 : Relation entre les quantités de biomarqueurs détectés dans le plasma de souris après SPE manuelle et SPE en ligne ($n=14$). Plus la pente est proche de 1, plus les quantités détectées par les deux préparations d'échantillons sont égales.

		GSH-CEES	Cys-CEES	NAC-CEES	N7Gua-CEES
SPE en ligne	LOD (fmol)	11	249	5,1	3,4
	LOQ (fmol)	33	576	8,5	8,8
SPE manuelle	LOD (fmol)	22	50	3,3	4,7
	LOQ (fmol)	61	82	7,2	10,5

Tableau 12 : LOD et LOQ dans le plasma de souris soit après SPE manuelle soit après SPE en ligne grâce à deux souris témoins.

4.3. Persistance des biomarqueurs dans le plasma jusqu'à 14 jours.

Le sang a été prélevé au niveau du cœur. Le plasma a été récupéré par centrifugation (2000 x g, 10 min, 4°C) puis congelé. Après envoi jusqu'à notre laboratoire, il a été gardé quelques semaines à -20°C avant analyse. Les plasmas des souris ont alors été décongelés. Ils ont été dopés par ajout de 10 µL (0,5 µM) de EI du CEES à 90 µL de plasma. Les échantillons ont été filtrés puis injectés dans le système UHPLC pour une analyse par la méthode combinant SPE en ligne et analyse par UHPLC-MS/MS. Les paramètres de la chromatographie liquide et du spectromètre de masse sont inchangés par rapport à la méthode validée pour les milieux de culture.

Les biomarqueurs n'ont pas été détectés dans le plasma des animaux non traités sauf pour le conjugué Cys-CEES (*Figure 69, A*). Une molécule présente dans le plasma de souris interfère avec Cys-CEES. Dans les plasmas d'animaux traités tous les biomarqueurs (*Figure 69, B*) ont été détectés c'est-à-dire l'adduit N7Gua-CEES, les conjugués GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES. Un jour après l'exposition, le biomarqueur majoritaire dans le plasma est Cys-CEES suivi de NAC-CEES et N7Gua-CEES suivi de GSH-CEES (*Figure 70*). L'étude de la cinétique de N7Gua-CEES montre que sa concentration est maximale 1 jours après le traitement (*Tableau 13*). Après, son niveau diminue rapidement mais il reste détectable à 14 jours avec une quantité très proche de la limite de détection (ratio concentration jour 14 sur LOD = 1,11). Le biomarqueur GSH-CEES a été détecté dans presque tous les échantillons avec un niveau souvent proche de la LOD en ayant peu de variations au cours du temps. Lors des expériences *in vitro*, il avait déjà été remarqué que le biomarqueur GSH-CEES est présent en très faible quantité, proche de la LOD, dans les milieux de culture. Ces résultats *in vivo* confirment cette tendance. Au contraire, Cys-CEES et NAC-CEES ont été détectés avec des concentrations élevées. La concentration maximale de NAC-CEES était au jour 1. Pour Cys-CEES le maximum se situe autour du jour 1 et 3, les concentrations entre le jour 1 et le jour 3 n'étant pas statistiquement différentes. Ensuite, leur concentration baisse de façon continue. Cependant après 14 jours, la quantité de NAC-CEES était encore 12 fois supérieure à la LOD (*Figure 69, C*).

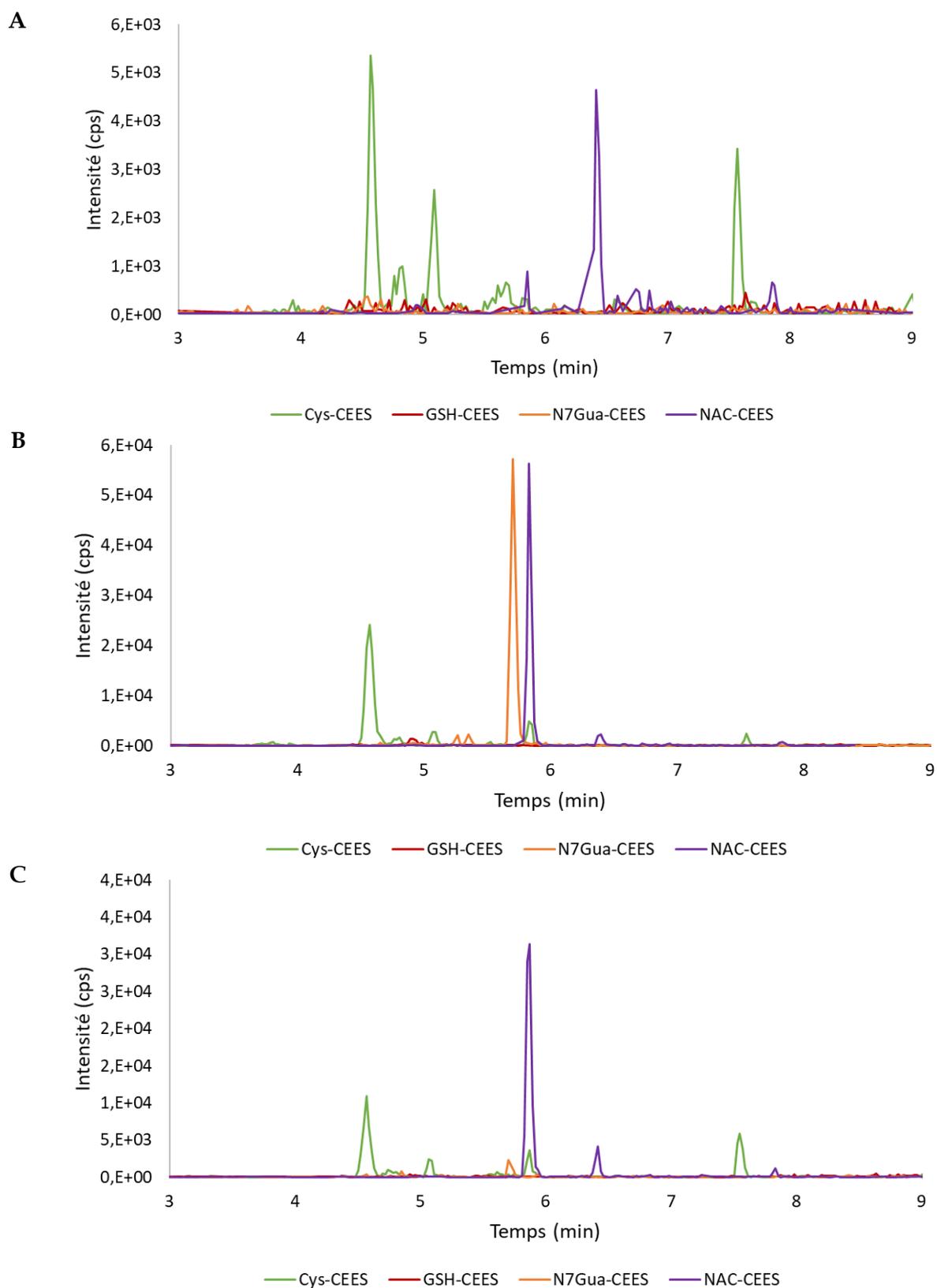


Figure 69 : Chromatogrammes obtenus après injection en SPE-UHPLC-MS/MS de plasma de souris. **A** : souris non traitée ; **B** : prélèvement au jour 1 ; **C** : prélèvement au jour 14. L'ordre de sortie est : Cys-CEES ($t_r=4,6\text{min}$), GSH-CEES ($t_r=4,9\text{ min}$), N7Gua-CEES ($t_r=5,7\text{min}$), NAC-CEES ($t_r=5,8\text{min}$).

Il faut noter que c'est la première fois, dans nos études biologiques, que l'acide mercapturique NAC-CEES a été détecté. Il est même le biomarqueur le plus abondant avec Cys-CEES dans le plasma. L'enzyme qui catalyse cette réaction, N-acétyl-transférase, est essentiellement exprimée dans les reins et de façon moindre dans le foie [187]. Les dérivés de l'acide mercapturique peuvent être aussi formés dans des quantités largement inférieures à celles du rein, dans d'autres tissus du corps avant de rejoindre le système sanguin [188, 189]. Cela explique probablement la concentration importante de NAC-CEES mesurée dans le plasma et son absence dans les expériences *in vitro*.

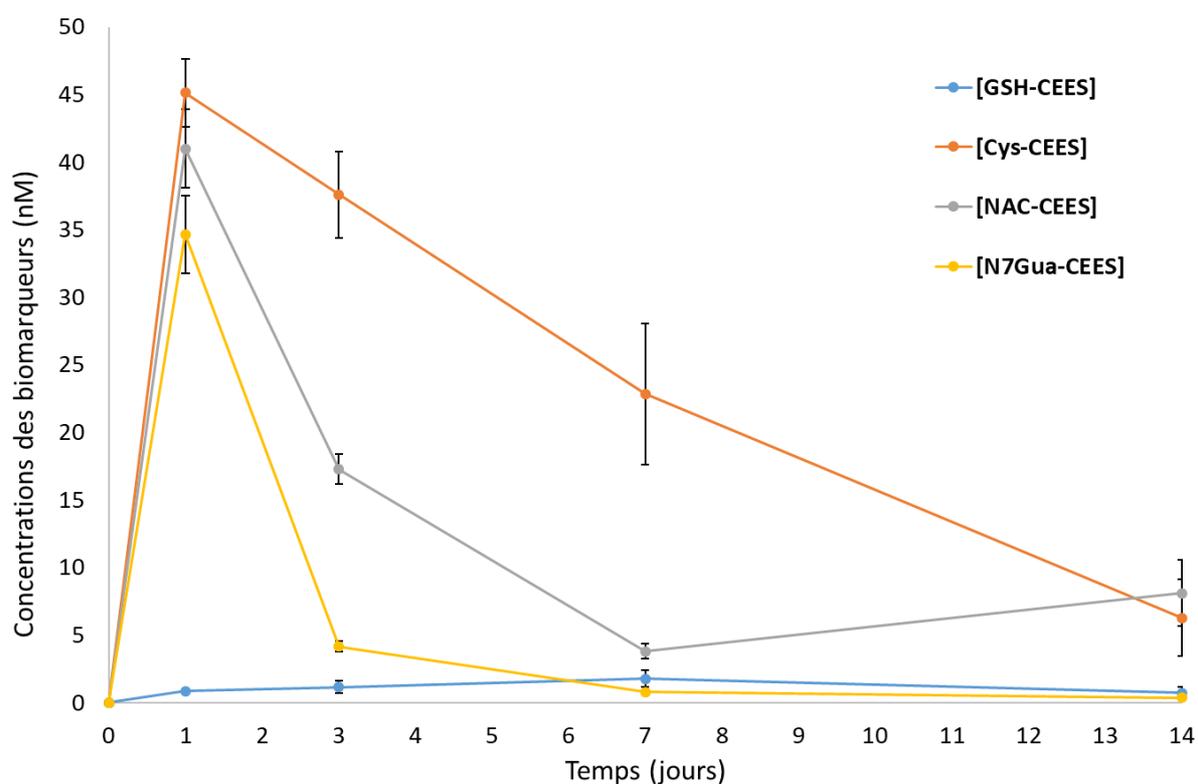


Figure 70 : Evolution de la concentration des biomarqueurs GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES dans le plasma de souris. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=20$ pour le jour 1 et 3 ; $n=18$ pour le jour 7 ; $n=19$ pour le jour 14).

Jour	1	3	7	14
GSH-CEES	0,8 ± 0,1 [§]	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,5	0,5 ± 0,3 [*]
Cys-CEES	42,9 ± 3,3 ^{‡‡,§§}	37,6 ± 3,2 ^{‡,§§}	14,8 ± 4,3 ^{**,+}	3,9 ± 2,0 ^{**,+†}
NAC-CEES	41,0 ± 2,9 ^{†,‡‡,§§}	17,3 ± 1,1 ^{**,+†,§§}	3,8 ± 0,5 ^{**,+†}	5,7 ± 2,0 ^{**,+†}
N7Gua-CEES	34,7 ± 2,9 ^{††,‡‡,§§}	4,2 ± 0,4 ^{*,†,§§}	0,8 ± 0,1 ^{**,+}	0,3 ± 0,1 ^{**,+†}

Tableau 13 : Concentration (en nM) des 4 biomarqueurs du CEES détectés dans la plasma de souris exposées au CEES. Pour chaque groupe i.e. jour de sacrifice de l'animal le nombre de souris varie entre 16 et 20. Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n=20 pour le jour 1 et 3 ; n=18 pour le jour 7 ; n=19 pour le jour 14). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes pour p<0,05 et p<0,01 sont : * et ** pour la comparaison avec le jour 1; † et †† pour la comparaison avec le jour 3; ‡ et ‡‡ pour la comparaison avec le jour 7; § et §§ pour la comparaison avec le jour 14.

4.4. Diffusion du CEES dans le cerveau

Des effets neurologiques et psychologiques ont été rapportés pour l'ypérite et ont été confirmés par des données comportementales avec le CEES [79, 80, 190]. Nous avons donc souhaité focaliser la suite de l'étude sur le cerveau. Les biomarqueurs ont ainsi été quantifiés dans les cerveaux de souris sacrifiées soit juste avant l'exposition soit 1, 3, 7 ou 14 jours après le traitement topique avec du CEES. Le cerveau des animaux sacrifiés a été retiré et congelé à -80°C. La moitié de chaque cerveau a été broyée afin d'en extraire l'ADN pour quantifier l'adduit N7Gua-CEES. Un quart des cerveaux de chaque souris a été utilisé afin d'en extraire les métabolites polaires. Chaque échantillon a été pesé afin de pouvoir normaliser les résultats. La masse de ces quarts de cerveaux se trouve entre 50 et 150 mg. L'extraction des métabolites polaires des cerveaux a été faite en utilisant un mélange méthanol : chloroforme (2 : 1) et de l'eau (détails du protocole d'extraction dans la Partie des Conditions Expérimentales). Lors de l'extraction la couche contenant les métabolites polaires a été collectée et séchée. L'échantillon a été reconstitué avec l'eau MilliQ et filtré sur des filtres VWR de 0,2 µm.

Le premier biomarqueur d'intérêt est l'adduit N7Gua-CEES qui a été mesuré dans l'ADN nucléaire ainsi que dans le cerveau comme adduit libre. Au niveau de l'ADN, aucune trace de l'adduit n'a été détectée dans les cerveaux de souris non exposées. Dans cet organe, il est

spécifique au CEES. Au cours du temps, nous observons une augmentation de l'adduit jusqu'au jour 3 (*Figure 71*). Le nombre d'adduit entre le jour 1 et le jour 3 ne sont pas statistiquement différentes. Après le jour 3, la quantité d'adduit baisse continument jusqu'au jour 14 où l'adduit reste détectable avec une quantité de $18,0 \pm 6,7$ adduits par million de nucléosides. La quantité de N7Gua-CEES mesurée à 14 jours a été en moyenne 28 fois supérieure à la LOD de la méthode. Dans les extraits de métabolites polaires de cerveau, les adduits libres de N7Gua-CEES ont été détectés du jour 1 au jour 14 (*Figure 72*). Ils ne sont pas présents dans les cerveaux des souris non exposées. Leur concentration est maximale au jour 1. Après 2 semaines, il ne reste en moyenne que 10% de leur valeur maximale et N7Gua-CEES n'est présent dans les extraits au-delà de la LOD que dans seulement 1 souris sur 2.

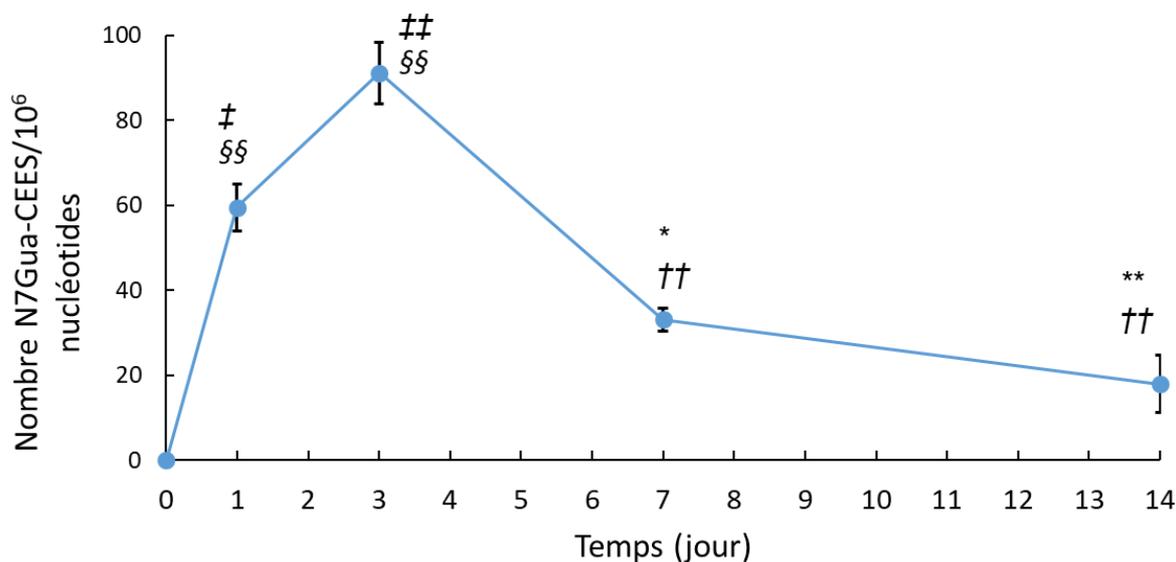


Figure 71 : Evolution du nombre d'adduit N7Gua-CEES dans l'ADN de cerveau de souris exposées au CEES. Pour chaque groupe i.e. jour de sacrifice de l'animal le nombre de souris varie entre 16 et 20. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ($n=18$ pour le jour 1 ; $n=20$ pour le jour 3 ; $n=19$ pour le jour jour 7 ; $n=12$ pour le jour 14. Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes pour $p<0,05$ et $p<0,01$ sont : * et ** pour la comparaison avec le jour 1; † et †† pour la comparaison avec le jour 3; ‡ et ‡‡ pour la comparaison avec le jour 7; § et §§ pour la comparaison avec le jour 14.

Les biomarqueurs GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES de la voie de l'acide mercapturique ont aussi été quantifiés dans les cerveaux (*Figure 72*). Tous les trois sont spécifiques puisqu'ils n'ont pas été détectés dans les cerveaux de souris non traitées. Leurs concentrations sont similaires au jour 1. C'est à ce premier temps, que nous observons la

concentration maximale de GSH-CEES. Les concentrations de Cys-CEES et NAC-CEES sont maximales et stables jusqu'au jour 3. Les concentrations de Cys-CEES et NAC-CEES après 1 jour et 3 jours ne sont pas statistiquement différentes. Ensuite, les concentrations de tous les biomarqueurs baissent. Cette diminution est la plus rapide pour le biomarqueur GSH-CEES qui a une concentration déjà inférieure à la LOQ au jour 3 et des valeurs limites au jours 7 et 14. Ce biomarqueur est peu persistant dans le cerveau par rapport aux biomarqueurs Cys-CEES et NAC-CEES qui sont détectables 2 semaines après l'exposition. Au jour 14, la concentration moyenne de NAC-CEES est encore 9 fois supérieure à la LOD. La quantification du Cys-CEES à partir du jour 14 est plus compliquée à cause de la présence de pics interférents.

4.5. Bilan

L'application de notre méthode à une étude animale nous a amenés à travailler sur une grande série d'échantillons. Afin de gagner du temps dans la préparation d'échantillon et d'améliorer la reproductibilité, nous avons développé une méthode de SPE en ligne. Avant l'injection, pour améliorer la robustesse des analyses de plasma, une ultrafiltration est réalisée pour éliminer le maximum de protéines. Dans le plasma, tous les biomarqueurs ont été détectés. Cependant après 14 jours, seul NAC-CEES est quantifiable chez l'ensemble des souris. Les résultats de Cys-CEES, aux faibles concentrations, sont entachés par la présence d'interférents. Environ chez une souris sur deux, après 14 jours, il est possible de quantifier l'adduit libre N7Gua-CEES. La concentration du biomarqueur GSH-CEES oscille autour de la LOD dès le 3^{ème} jour après l'exposition. De plus l'adduit N7Gua-CEES libre et les métabolites de la voie de l'acide mercapturique GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES ont été détectés dans les extraits de cerveau. Leur présence montre bien que le CEES a la capacité de traverser la peau et de se diffuser dans l'organisme *via* la circulation sanguine pour atteindre des organes internes. C'est d'ailleurs ce que suggère la présence des biomarqueurs dans le plasma. Une autre explication non exclusive pourrait être que le cerveau est fortement irrigué par le sang, ce qui pourrait expliquer la forte concentration de biomarqueurs qui y est retrouvée. La formation d'adduits dans l'ADN nucléaire montre quand même que le CEES non métabolisé a atteint le cerveau et/ou que le cerveau sert de réservoir de métabolites de la voie de l'acide mercapturique après transfert sanguin. Les résultats de cette expérimentation animale sont présents dans une publication acceptée au journal Toxicology (voir Annexe 2).

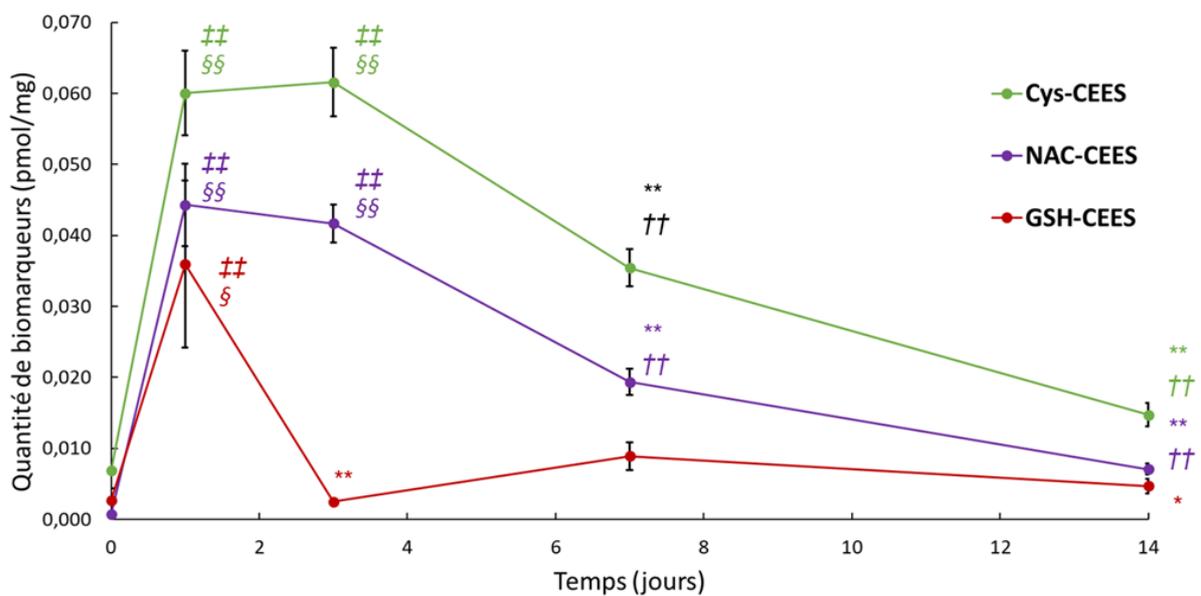
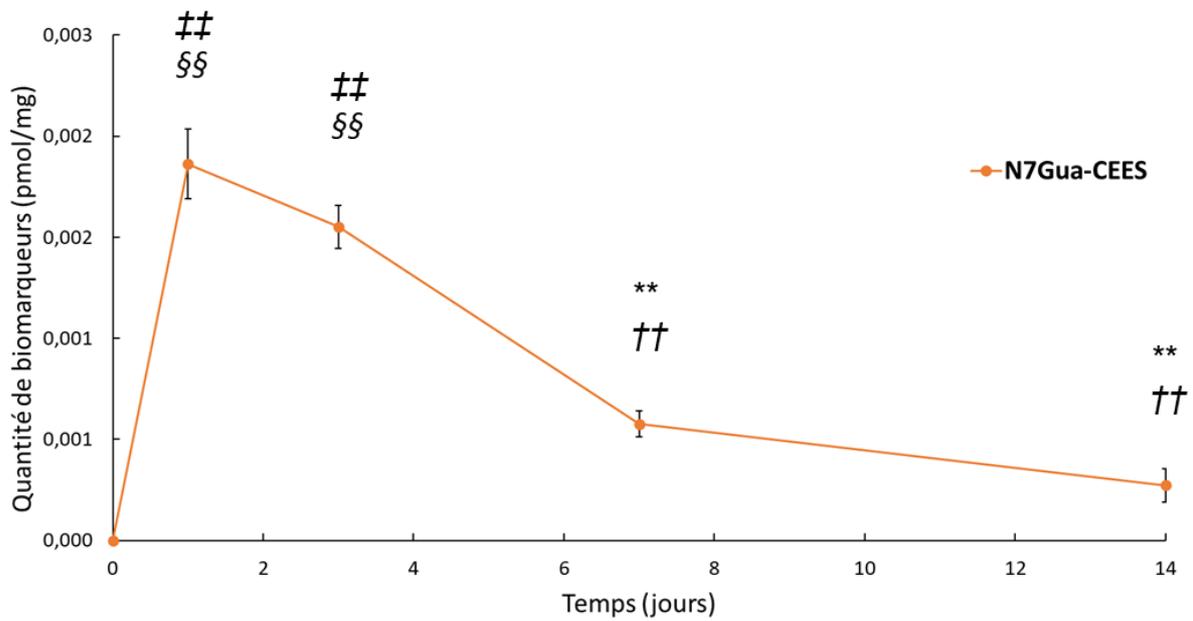


Figure 72 : Evolution de la concentration (en nM) des 4 biomarqueurs du CEES détectés dans le cerveau de souris exposées au CEES. Pour chaque groupe i.e. jour de sacrifice de l'animal le nombre de souris varie entre 16 et 20. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ($n=20$ pour le jour 1 ; $n=18$ pour le jour 3 et 7 ; $n=9$ pour le jour 14). Les symboles pour les valeurs statistiquement différentes pour $p<0,05$ et $p<0,01$ sont : * et ** pour la comparaison avec le jour 1; † et †† pour la comparaison avec le jour 3; ‡ et †† pour la comparaison avec le jour 7; § et §§ pour la comparaison avec le jour 14.

Toutes ces expériences biologiques *in vitro* et *in vivo* réalisées avec du CEES permettent de conclure sur la pertinence biologique des biomarqueurs choisis au début des travaux de cette thèse. Les résultats obtenus lors de ces différents traitements corrént et sont cohérents avec les mécanismes biologiques connus. Après exposition, l'adduit à la position N7 de la guanine est formé puis excrété par les cellules pour se retrouver dans le système sanguin jusqu'à 7 jours chez toutes les souris et 14 jours dans la moitié des cas. Le premier conjugué de la voie de l'acide mercapturique GSH-CEES est rapidement formé mais est peu persistant. Son dérivé, le conjugué Cys-CEES, est formé efficacement mais difficilement quantifiable au-delà du 7^{ème} jour à cause de la présence d'interférents. L'acide mercapturique ne semble pas pouvoir être produit par la peau. Cependant, dans un organisme entier, il est bien présent dans le sang au moins deux semaines après l'exposition.

Le CEES, n'étant pas une menace en soi mais un outil en recherche, nous avons décidé de mettre au point une méthode analytique de quantification de biomarqueurs de l'ypérite, en nous basant sur tout le travail analytique et biologique réalisé avec le CEES.

5. Mise au point d'une méthode de quantification des biomarqueurs de l'ypérite.

5.1. Sélection des biomarqueurs.

Au début de ces travaux de thèse, il a été décidé d'évaluer la pertinence de quatre composés comme biomarqueurs de l'ypérite. La possibilité de réaliser des expériences avec l'ypérite étant très restreinte par un cadre légal exigeant, il était pertinent de « dégrossir » le travail avec son analogue, le CEES. Il a été ainsi possible de définir une stratégie analytique et d'obtenir des données biologiques validant la pertinence biologique de ces biomarqueurs.

Les études sur le CEES nous ont également guidés dans la sélection des biomarqueurs les plus intéressants pour des applications à l'ypérite. Nous avons ainsi décidé de ne plus quantifier lors des prochaines expériences biologiques le conjugué au glutathion, GSH-Yp lors d'une exposition à l'ypérite, puisqu'il est un métabolite intermédiaire éphémère. Nous avons à l'inverse décidé de conserver le conjugué à la cystéine, Cys-Yp, parce qu'il est souvent le biomarqueur détecté en plus grande quantité. Des difficultés de sensibilité pour Cys-CEES avaient été rencontrées du fait de la présence d'interférents. Ces derniers sont liés à la matrice et à la fragmentation de la molécule d'intérêt. Comme la masse de la molécule est différente entre les dérivés de l'ypérite et ceux du CEES, les interférents pourraient disparaître. Par ailleurs, nous envisageons dans cette suite de travail d'utiliser des matrices humaines, plutôt que de souris, qui pourraient ne pas contenir ces interférents. L'acide mercapturique de l'ypérite, NAC-Yp, est potentiellement le biomarqueur le plus persistant parmi ceux de la voie de l'acide mercapturique. Il est donc gardé dans cette nouvelle méthode analytique adaptée à une exposition à l'ypérite. Nous garderons également l'adduit de la guanine N7Gua-Yp.

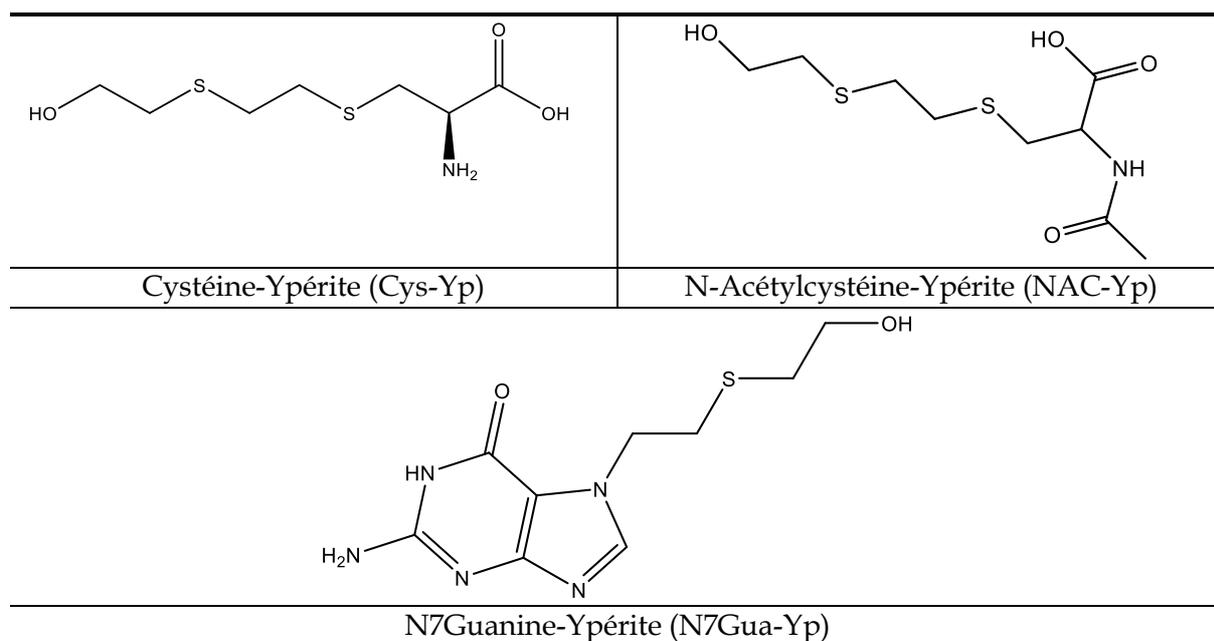


Figure 73 : Formule topologique des biomarqueurs de l'ypérite sélectionnés, Cystéine-Ypérite, N-Acétalcystéine-Ypérite, N7Guanine-Ypérite, après les traitements biologiques réalisés avec le CEES.

5.2. Synthèse et calibration des standards.

Les standards des conjugués de l'ypérite ne sont pas disponibles dans le commerce, et ont donc été synthétisés comme ce fut le cas pour les standards du CEES. La stratégie de synthèse pour les biomarqueurs du CEES a été de faire réagir le toxique avec la biomolécule d'intérêt (Cystéine, Glutathion, N-Acétalcystéine, dGuo). Une approche équivalente pour l'ypérite n'est pas possible au laboratoire qui n'a pas l'autorisation de disposer et d'utiliser cet agent chimique de guerre. Des conjugués ont été synthétisés avec d'autres électrophiles pour servir comme standards de méthodes analytiques. Par exemple, Biemann *et al.* ont préparé le conjugué GSH-Yp en partant du thiodiglycol [20] mais ils n'ont pas synthétisé les autres conjugués de la voie de l'acide mercapturique et leurs synthèses comportent de nombreuses étapes. Nous avons donc choisi une autre voie de synthèse, réalisable en une seule étape de la même façon qu'avec le CEES, en utilisant le sulfure de 2-chloroéthyl 2-hydroxyéthyl (CESE). C'est un composé qui a la même formule topologique que l'ypérite à l'exception d'un atome de chlore remplacé par un groupement hydroxyle (Figure 74). Ce composé a été obtenu auprès de la société ChemSpace (Riga, Lettonie) qui possède à son catalogue de nombreux composés synthétisés à la demande.

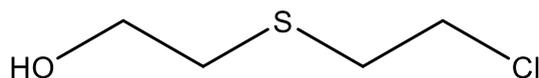


Figure 74 : Formule topologique du sulfure de 2-chloroéthyl 2-hydroxyéthyl (CESE).

L'intérêt du CESE est qu'il permet d'obtenir certains des dérivés produits par réaction de l'ypérite. Lorsque l'ypérite alkyle des biomolécules, un atome de chlore est éliminé dans la réaction. L'ypérite étant bifonctionnelle, il reste un second chlore, qui est soit éliminé par une seconde réaction d'alkylation de biomolécule soit hydrolysé pour donner une fonction hydroxyle (**Figure 75**). Ainsi, il est possible de retrouver comme métabolite de l'ypérite dans l'organisme des monoadduits à des biomolécules portant un chaîne hydroxyéthylthioéthyle. La réaction du CESE avec une biomolécule permet d'obtenir directement ce type de métabolites de l'ypérite (**Figure 75**). Par contre, il ne permet pas d'obtenir les bi-adduits et bi-conjugués produits par l'ypérite qui ne sont pas majoritaires mais qui ont des conséquences biologiques importantes.

Les synthèses avec le CESE ont été faites en suivant le même schéma que les synthèses avec le CEES présentées au Chapitre 1. Les détails se trouvent dans la partie Conditions Expérimentales à la p.237. Brièvement, nous avons fait réagir des solutions de cystéine et de NAC et de dGuo avec du CESE pur. Après réaction pendant une nuit, il ya eu des étapes de lavages et de purifications par un système HPLC-UV. Les biomarqueurs de l'ypérite sont aussi des molécules qui absorbent en UV ($\lambda = 220$ nm pour Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp), ce qui a permis de les collecter en sortie de colonne par identification de pics sur les chromatogrammes. Lors de la purification, les fractions collectées ont été analysées par UHPLC-MS/MS. Les fractions contenant les composés d'intérêt ont été regroupées et purifiées une seconde fois. Les solutions finales ont été lyophilisées puis mise en solution dans de l'eau MilliQ.

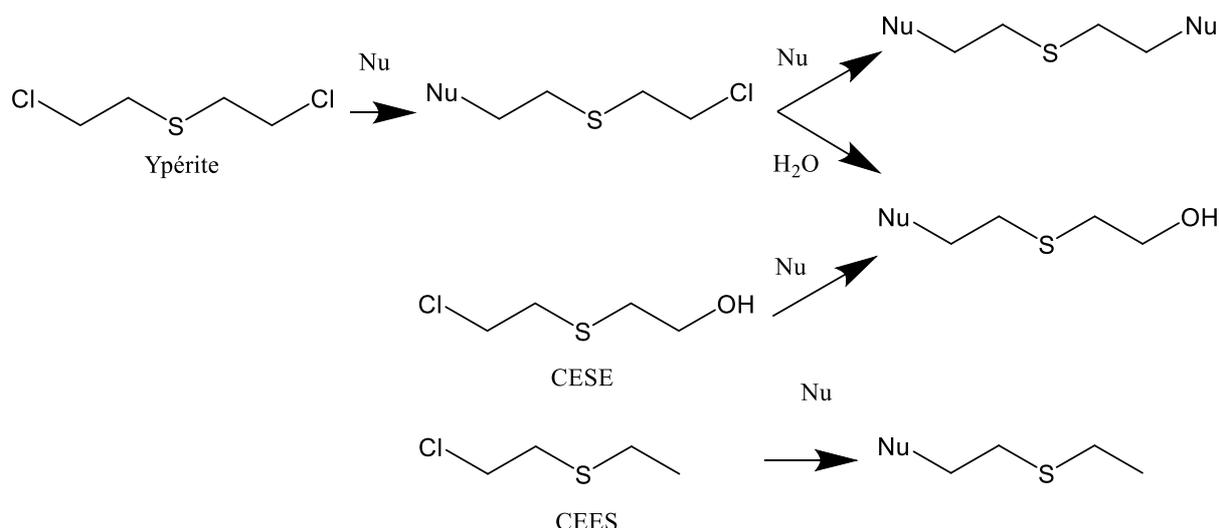


Figure 75 : Mécanismes réactionnels simplifiés entre soit l'ypérite soit le CESE soit le CEES et des nucléophiles en milieu aqueux. Le nucléophile, Nu, peut être des biomolécules telles que la N-acétylcystéine, la cystéine et la guanine.

L'étape suivante a été de vérifier la structure moléculaire des produits et d'évaluer leur pureté. Pour cela, une analyse ^1H RMN de chaque standard a été faite (**Tableau 14**). L'étude des spectres RMN a pu confirmer les structures des standards synthétisés. L'adduit N7Gua-Yp avait déjà été caractérisé par la RMN du proton, nos données concordent avec les résultats de Fidder *et al* [118]. L'analyse des spectres RMN a été facilitée par le travail fait pour les biomarqueurs du CEES puisque presque tous les groupements sont identiques. L'étude de la fragmentation en spectrométrie de masse permet de conforter la caractérisation des standards (p.177). La pureté a été estimée en faisant le ratio entre la somme des intégrations des impuretés sur la somme des intégrations de tous les pics du spectres (impuretés et standards). Ainsi, le standard de Cys-Yp est pur à 45%, le standard de NAC-Yp est pur à 57% et le N7Gua-Yp est pur à 62%. La présence d'impuretés dans les solutions des standards de l'ypérite n'a pas d'impact significatif lors de la détection en mode MRM.

La caractérisation des solutions de standards a permis de valider les structures et d'avoir une estimation de leur pureté. Les synthèses avec le CESE nous ont donc permis d'obtenir les standards recherchés : Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp. Il est ensuite nécessaire de connaître leur concentration pour réaliser des analyses quantitatives. Les solutions ont été calibrées par UHPLC couplée au spectromètre de masse en utilisant le mode de scan SIM. Comme référence pour calibrer les solutions nécessaires à la préparation de la gamme d'étalonnage, nous avons

utilisé les solutions calibrées de standards du CEES. Les concentrations des solutions mères des standards Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp ont ainsi été déterminées comme étant 1,668 mM ; 0,111 mM et 0,343 mM respectivement.

5.3. Synthèse et calibration des étalons internes.

Comme pour la méthode d'analyse des biomarqueurs du CEES, nous avons décidé d'utiliser la dilution isotopique. C'est pour cela que nous avons synthétisé des étalons internes marquées par des isotopes stables (*Figure 76*).

Nous avons donc synthétisé Cys*-Yp, NAC*-CEES et N7Gua*-CEES, qui ont été systématiquement ajoutés aux matrices avant les étapes de préparations des échantillons et aux standards d'étalonnage. Les synthèses sont similaires à celles utilisées pour les EI du CEES. Les détails se trouvent à la p.238 dans les Conditions Expérimentales. Nous avons fait réagir des solutions de chaque biomolécule marquée par des isotopes stables (¹³C et/ou ¹⁵N) (Cys *, NAC*, et dGuo*) avec du CESE. Après la réaction pendant une nuit, les lavages, la purification par SPE(voir p. 237), les EI ont été calibrés par UHPLC-MS/MS à partir des standards du CEES calibrés. Les concentrations des solutions mères des étalons internes, Cys*-Yp, NAC*-CEES et N7Gua*-CEES sont respectivement de 0,304 mM ; 0,060 mM et 0,651 μM.

Désormais, nous avons des solutions de standards calibrées ainsi que des EI spécifiques à l'ypérite. Elles ont été utiles pour adapter la méthode analytique des biomarqueurs du CEES à ceux de l'ypérite.

Cys-Yp				
Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Groupement
2,71	2H	t	6,2	2
2,79	4H	s	/	3 & 4
3,05	2H	m	4,4 / 17	5
3,69	2H	t	6,4	1
?	1H	dd	?	6
NAC-Yp				
Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Groupement
1,99	3H	s	/	7
2,70	2H	t	6,3	2
2,76	4H	s	/	3 & 4
3,02 & 2,87	2H	m	4,4 / 13,9	5
3,69	2H	t	6,3	1
4,31	1H	dd	4,6 / 8	6
N7Gua-Yp				
Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Groupement
2,53	2H	t	6,2	2
2,99	2H	t	6,4	3
3,60	2H	t	6,3	1
4,41	2H	t	6,7	4

Tableau 14 : Analyse des spectres RMN du proton de Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp.

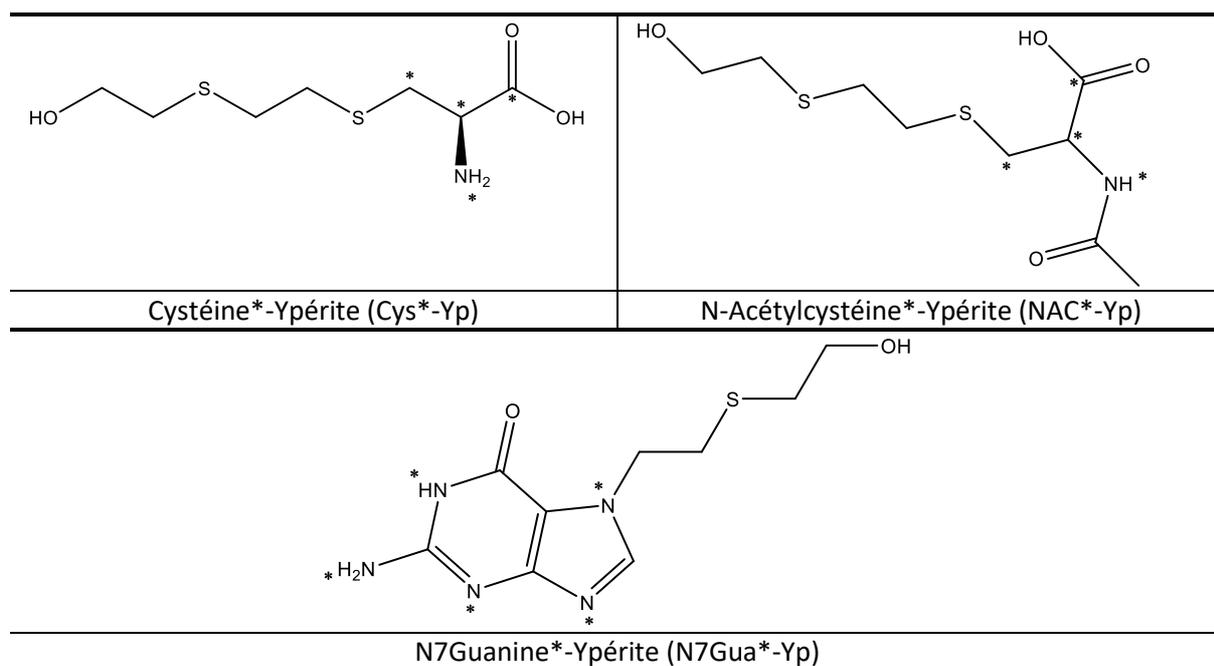


Figure 76 : Formule topologique des étalons internes des biomarqueurs de l'ypérite, l'astérisque désigne les isotopes stables ^{13}C et ^{15}N .

5.4. Préparation des échantillons adaptée aux biomarqueurs de l'ypérite.

La méthode mise au point au chapitre 1 est efficace mais chronophage. Comme expliqué précédemment (p.155), nous avons donc décidé d'optimiser cette étape du protocole analytique pour améliorer la robustesse et réduire le temps total de la préparation des échantillons.

La **Figure 77** récapitule l'ensemble des étapes de la préparation du plasma, de la décongélation de l'échantillon à son injection pour la SPE en ligne. Brièvement, l'échantillon dopé par des EI est filtré deux fois, d'abord avec un filtre de $0,2\ \mu\text{m}$ pour éliminer les particules puis avec une membrane de 30kDa pour éliminer la majorité des protéines. Le filtrat est directement injecté pour la SPE en ligne. Les paramètres de la SPE en ligne décrits au chapitre précédent ont été adaptés aux standards de l'ypérite (détails p.240). Le dépôt et le lavage de l'échantillon ne se fait qu'avec la phase mobile A aqueuse à 100% pendant 1 min. Après les analytes sont transférés vers la colonne analytique par les solvants de cette colonne.

Comme les 2 colonnes chromatographiques (SPE et analytique) possèdent des mécanismes de rétention différents, on parle d'orthogonalité. La colonne SPE est une phase

PPF alors que la colonne analytique a une phase C18. Plus l'orthogonalité est importante, plus on peut espérer obtenir une purification de l'échantillon efficace [191]. A noter que la colonne SPE est plus courte et que ses particules sont de plus grande granulométrie que la colonne UHPLC. L'ensemble de ces étapes prend environ 45 minutes contre 5 à 6h avec la SPE manuelle précédemment développée.

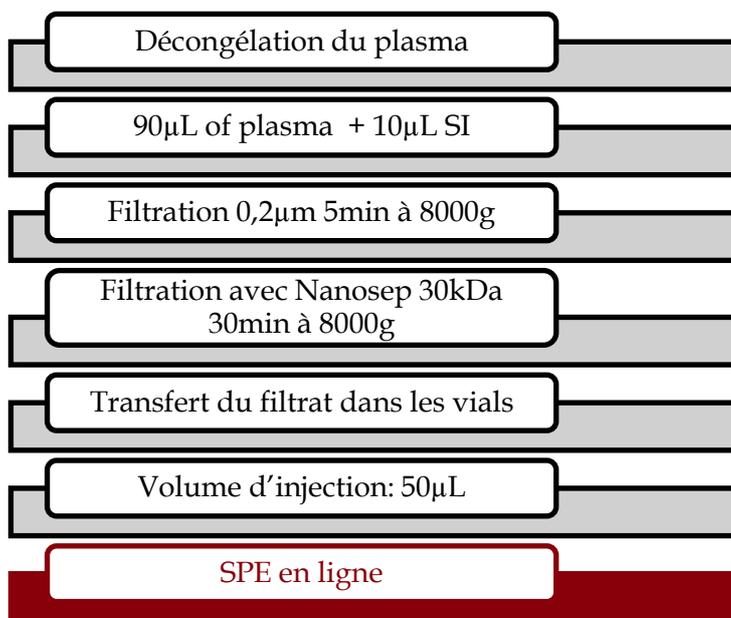


Figure 77 : Les différentes étapes de la préparation des échantillons de plasma.

5.5. Adaptation de la méthode UHPLC-MS/MS aux biomarqueurs de l'ypérite

Grâce aux standards synthétisés, nous avons pu adapter les paramètres de la chromatographie liquide et du spectromètre de masse de la méthode validée au chapitre 1 pour le CEES. Les dérivés du CEES et les standards de l'ypérite étant chimiquement peu différents, l'adaptation a été assez rapide. La différence principale est que les monoadduits de l'ypérite possèdent un groupe hydroxyle où ceux du CEES ont un atome d'hydrogène. Les biomarqueurs de l'ypérite sont donc plus polaires et moins bien retenus en chromatographie en phase inverse du fait d'une diminution des interactions hydrophobes. Le gradient de la chromatographie et la phase mobile B ont ainsi été modifiés afin d'augmenter la rétention des dérivés de l'ypérite sur la colonne. La phase mobile B est dorénavant du méthanol de qualité HPLC-MS tamponnée avec du formiate d'ammonium (2 mM) et de l'acide formique (0,2%). Les conditions initiales sont 1% de la phase mobile B pendant 2 min. La proportion de B

augmente linéairement jusqu'à 10% entre 2 et 4 min puis jusqu'à 60% entre 4 min et 8min. Il y a un plateau de 1 min à 60% de B avant un retour aux conditions initiales à partir de 9,1 min. L'augmentation de la part de solvant organique est plus progressive que lors de l'analyse des standards du CEES. Le temps d'analyse total est de 11 min en incluant la SPE en ligne c'est-à-dire exactement le même temps d'analyse que la méthode pour les dérivés du CEES.

Le spectromètre de masse est toujours utilisé avec le mode de scan MRM « Multiple Reaction Monitoring ». L'ensemble des paramètres du spectromètre de masse de la première méthode validée ont été gardés. Lors de la purification des standards, des spectres en mode MS² (product ion scan) ont été enregistrés pour chaque composé d'intérêt. Ils permettent d'identifier les ions fils les plus intenses pour définir les fragments gardés en MRM (*Tableau 15*). Certains fragments sélectionnés sont, de façon cohérentes, similaires à ceux observés pour les dérivés du CEES (*Figure 79*). En effet, les coupures se font autour des soufres (du soufre du CEES et du soufre de la biomolécule) *via* le mécanisme des coupures en alpha favorisées par la présence d'atomes électronégatifs. Pour chaque biomarqueur, 3 ions fils ont été retenus pour les analyses en mode MRM.

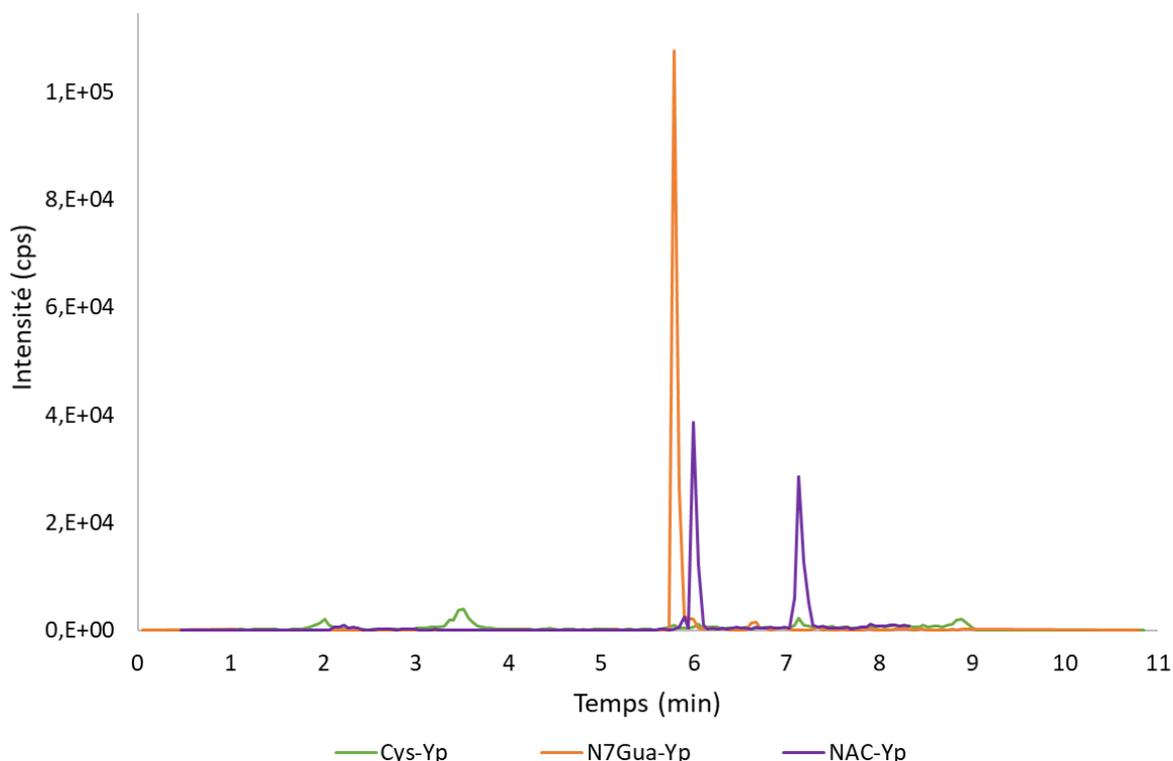


Figure 78 : Chromatogramme obtenu après injection en SPE-UHPLC-MS/MS de 0,5 pmol des biomarqueurs de l'ypérite dans du plasma humain. L'ordre de sortie est : Cys-Yp ($tr=3,5min$), N7Gua-Yp ($tr=5,8min$), NAC-Yp ($tr=7,1min$).

Nom	Ion parent (m/z)	Ions fils (m/z)
Cys-Yp	226	61 / 74 / 105
NAC-Yp	268	84 / 116 / 162
N7Gua-Yp	256	61 / 87 / 105

Tableau 15 : Ions parents et ions fils lors de l'analyse en mode MRM des standards des biomarqueurs de l'ypérite.

5.6. Validation de la méthode SPE en-line - UHPLC - MS/MS dans le cas du plasma.

Nous avons voulu valider la méthode d'analyse utilisant la SPE en ligne adaptée au plasma pour les biomarqueurs de l'ypérite. L'objectif à court terme est de pouvoir utiliser cette méthode pour analyser du plasma d'animaux intoxiqués par de l'ypérite. Ces expérimentations animales sont réalisées par l'IRBA. Comme pour la première validation, nous avons suivi les critères définis par la FDA [6]. Nous nous sommes aussi appuyés sur un rapport d'un groupe de travail en toxicologie médico-légale [7]. Pour l'ensemble des expériences de validation la matrice et bien que les premières applications envisagées étaient dans des études animales, nous avons utilisé comme matrice blanche (matrice de contrôle) du plasma humain d'origine commerciale (CliniSciences). Nous n'avons pas assez de plasma de souris témoins de l'étude, présentée au chapitre précédent, pour réaliser toutes les analyses de la validation. De plus, l'objectif final est d'avoir une méthode adaptée aux matrices humaines et l'utilisation de plasma humains était donc très pertinente.

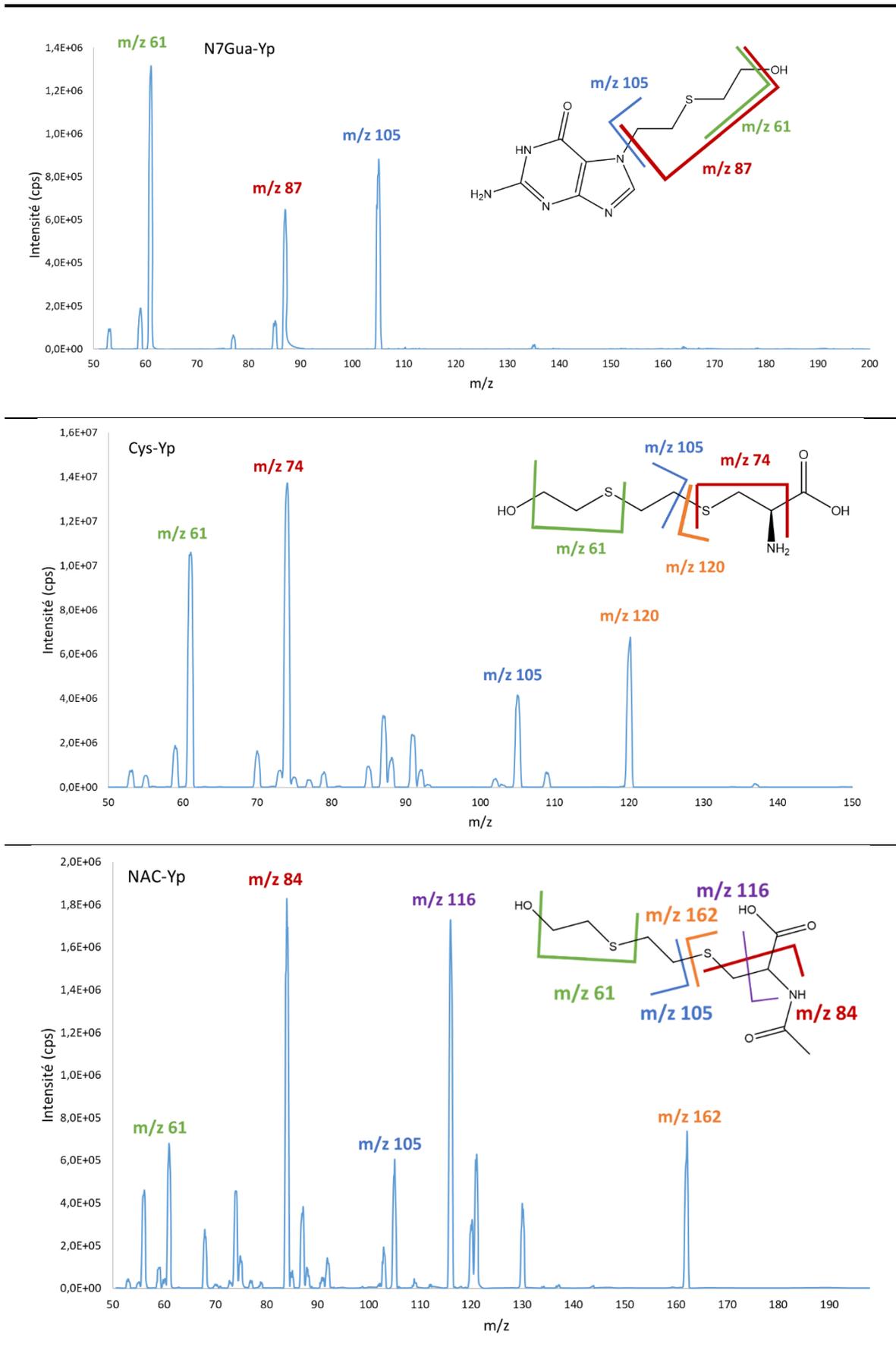


Figure 79 : Spectres de fragmentations des molécules Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp.

5.6.1. La droite d'étalonnage

Nous avons choisi de travailler avec une gamme linéaire comme pour les biomarqueurs du CEES. Les courbes d'étalonnage des standards sont donc modélisées par une droite passant par zéro. Pour NAC-Yp et N7Gua-Yp, la gamme linéaire validée se situe entre 0,1 et 10 pmol injectés. Pour Cys-Yp, la gamme est réduite de 0,25 à 10 pmol injectés car le point d'étalonnage à 0,1 pmol n'a pas été validé (*Figure 81*). Au point de 0,1 pmol, les variations sont trop importantes, le CVr et le CVR sont supérieurs à 20%.

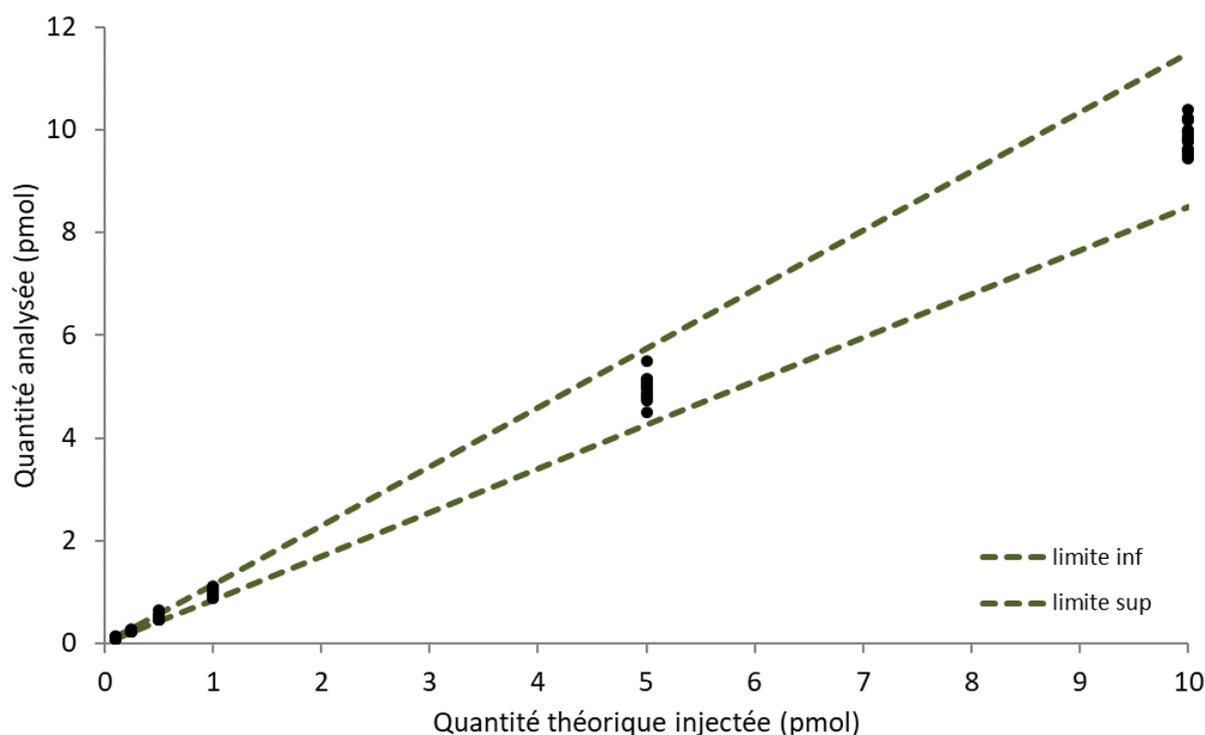


Figure 80 : Analyse des étalons de la droite d'étalonnage du N7Gua-Yp trois jours différents (n=15). Les limites (inférieure et supérieure) sont fixées à $\pm 15\%$ de la quantité d'étalon attendue.

5.6.2. La spécificité

Des matrices blanches de plasma humain ont été analysées ainsi que des matrices blanches de plasma dopées avec les étalons internes marqués par des isotopes stables. Dans tous les cas, il n'y avait la présence d'aucun interférent aux temps de rétention des standards. Il n'y a pas eu non plus d'effet mémoire même après injections des concentrations les plus élevées des standards de la gamme d'étalonnage. Les critères de sélection d'un analyte, au moment de l'intégration des pics, sont les mêmes que ceux utilisés pour les biomarqueurs du CEES.

5.6.3. La fidélité

L'étude de la fidélité permet de s'assurer que les résultats de plusieurs analyses d'un même échantillon sont équivalents. Pour étudier ces variations intra-jour et inter-jour, un blanc, un blanc avec les étalons internes et les six points de la gamme contenant la LOQ ont été analysés 5 fois lors d'une même série. Plusieurs séries similaires ont été analysés à des jours différents. La répétabilité a été évaluée grâce au calcul du CV de répétabilité noté CVr. Pour finir, la précision inter-jour, de la même façon a été déterminé par le CV de fidélité intermédiaire noté CVR. En accord avec les critères de la FDA, les variations intra-jour et inter-jour de NAC-Yp et N7Gua-Yp ne dépassent ni 15% ni 20% pour la plus faible concentration (*Figure 81*). En revanche, pour le plus petit point de la gamme de Cys-Yp les variations intra-jour sont de 27,6% et les variations inter-jour sont de 37,3%. De telles variations ne permettent pas de valider ce point de la gamme.

5.6.4. La justesse

Les points de la gamme sont validés du point de vue de la justesse si l'écart entre la valeur réelle et la valeur déterminée est en moyenne inférieure à 15%, et est tolérée jusqu'à 20% pour le point de concentration correspondant à la LOQ. La justesse est validée pour tous les points de la gamme de tous les standards. La justesse n'est ni inférieure à 95,6% ni supérieure à 107,2%. La méthode permet donc d'avoir des valeurs très proches des valeurs réelles.

n (pmol)	Cys-Yp			NAC-Yp			N7Gua-Yp		
	Justesse	CVr	CVR	Justesse	CVr	CVR	Justesse	CVr	CVR
0,10	99,2%	27,6%	37,3%	102,3%	13,1%	13,1%	107,2%	12,6%	13,7%
0,25	99,3%	10,6%	11,7%	97,3%	5,8%	5,9%	100,4%	4,8%	4,9%
0,50	95,6%	6,5%	7,7%	102,2%	7,3%	7,3%	101,5%	9,6%	10,4%
1,00	99,8%	5,1%	6,2%	97,9%	8,4%	8,4%	100,2%	6,7%	6,7%
5,00	101,1%	2,6%	2,6%	103,1%	11,5%	12,7%	99,1%	4,9%	4,9%
10,00	98,6%	3,2%	3,3%	96,9%	6,4%	7,2%	98,6%	2,3%	3,3%

Figure 81 : Validation statistique de la méthode. La justesse et la répétabilité de tous les points de la gamme d'étalonnage sont présentés. CVr correspond aux variations intra-jour et CVR correspond aux variations inter-jour.

5.6.5. Limite de détection (LOD) et Limite de Quantification (LOQ)

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été établis pour chaque standard en utilisant la méthode décrite au chapitre 1. La LOQ et la LOQ de la méthode développée ont été déterminés en analysant 9 échantillons blancs de plasmas dopés par les SI. Les LOD obtenues sont 54, 83 et 25 fmol pour Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp respectivement. Les LOQ correspondantes sont 125, 183 et 51 fmol.

5.6.6. Validation par les profils d'exactitudes

Une représentation graphique des résultats en valeurs relatives par rapport à la valeur de référence (valeur réelle) est effectuée. On reporte sur l'axe horizontal les valeurs de référence moyennes, et sur l'axe vertical :

- la justesse :

$$\text{Justesse (\%)} = \frac{\text{Concentration retrouvée par la méthode}}{\text{Concentration réelle}} \times 100$$

Équation 7 : Formule permettant de calculer la justesse.

- les bornes de tolérance relatives haute et basse

Ces bornes forment un intervalle qui sert à prédire dans quel intervalle se situerait un grand nombre de mesures. Dans la mesure où on fait une prédiction, il y a bien sûr un risque d'erreur et il existe différents intervalles de dispersion selon la façon dont le risque est pris en compte. Nous avons choisi un risque de 0,05 donc statistiquement 95% des mesures se situent dans l'intervalle de tolérance.

$$\text{Justesse} \pm (t \times \text{CVR})$$

Équation 8 : Formule permettant de calculer les bornes de tolérance relatives haute (en faisant l'addition) et basse (en faisant la soustraction). CVR est la fidélité intermédiaire, t est obtenue par la loi de Student inverse (risque, DDL).

- les limites d'acceptabilité relatives haute et basse.

Justesse théorique (100%) ± Erreur acceptée (15% et 20% pour le plus petit niveau)

Équation 9 : Formule permettant de calculer les limites d'acceptabilité relatives haute et basse.

L'interprétation des profils d'exactitudes présentés à la *Figure 82* est simple. Aussi longtemps que les bornes de tolérances relatives sont comprises entre les limites d'acceptabilité, la probabilité que la différence entre la valeur trouvée par la méthode et la valeur de réelle reste inférieure à la limite d'acceptabilité de 15% et de 20%. Dans le cas de Cys-Yp, la borne supérieure coupe la limite supérieure d'acceptabilité vers le niveau de 0,25 pmol. Cela signifie que pour une quantité égale ou inférieure, la méthode ne permet plus en moyenne des résultats acceptables. Le domaine de validité correspond aux concentrations pour lesquelles les bornes de tolérance sont comprises dans les limites d'acceptabilité. Pour Cys-Yp, le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les 0,5 et 10 pmol. Pour NAC-Yp et N7Gua-Yp, les bornes sont toujours comprises dans les limites ce qui permet d'avoir pour ces standards un domaine de validité entre 0,1 pmol et 10 pmol.

Comme attendu, nous remarquons que la fidélité augmente avec la concentration, conduisant à un profil d'exactitude élargi aux faibles quantités, et qui se rétrécit quand celle-ci augmente.

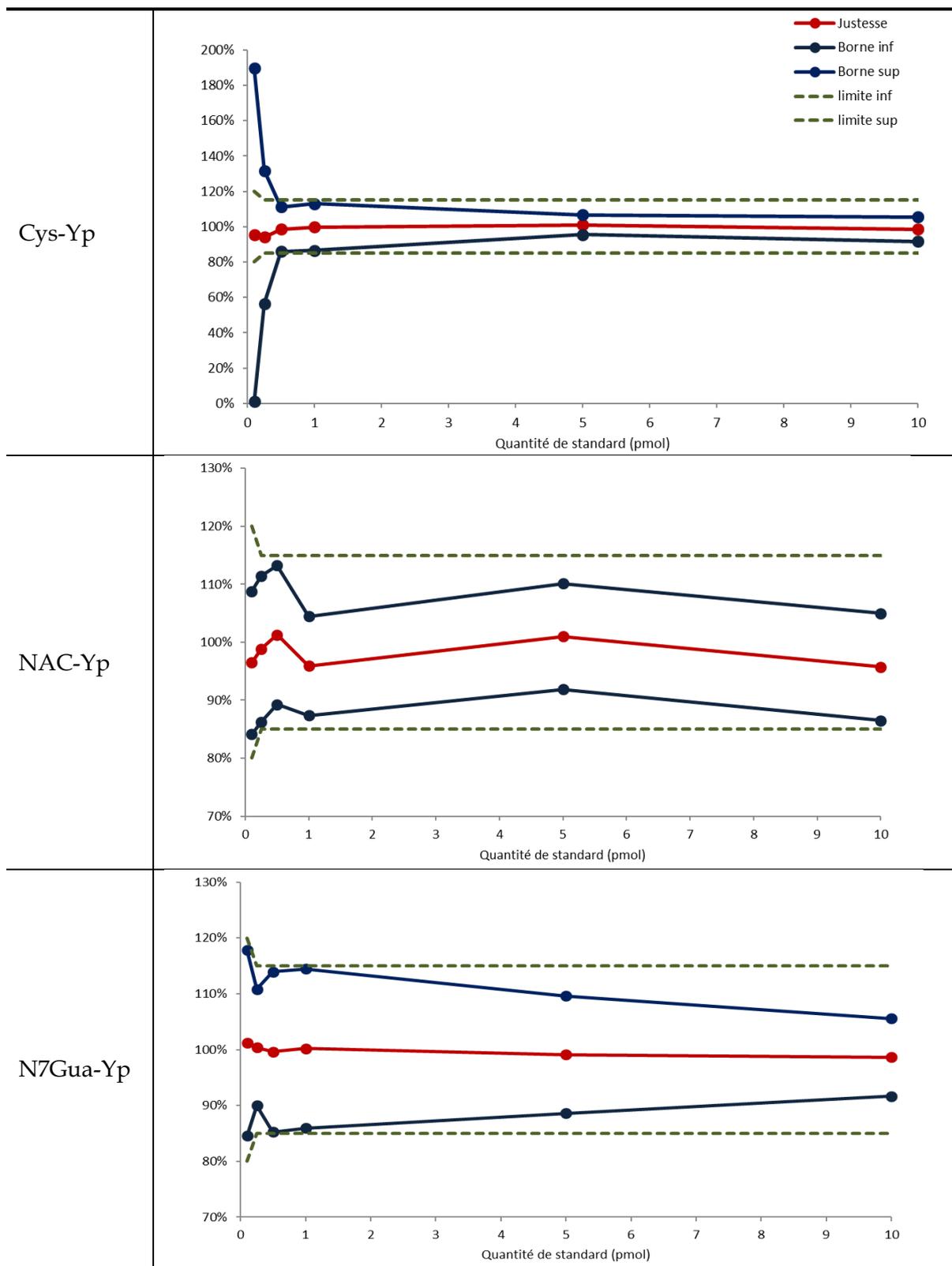


Figure 82 : Profils d'exactitude des standards Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp.

5.6.7. La stabilité

L'étude de la stabilité des biomarqueurs dans les matrices permet d'identifier les conditions de stockage dans lesquelles les analytes sont stables et celles où ils se dégradent. Dans les plasmas gardés à -20°C pendant 2 mois, les standards N7Gua-Yp et NAC-Yp sont stables. L'impact des décongélations successives a aussi été évalué. Après la répétition de 7 cycles de congélation / décongélation, la quantité de NAC-Yp détectée est égale à la quantité initiale. La quantité de N7Gua-Yp est légèrement surévaluée avec ces cycles. Nous ne pouvons conclure sur la stabilité de Cys-Yp car les quantités de ce standard dans ces séries-là de validation étaient aberrantes avant étude de la stabilité, certainement à cause d'une erreur de manipulation.

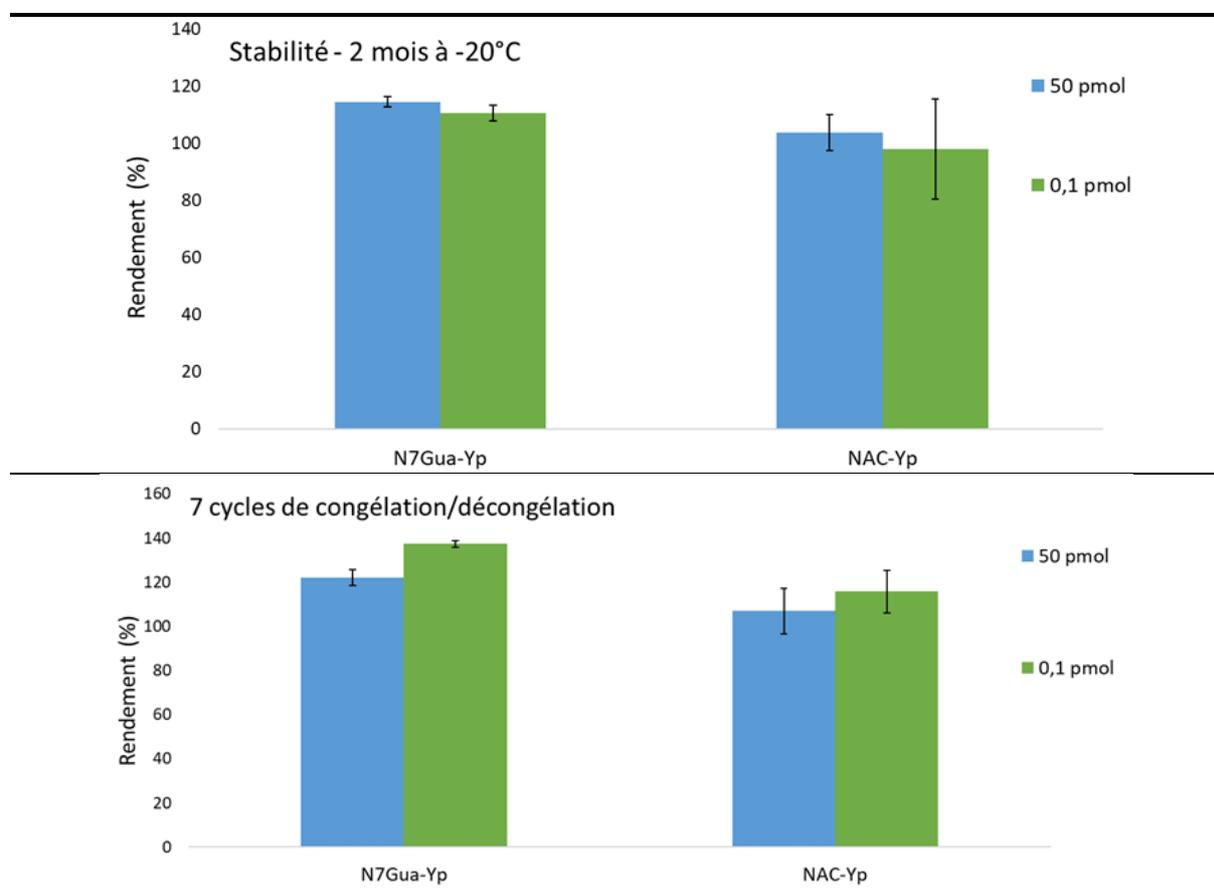


Figure 83 : Recouvrement des standards dans du plasma après conservation 2 mois à -20°C ou après 7 cycles de congélation / décongélation. Les résultats de Cys-Yp ne sont pas montrés car les quantités de ce standard dans ces séries de validation étaient aberrantes avant étude de la stabilité.

5.7. Bilan

L'ensemble des outils d'analyse ont été mis en place pour l'analyse dans le plasma des biomarqueurs d'ypérite choisis : Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp. Nous disposons, après synthèse, de solutions calibrées de leur standard ainsi que leur EI. Le protocole mis au point est rapide. La première partie de la préparation d'échantillon consiste en deux filtrations successives permettant d'éliminer la majorité des protéines. La seconde partie est réalisée de façon automatisée au sein de la chaîne HPLC grâce à la SPE en ligne. Les paramètres de la SPE en ligne, de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse ont été adaptés aux biomarqueurs de l'ypérite à partir de ceux utilisés pour les dérivés du CEES. Cette méthode peut donc être utilisée pour l'analyse de plasma dans le cadre d'une exposition à l'ypérite animale et humaine. Afin de pouvoir synthétiser les standards de l'ypérite, le CESE a été utilisé. Tout comme le CEES, il peut être considéré comme un analogue de l'ypérite. Des traitements biologiques avec le CESE permettent de mettre en application la méthode validée dans ce chapitre et de faire une étude comparative entre le CEES et le CESE.

6. Vers un nouvel analogue de l'ypérite : le CESE.

Le sulfure de 2-chloroéthyl 2-hydroxyéthyl (CESE) a servi à synthétiser les standards des biomarqueurs de l'ypérite choisis. Le CESE peut être aussi considéré comme un analogue de l'ypérite, c'est-à-dire un composé induisant des effets biologiques similaires. Il est très peu présent dans la littérature et n'a été considéré que dans un article comme un potentiel analogue [192]. De par sa structure chimique, il a une réactivité très proche de celle de l'ypérite. La différence majeure est qu'il est monofonctionnel à l'instar du CEES. Cependant, à la différence de ce dernier, il porte une fonction hydroxyle qui mime mieux les modifications des biomolécules que le CEES. Nous avons donc utilisé le CESE lors de traitements de cultures primaires de kératinocytes humains normaux pour vérifier la formation des biomarqueurs de l'ypérite et pour évaluer sa toxicité par rapport à celle du CEES. Les résultats de ces traitements permettent d'évaluer la pertinence de cet analogue peu utilisé. Le protocole des traitements biologiques est identique à celui pour les traitements des cellules HaCaT.

6.1. Propriétés physico-chimiques du CESE

Le CESE est un produit de la dégradation de l'ypérite. Il est le résultat d'une première hydrolyse de l'ypérite en milieu aqueux. La seconde hydrolyse forme le thiodiglycol (TDG) (*Figure 84*). Le *Tableau 16* présente quelques propriétés physico-chimiques de l'ypérite, du CESE et du CEES. En faisant une comparaison, nous constatons que le CESE a des propriétés plus proches de celles de l'ypérite que le CEES. C'est le cas pour la masse moléculaire, le point d'ébullition et la densité. Au laboratoire, lors de l'utilisation du CESE et du CEES, nous avons aussi observé une différence d'aspect. Le CESE est jaune et huileux, ce qui correspond à la description classique de l'ypérite en présence d'impuretés. Au contraire, le CEES utilisé est incolore et se prélève facilement avec des pipettes, il n'est pas huileux. Ces considérations qualitatives montrent que le CESE d'un point de vue physico-chimique est plus proche de l'ypérite que le CEES.

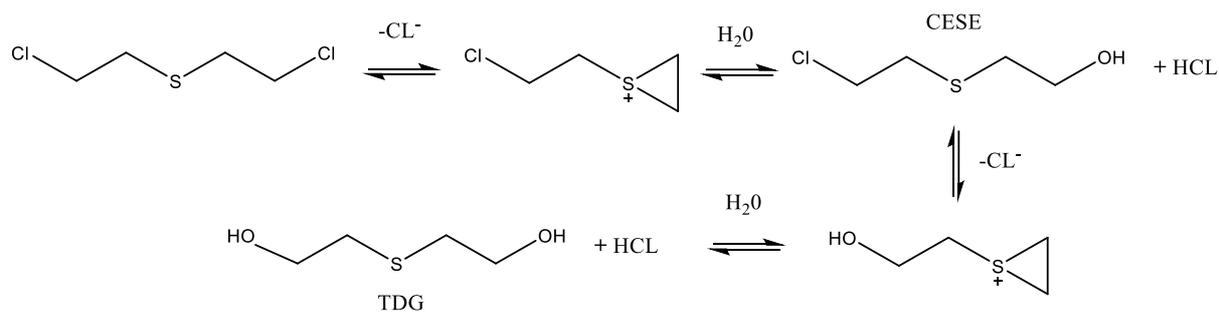


Figure 84 : Deux hydrolyses successives de l'ypérite qui forment d'abord le CESE puis le TDG.

Propriétés	Ypérite	CESE	CEES
Couleur	Jaune / Brun	Jaune	Incolore
Masse moléculaire (g/mol)	159	140	124
Point d'ébullition (°C)	216	250	156
Densité	1,274	1,197	1,07

Tableau 16 : Comparaison de certaines propriétés physico-chimiques de l'ypérite, du CESE et du CEES.

6.2. Toxicité

D'après la fiche de sécurité du fabricant, le CESE est dangereux. Il est toxique en cas d'ingestion, par contact cutané, par inhalation. Il provoque une irritation cutanée, une sévère irritation des yeux et peut irriter les voies respiratoires. Classé CMR, il est susceptible d'induire des anomalies génétiques, de provoquer le cancer, de nuire à la fertilité ou au fœtus, des effets graves pour les organes. C'est un produit qui se manipule avec de grandes précautions, avec tous les équipements de protection individuelle et sous sorbonne.

Le **Tableau 17** présente quelques doses létales médianes chez le rat et la souris de l'ypérite, du CESE et du CEES. Malheureusement, le manque de données sur la toxicité animale du CESE limite la comparaison des DL50. Nous pouvons constater que le CEES et le CESE sont moins toxiques que l'ypérite. En effet, ces deux analogues ont des DL50 supérieures à celles de l'ypérite d'un facteur variant de 5 à presque 200, chiffres qui montrent une plus forte

toxicité du CESE que du CEES. Dans le cas de la DL50 d'une exposition cutanée chez la souris, nous avons les valeurs pour les trois toxiques. Le plus toxique est l'ypérite avec une DL50 de 5,7-9,7 mg/kg suivi du CESE avec une DL50 de 600 mg/kg puis le moins toxique des trois est le CEES avec une DL50 de 1425 mg/kg.

Nom	DL 50 rat oral (mg/kg)	DL 50 rat peau (mg/kg)	DL 50 rat sous-cutanée (mg/kg)	DL 50 souris intraveineuse (mg/kg)	DL 50 souris peau (mg/kg)	DL 50 souris oral (mg/kg)	DL 50 souris sous-cutanée (mg/kg)
Ypérite	2,4 ^v	2,4 ^v	3,4 ^v	8,6	9,7 ^g 5,7 ^v	19,3 ^g 8,1 ^v	13,5 ^g 23 ^v
CEES	252	nd	nd	nd	1425 ^g	566 ^g	100 ^g
CESE	nd	nd	nd	35 ^a	600 ^a	nd	nd

Tableau 17 : Toxicité chez les animaux de l'Ypérite, du CESE et du CEES en utilisant comme indicateur la dose létale médiane (DL 50). Les références sont : ^v pour Vijayaraghavan et al. [193] ^g pour Gautam [194] et al. et ^a pour Anslow et al. [195] ; nd signifie qu'aucune donnée n'a été trouvée.

6.3. Etude comparative de la cytotoxicité du CEES et du CESE

Afin de mettre en évidence une éventuelle différence de toxicité entre le CEES et le CESE au niveau cellulaire, nous avons réalisé une série d'études sur des cultures primaires de kératinocytes humains normaux. Ils sont issus d'explants de réduction mammaires de patients sains. Tous les donneurs sont Caucasiens, et leur peau a un phototype II ou III selon la classification de Fitzpatrick. Les cellules primaires sont plus sensibles à leur environnement que les cellules immortalisées. En effet, leur culture est plus délicate et leur réponse à un toxique est en général plus importante. La première expérience a consisté en des tests de viabilité par la méthode au MTT. Nous avons utilisé ce test pour étudier les différences de taux de survie de cellules traitées avec les mêmes concentrations des deux analogues. Les résultats nous permettent aussi de déterminer la gamme des doses de toxiques pour réaliser des traitements à l'image de ceux réalisés avec les HaCaT en vue d'analyser leurs biomarqueurs dans les milieux de culture.

Le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par rapport aux cellules de contrôle non traitées. Pour le test, les cellules ont été traitées pendant 30 min avec différentes concentrations en CEES ou en CESE (de 0 à 10 mM) dans du PBS, (voir détails des conditions du test dans la Partie Conditions Expérimentales p.230). Ensuite les cellules ont été incubées pendant 24h à 37°C dans du milieu frais sans toxique avant d'ajouter le MTT. Les tests ont été réalisés avec deux donneurs différents et répétés deux fois.

Pour le donneur 1, après 24h, les taux de survie mesurés sont supérieurs à 80% jusqu'à 1 mM de CEES alors qu'il est déjà inférieur à 80% avec 0,1 mM de CESE (*Figure 85*). A toutes les concentrations, le taux de survie avec le CESE est inférieur à celui avec le CEES. Pour ce donneur, le CESE est bien plus toxique dans les kératinocytes que le CEES. Les kératinocytes du donneur 2 sont moins sensibles. Le taux de survie reste supérieur à 80% jusqu'à 1 mM que ce soit avec le CEES ou le CESE. Seulement aux concentrations les plus importantes (2 et 5 mM), le taux de survie avec le CESE est inférieur à celui avec le CEES. Pour la suite des expériences, nous nous sommes fixés comme limite une survie supérieure à 60%. Ainsi, Les traitements des kératinocytes pour l'analyse des milieux de culture ont été faits avec des concentrations de CESE comprises entre 0 et 0,5 mM d'analogue pour assurer un taux de 80% de survie minimum des cellules traitées.

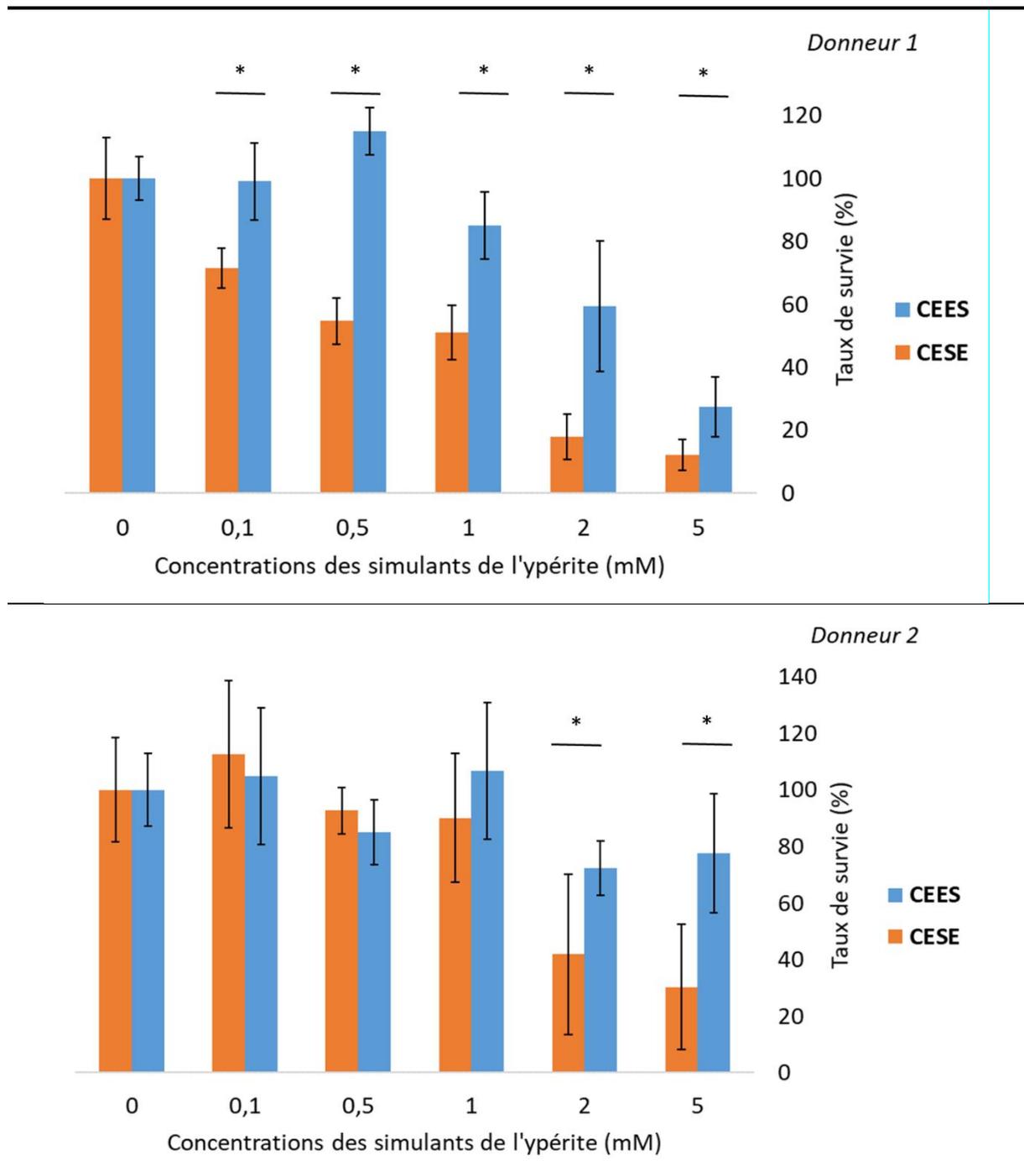


Figure 85 : Taux de survie des kératinocytes primaires issus du donneur 1 et 2 après un test de cytotoxicité au MTT après traitement soit au CEES soit au CESE. Les cellules ont été traitées pendant 30 min avec différentes concentrations en toxique dans du PBS. Elles ont été incubées pendant 24h à 37°C avant ajout du MTT. Le symbole pour les valeurs statistiquement différentes entre CEES et CESE pour $p < 0,01$ est : *.

6.4. Formation des biomarqueurs de l'ypérite par traitement *in vitro* au CESE

Après décongélation d'une ampoule de kératinocytes du donneur 2 et mise en culture, les cellules ont été amplifiées (détails dans la Partie Conditions Expérimentales p.229). Deux passages, au maximum, ont été réalisés avant traitement pour réaliser des expériences plus reproductibles car au-delà ces cellules commencent à se différencier. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre pour les expositions. Les traitements ont été faits en tripliquât pour chaque concentration de CEES et de CESE (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 mM).

Deux traitements ont été faits avec les mêmes doses de toxiques. Avant chaque traitement, le milieu de culture a été enlevé afin que les cellules soient dans du PBS pendant l'exposition. Lors du traitement 1, 3 mL de PBS contenant les différentes concentrations d'analogue ont été ajoutés. Le toxique a été dilué au préalable dans le PBS *i.e.* avant ajout dans les boîtes de Pétri. Lors du traitement 2, l'ajout du toxique a été différent car il a été directement mis dans les boîtes de Pétri contenant déjà 3 ml de PBS, donc sans dilution en amont.

Ensuite, après deux lavages au PBS pour enlever toutes traces de CEES ou de CESE, les cellules ont été remises dans du milieu de culture frais afin d'assurer leur survie. Elles ont été incubées 6h à 37°C afin de les laisser métaboliser les analogues comme lors des traitements des HaCaT. Pour finir, le milieu a été collecté et conservé à -20°C. A la suite des traitements, les milieux de culture sont analysés comme lors des traitements des HaCaT.

La *Figure 86* montre les principaux résultats obtenues par le traitement 1, la *Figure 87* montre ceux du traitement 2. Après analyse des milieux de culture des cellules traitées par le CESE, nous avons pu détecter le conjugué Cys-Yp et l'adduit N7Gua-Yp. Ainsi, nous avons la confirmation que cet analogue est capable d'induire les mêmes mono-adduits et mono-conjugués que l'ypérite. Comme lors des traitements des HaCaT et des explants de peau humaine, l'acide mercapturique NAC-Yp n'est pas détecté lors des traitements de cellules issues directement de peau humaine.

Il y a une différence significative entre les concentrations des biomarqueurs du CEES du traitement 1 et du traitement 2. Cette variation se reflète sur les valeurs des pentes des droites de la relation entre les concentrations en biomarqueur et la concentration en toxique. Pour le conjugué Cys-CEES lors du traitement 1, la pente est de 188 alors qu'elle est de 2003 lors du traitement 2. Pour l'adduit N7Gua-CEES lors du traitement 1, la pente est de 2,3 alors qu'elle

est de 1,0 lors du traitement 2. Lors du traitement 1, les concentrations en Cys-Yp et Cys-CEES sont équivalentes et les concentrations en N7Gua-Yp sont environ deux fois supérieures à celles en N7Gua-CEES. Cependant, lors du traitement 2, les concentrations en biomarqueurs du CEES sont largement supérieures à celles des biomarqueurs du CESE. Au vue de ces résultats contradictoires, il n'est pas possible de conclure sur l'analogue induisant le plus de biomarqueurs donc sur l'analogue pouvant être le plus toxique. Travaillant avec un seul temps d'incubation, il n'est pas possible de prendre en considération la vitesse de formation des métabolites. Les différences entre le traitement 1 et 2, peuvent être expliquées soit par une erreur de manipulation soit par la différence dans la façon dont l'analogue est ajouté aux cellules. Une façon d'éliminer des variations entre les traitements est de faire des co-traitements *i.e.* avec les deux analogues à la fois. Le CESE et le CEES seraient ajoutés en quantité égale dans les mêmes boîtes de Pétri. Par ce biais, les deux analogues seraient donc en compétition directe. L'analyse des milieux de culture permettra de comparer le CESE et le CEES.

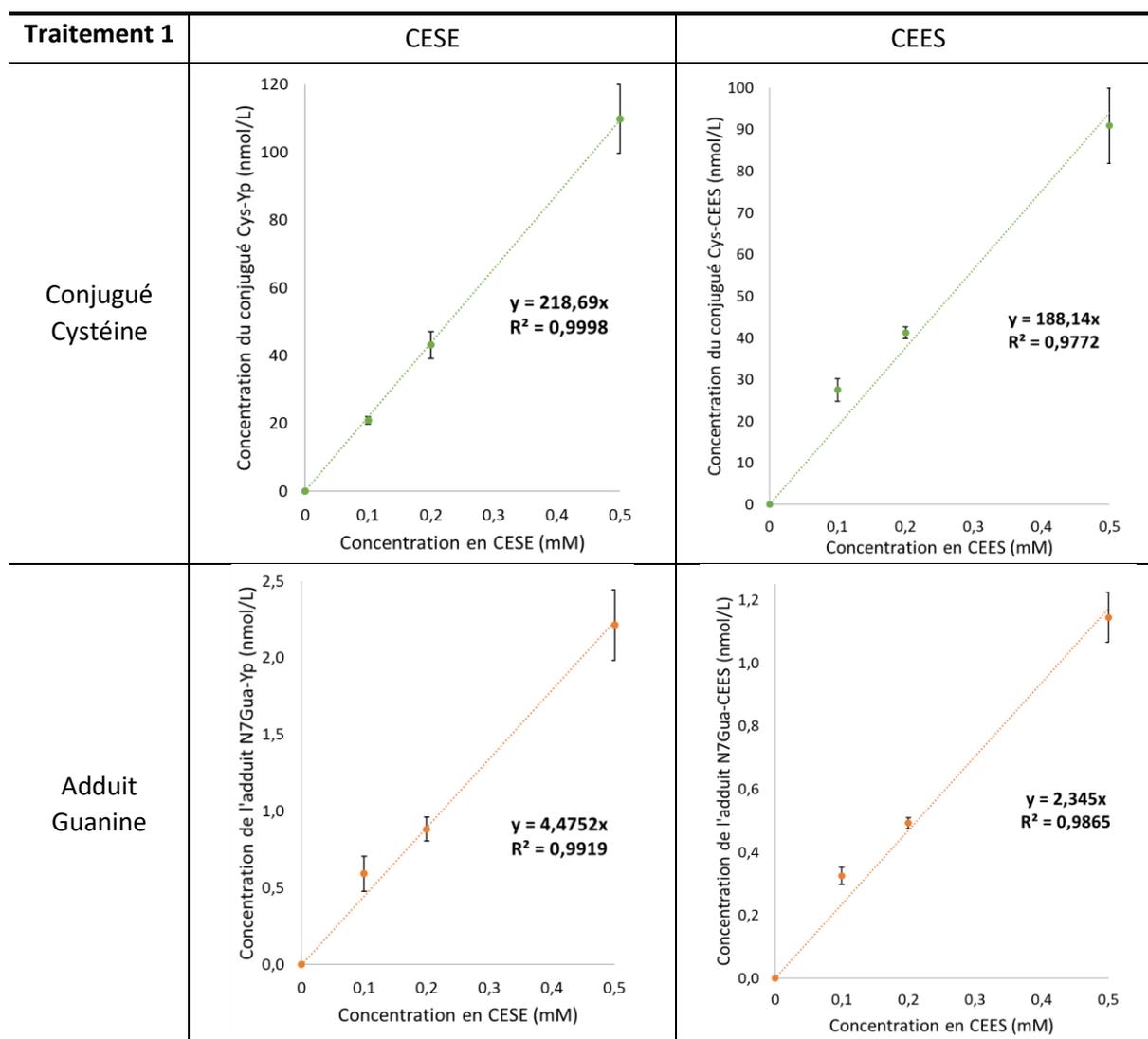


Figure 86 : Evolution de la concentration des biomarqueurs induits par le CESE (Cys-Yp et N7Gua-Yp) et par le CEES (Cys-CEES et N7Gua-CEES) dans les milieux de culture des kératinocytes traités par différentes doses de CESE et de CEES (0,1 ; 0,2 et 0,5 mM) lors du traitement 1. Les cellules ont incubé avec du milieu de culture pendant 6h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM (n=3).

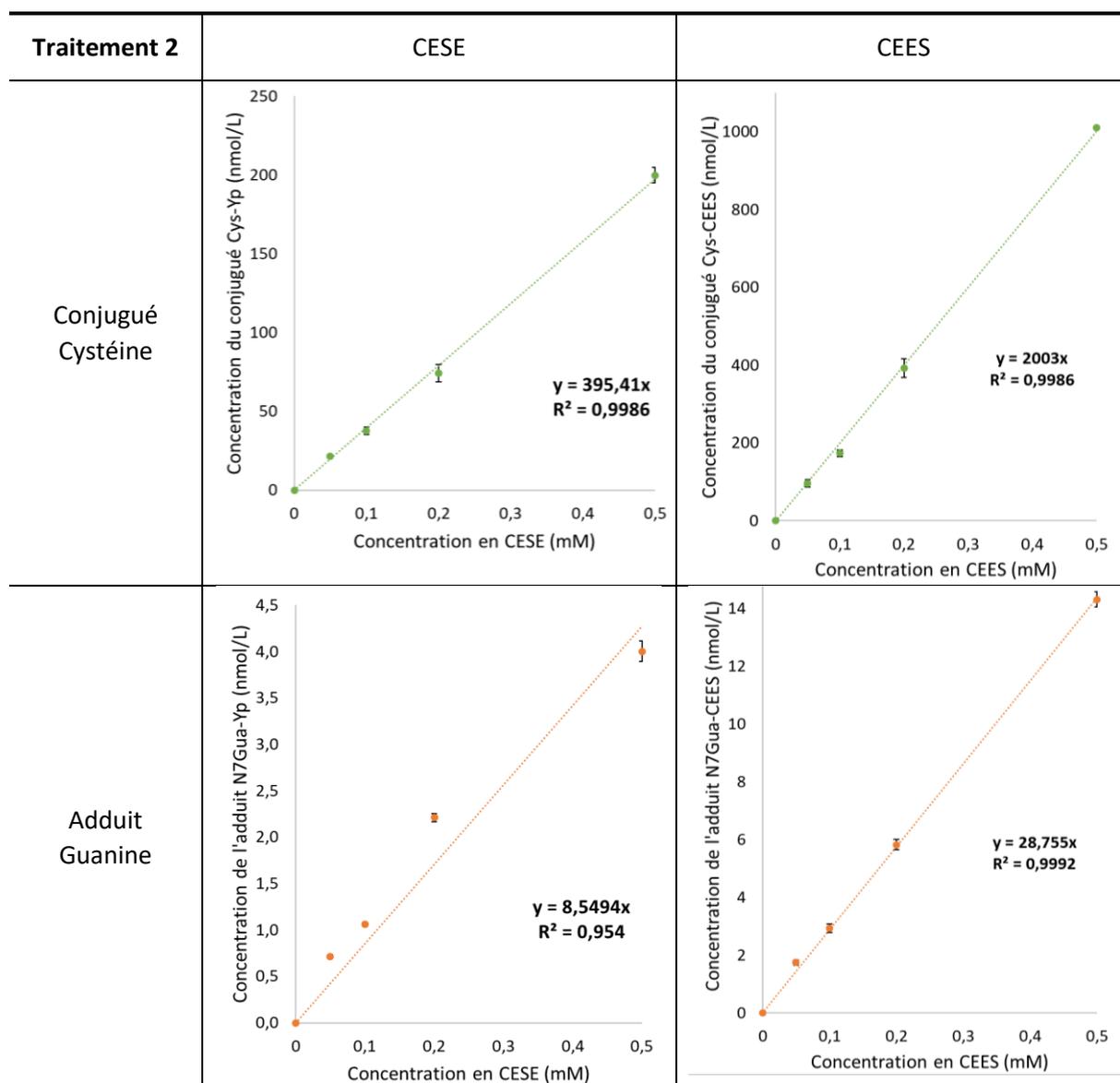


Figure 87 : Evolution de la concentration des biomarqueurs induits par le CESE (Cys-Yp et N7Gua-Yp) et par le CEES (Cys-CEES et N7Gua-CEES) dans les milieux de culture des kératinocytes traités par différentes doses de CESE et de CEES (0,05 ; 0,1 ; 0,2 et 0,5 mM) lors du traitement 2. Les cellules ont incubé avec du milieu de culture pendant 6h. Les données représentées sont la moyenne \pm SEM ($n=3$).

6.5. Bilan

Le CESE, de par ses propriétés physico-chimiques, sa toxicité, et sa capacité à former des mono-adduits et des mono-conjugués identiques à ceux de l'ypérite, est un analogue pertinent de cette dernière. Par rapport à nos études et aux biomarqueurs étudiés, il est plus adéquat

que le CEES. Sa principale limite, à l'instar du CEES, est son incapacité à former des bi-conjugué ou des bi-adduit ce qui est sans doute la raison de sa toxicité plus faible que celle de l'ypérite. Le CESE étant très peu utilisé, les informations sur ses effets biologiques sont limitées. Les études de comparaison de la toxicité du CEES et du CESE tendent à montrer que le CESE est plus toxique que le CEES. Cependant, des traitements supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir tirer des conclusions quant aux mécanismes sous-jacents.

Discussion générale

1. Développement analytique pour les biomarqueurs de l'ypérite

1.1. La préparation des échantillons

Dans le domaine de l'analyse de biomarqueurs d'une intoxication à l'ypérite, la méthode de préparation des échantillons la plus courante est la SPE surtout lorsque la matrice est l'urine. Cette méthode est bien adaptée à la purification et à la concentration de métabolites dans les fluides biologiques, elle est largement utilisée dans les laboratoires. Des méthodes de SPE ont été déjà développées pour la purification d'adduits à l'ADN présents dans les urines [123, 164]. Dans ces deux cas, ce sont des cartouches de type phase inverse qui sont utilisées, C18 ou polymérique avec un greffage C8. En ce qui concerne les métabolites issus de la voie des β -lyases (SBMTE, MSMTESE, SBMSE), et d'un dérivé du glutathion, SBSNAE, ils sont dans la grande majorité des études quantifiés dans les urines. Cependant, Rodin *et al.* ont développé une méthode de préparation des échantillons des plasmas pour la quantification de SBSNAE [110]. Leur préparation consiste en une étape de précipitation des protéines par ajout d'une solution acide. Le surnageant est directement purifié par SPE (cartouche C18). Li *et al.* ont développé eux aussi une méthode pour analyser divers biomarqueurs de l'ypérite dans le plasma dont SBSNAE. La préparation consiste en une étape de précipitation des protéines, cette fois-ci, avec un solvant organique. Il n'y pas d'étape de SPE mais une étape d'évaporation de l'échantillon. Après reconstitution de l'échantillon, il est directement injecté dans le système UHPLC-MS/MS. Mon travail présente donc pour la première fois, dans le cas d'une intoxication à l'ypérite, une élimination des protéines du plasma par ultrafiltration ce qui évite une étape d'évaporation, souvent chronophage, soit après la SPE soit après précipitation des protéines par ajout de solvants organiques. Il faut noter que les filtres nanosep® sont généralement utilisés pour concentrer et purifier des oligonucléotides, de l'ADN, de l'ARN et des protéines pour leurs analyses ultérieures pour l'étude de médicaments [196]. A ma connaissance, une préparation d'échantillon basée sur une SPE en ligne n'avait non plus encore été développée dans ce contexte-là.

Dans le cas de quantification de métabolites de la voie de l'acide mercapturique spécifique à d'autres toxiques, diverses méthodes analytiques ont été mises au point. A nouveau, la matrice utilisée est généralement l'urine. Cependant, une méthode a été faite pour le sérum de rat [197]. La préparation des échantillons consiste, à nouveau, à une étape de précipitation des

protéines par ajout de solvant organique (du méthanol) suivi d'une étape d'évaporation avant reconstitution et injection de l'échantillon dans le système LC-MS/MS. En revanche, pour l'analyse de conjugués à la NAC dans les urines, des méthodes utilisant la SPE en ligne ont déjà été développées [198, 199]. La SPE en ligne permet de gagner du temps par rapport à la SPE « classique » puisqu'après la purification de l'échantillon, ce dernier est directement transféré dans la colonne analytique de l'HPLC *i.e.* les étapes d'évaporation et de reconstitution de l'échantillon sont supprimées. Panuwet *et al.* [198] diluent l'urine avant d'en injecter 500 μ L, un tel volume d'injection étant intéressant pour l'analyse de traces. Il n'y a pas de problème d'étalement du pic, rencontré avec les grands volumes d'injection, car les analytes sont concentrés sur la colonne SPE en ligne. De plus, le transfert sur la colonne analytique se fait en mode « back flush » ce qui limite la dispersion longitudinale. Nous n'avons pas utilisé un tel volume d'injection car nos volumes d'échantillons étaient trop faibles mais cela reste une piste d'amélioration si les échantillons le permettent. Les temps de dépôt et de lavage de l'échantillon sont courts, 3 min pour Panuwet *et al.* et 1,5 min pour Chiang *et al.* [199]. Panuwet *et al.* utilisent une colonne SPE avec une phase polymérique contenant des groupes aromatiques. Leur phase mobile de dépôt est de l'eau avec 0,2% d'acide formique à 1 ml/min et pour mieux purifier l'échantillon ils utilisent une phase avec 10% de méthanol et 90% d'eau (0,2% d'acide formique). Chiang *et al.* utilisent seulement de l'eau pour le dépôt et le lavage sur une colonne C18, la durée des analyses est de 11 min.

Que ce soit dans le domaine de l'ypérite ou des conjugués de la voie de l'acide mercapurique, aucune méthode, pour le plasma, ne combine l'ultrafiltration avec la SPE en ligne. Une phase mobile d'élution en SPE en ligne avec un pH acide favorise la rétention entre les biomarqueurs et la phase PFP par les liaisons hydrogènes. Initialement les phases mobiles acidifiées ont été utilisées puis abandonnées pour éviter la précipitation de protéines dans les colonnes. L'élimination des protéines en amont de l'injection permettrait donc d'utiliser ces phases mobiles favorisant une meilleure rétention des biomarqueurs et donc limiter les pertes et purifier plus efficacement les échantillons. L'efficacité de l'ultrafiltration permet donc d'avoir plus de possibilités dans le choix des paramètres de la SPE en ligne comme la nature des phases mobiles.

1.2. Le couplage UHPLC-MS/MS

Zubel *et al.* ont observé que l'ion fils majoritaire après fragmentation de N7Gua-Yp est le fragment m/z 105 et aussi le fragment m/z 87. Ces coupures se font *via* le mécanisme des coupures en alpha à cause la présence d'atomes électronégatifs (l'azote et l'oxygène). Après la fragmentation de N7Gua-CEES, le fragment majoritaire est m/z 89 [163]. Ces ions fils ont été aussi les ions majoritaires lors de ces travaux de thèse. Nous ne pouvons pas comparer directement avec d'autres travaux la fragmentation des conjugués de la voie de l'acide mercapturique spécifique au CEES ou à l'ypérite puisque c'est la première fois qu'ils sont quantifiés. Cependant, les coupures observées dans nos travaux suivent le mécanisme des coupures en alpha des nombreux atomes électronégatifs (notamment le soufre de la cystéine et de l'ypérite) des biomarqueurs étudiés.

Sasabe *et al.* ont aussi développé une méthode analytique afin d'analyser des métabolites d'un médicament, le méthazolamine. Parmi les métabolites ciblés il y avait le conjugué au glutathion, le conjugué à la cystéine et son conjugué à l'acide mercapturique. En utilisant une colonne C18, l'ordre d'élution est : le conjugué à la cystéine puis le conjugué au glutathion et enfin le conjugué à la NAC [200]. Lors de nos expériences, nous avons observé le même ordre d'élution en utilisant le même type de colonne.

Li *et al.* ont obtenu une LOQ de 2 nM (volume d'injection de 2 μ L) pour SBSNAE, un dérivé du glutathion, dans le plasma c'est-à-dire dans le même ordre de grandeur que les nôtres dans le plasma (environ entre 2 et 10 nM) [160]. La méthode développée par Zhang *et al.* [197] permet d'avoir des LOD dans le sérum de rat pour des conjugués issus de la voie de l'acide mercapturique entre 0,02 nM et 0,5 nM. Ces valeurs sont plus basses que les LOD des biomarqueurs de l'ypérite dans le plasma qui sont de l'ordre de quelques nM. La méthode de détermination des LOD n'est pas la même puisque Zhang *et al.* ont calculé la LOD avec le signal sur bruit égal à trois. La méthode utilisée dans ces travaux donne des valeurs de LOD plus élevée que la méthode de signal sur bruit. Pour améliorer la purification de l'échantillon afin de réduire le bruit de fond, il est certainement possible de perfectionner la méthode de SPE en ligne mise au point.

Dans la démarche de quantifier les différents métabolites du sulforaphane et de l'iberin de la voie de l'acide mercapturique dans la plasma, Janobi *et al.* ont mis au point une méthode dont la gamme de calibration est entre 0,025 et 15 μ M avec un volume d'injection de 10 μ L [201]. Lors de nos travaux les gammes sont de 0,01 μ M à 5 μ M pour les biomarqueurs du CEES

et de 0,01 μM à 1 μM pour les biomarqueurs de l'ypérite avec un volume d'injection de 10 μL . Nous avons une limite inférieure semblable, par contre, il ne nous a pas paru pertinent d'avoir une gamme avec des concentrations aussi élevées au vue des traces d'analytes que nous détectons dans les échantillons réels. Une gamme restreinte assure une meilleure linéarité et permet d'économiser des standards quand ils sont précieux.

Les métabolites présents dans les urines sont des biomarqueurs pratiques. En effet, l'urine permet d'avoir des échantillons avec un volume important et sa collecte est non invasive. C'est une matrice relativement propre car elle ne contient pas de protéines. Il y a une différence non négligeable entre les limites de détection dans le plasma et les urines pour un même biomarqueur. Rodin *et al.* ont développé en parallèle une méthode pour quantifier SBSNAE dans l'urine et dans le plasma en utilisant dans les deux cas la SPE. La LOD de SBSNAE dans le plasma est 600 fois supérieure à celle dans les urines [110]. Lors du développement d'une méthode pour les urines et une pour le plasma pour les mêmes métabolites, nous pouvons constater que la gamme de calibration utilisable est plus large pour les urines que le plasma avec une limite inférieure plus basse [201].

Ce bilan rapide montre que, que ce soit dans le domaine NRBCE ou pour d'autres toxiques chimiques, les méthodes ciblant les biomarqueurs de la voie des acides mercapturiques sont principalement développées pour l'urine. Les quelques méthodes liées au plasma, ont des propriétés équivalentes aux nôtres en terme de LOD/LOQ, séparation, gamme de travail, fragmentation de l'adduit N7Gua-Yp.

2. Formation *in vitro* des conjugués de la voie de l'acide mercapturique dans la peau

La contamination cutanée étant une voie d'exposition très importante dans le cas de l'ypérite, nos premières études biologiques ont été réalisées sur des modèles cutanés. La peau correspond à 2 à 4 kg du poids total d'un corps humain avec une surface comprise en moyenne entre 1 et 2 m^2 [202]. Un des principaux rôles de la peau est d'être une barrière robuste contre les xénobiotiques. Les explants de peau, ont une activité enzymatique dans les couches de l'épiderme et du derme [203]. Plus précisément, les explants de peau humaine ont un potentiel significatif de métabolisation de phase II comme la conjugaison au glutathion [184]. Par ailleurs, Chilcott *et al.* ont déterminé des taux de pénétrations élevés de l'ypérite dans la peau

de la poitrine. Pour des explants de peau avec toute leur épaisseur, le taux est environ de 71 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ à 30°C [204]. Ainsi, la combinaison de la rapide pénétration de l'ypérite dans la peau et l'activation des voies de métabolisation justifie notre étude de la formation des conjugués aux vésicants.

2.1. Le conjugué au glutathion

Inturi *et al.* ont fait incuber pendant 1h 0,5 mM de CEES avec 10 mM de GSH. Après une analyse LC-MS, ils ont bien détecté le pic correspondant au conjugué GSH-CEES (ion de m/z 396) [96]. Cela montre bien que l'ypérite peut se conjuguer spontanément au glutathion en milieu aqueux sans la présence d'une enzyme. Il est alors possible de produire ce conjugué chimiquement en plus de ceux formés par l'action enzymatique de la GST. L'activité de l'enzyme GST a été caractérisée chez les kératinocytes humains [205] mais aussi des explants de peau humaine [206, 207]. Cette dernière étude a évalué l'activité de GST dans le cytoplasme des explants non traités à environ $20 \pm 6,8$ nmol/min/mg de protéine, en utilisant un substrat universel. Cette réaction est la première étape de la voie de l'acide mercapturique [208].

La grande majorité des études de cette conjugaison et de la voie de métabolisation de l'acide mercapturique sont réalisés avec des cellules du foie et très peu avec celles de la peau. Nous avons donc élargi notre étude bibliographique avec des expériences biologiques *in vitro* utilisant des cellules d'autres organes.

Dans cette étude de thèse, dans les milieux de culture des cellules HaCaT, le conjugué du GSH a été détecté de façon dose-dépendante. Plus la dose de CEES augmente plus la quantité de GSH-CEES est importante. Il a été aussi détecté dans le milieu de culture des explants de peau humaine traités au CEES. Par ailleurs, les fibroblastes, présents dans le derme, sont aussi capables de produire les conjugués au glutathion comme le montre la formation de conjugué à la quercétine mesurée dans le milieu de culture [209]. A tous les temps d'incubation, la quantité de GSH-CEES semble saturée quand la dose de CEES augmente. Ce phénomène peut expliquer la limite de la quantité de GSH libre dans les cellules soit par la saturation de l'activité enzymatique de la GST.

Des cellules endothéliales ont été incubées 12h avec de la quercétine. Après analyse du milieu de culture le conjugué quercétine-glutathion a été détecté. Par contre, ce conjugué n'a

pas été détecté dans l'extrait de cellule *i.e.* le cytoplasme. Cela permet de conclure que la réaction de conjugaison est rapide et que le conjugué est rapidement excrété dans le milieu extra-cellulaire [210]. Ceci rejoint nos observations que, lors des traitements de cellules HaCaT, GSH-CEES a été détecté au temps le plus court d'incubation *i.e.* 1h, avant de voir sa concentration diminuer rapidement. Sa concentration est très faible par rapport à Cys-CEES quel que soit la dose de CEES lors du traitement.

Ces observations montrent que les conjugués du glutathion ne sont pas des biomarqueurs persistants. Falletti *et al.* ont aussi observé cette dégradation en quantifiant le conjugué au glutathion de HNE (4-hydroxy-2-nonenal) dans le milieu de culture de cellules THP-1 (lignée de cellules non adhérentes) [211]. La concentration maximale de conjugué au glutathion a été détectée après 2h, ensuite sa concentration diminue fortement, le conjugué n'étant plus détecté après un temps d'incubation de 24h. Des expérimentations supplémentaires ont permis de conclure que la présence, non seulement des cellules mais aussi du sérum de veau fœtal du milieu, riche en activités enzymatiques diverses, sont responsables de cette dégradation. Une autre étude a montré qu'un échange de thiol entre le conjugué au glutathion à la quercétine et une autre molécule contenant une fonction thiol comme le 2-mercaptoéthanol, ajoutée en excès, conduisent à la formation du conjugué au mercaptoéthanol [212]. La même observation a été faite avec d'autres composés contenant une fonction thiol [213]. Ces échanges sont réversibles en fonction de la biomolécule en excès. Il n'est donc pas impossible que le conjugué GSH-CEES se dégrade pendant le temps d'incubation dans le milieu de culture en réagissant avec des molécules du milieu de culture contenant une fonction thiol comme la cystéine. Les résultats de ces études peuvent donc expliquer la baisse de la concentration en GSH-CEES pendant l'incubation et la disproportion entre les quantités de GSH-CEES et Cys-CEES.

Au niveau de la persistance, pour des doses d'exposition comprises entre 0,08 μmol et 0,4 μmol , nous avons détecté GSH-CEES jusqu'à 24h pour 0,16 μmol et 0,4 μmol mais avec des valeurs proches de la LOD. Manevski *et al.* ont remarqué que le taux de conjugaison au glutathion augmente pendant la première heure d'incubation puis diminue. En effet, le CEES pénètre rapidement dans les cellules et réagit avec la fonction thiol du glutathion [214]. Les conjugués au glutathion se trouvent majoritairement dans les explants par rapport aux milieux de culture d'incubation jusqu'à 1h d'incubation. En revanche, au-delà de ce temps, les métabolites sont surtout dans le milieu de culture. Sachant que les métabolites formés sont plus hydrophiles et polaires, donc moins capables de traverser passivement les membranes cellulaires, ils sont activement excrétés par les cellules. Ces chercheurs ont également constaté

de fortes variations inter-individus pour cette première étape de la voie de l'acide mercapturique [184]. La peau est donc capable d'initier la voie de métabolisation de l'acide mercapturique.

2.2. Le conjugué à la cystéine

Dans les milieux de culture des cellules HaCaT, le conjugué de la cystéine a été détecté de façon dose-dépendante. Il a été aussi détecté dans le milieu de culture des explants de peau humaine traitées au CEES. Dans les deux expériences, plus la dose de CEES augmente plus la quantité de Cys-CEES est importante. Sa concentration augmente entre 1h et 6h d'incubation puis atteint un plateau jusqu'à 24h. Cette évolution est en adéquation avec le processus connu de métabolisation de la voie de l'acide mercapturique [188, 215]. En effet, après formation du conjugué au glutathion, GSH-CEES, des réactions enzymatiques convertissent successivement ce conjugué en CysGly-CEES puis en conjugué à la cystéine Cys-CEES. Ces étapes sont catalysées par des enzymes membranaires, la γ -glutamyltranspeptidase (GGT) et la dipeptidase ou l'aminopeptidase M. La peau est donc capable de métaboliser les xénobiotiques électrophiles jusqu'au conjugué à la cystéine. Par contre, ce conjugué ne provient sans doute pas uniquement de la métabolisation du GSH-CEES. En effet ; la concentration en Cys-CEES est bien plus importante que celle en GSH-CEES. Après 24h, cette différence est environ d'un ordre de grandeur. A priori, le conjugué Cys-CEES pourrait donc être formé *via* d'autres processus biologiques. Il est également possible le CEES réagisse directement avec la cystéine libre présente dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. Il est aussi envisageable qu'une partie des conjugués au glutathion, une fois présents dans les milieux, se convertissent en conjugué à la cystéine [213].

2.3. L'acide mercapturique

Des cellules HaCaT ont déjà servi pour étudier la métabolisation de composés exogènes, par la voie de l'acide mercapturique, tel que le méthazolamide, un médicament. Les cellules ont été exposées à 1mM de ce composé. Le conjugué au glutathion et le conjugué à la cystéine ont été trouvés dans le milieu de culture alors que l'acide mercapturique correspondant n'a pas été détecté [200]. L'absence de l'acide mercapturique dans les milieux de culture lors de la

métabolisation du médicament confirme l'hypothèse que les cellules de la peau n'ont pas la capacité de transformer le conjugué à la cystéine en conjugué à la NAC. Ceci est confirmé dans nos expériences puisque, que ce soit dans les milieux de culture des cellules HaCaT ou dans ceux des explants de peau, l'acide mercapturique n'a pas été détecté. Donc l'absence de l'acide mercapturique du CEES n'est pas lié à un problème de manipulation ou analytique.

En conclusion, l'ensemble des cellules présentes dans la peau sont capables d'initier la voie de métabolisation de l'acide mercapturique en conjuguant l'ypérite au glutathion. Les membranes de ces cellules expriment également la GGT afin de convertir le conjugué au glutathion en conjugué à la cystéine.

3. Formation *in vivo* des conjugués de la voie de l'acide mercapturique chez la souris

Comparée au foie, la peau contribue marginalement à l'activité enzymatique totale systémique d'élimination de xénobiotique chez les humains [216]. C'est pour cela qu'il est indispensable d'étudier *in vivo* cette voie de métabolisation pour juger de la pertinence biologique des biomarqueurs choisis.

3.1. La présence des conjugués dans le plasma

Il est déjà connu que l'ypérite et ses analogues se diffusent dans le système sanguin. Des rats ont été exposés à de l'ypérite par voie cutanée afin de suivre l'accumulation d'ypérite libre dans le système sanguin [102]. Deux minutes après l'exposition, de l'ypérite libre a été détectée. L'ypérite traverse donc très rapidement la barrière qu'est la peau. La concentration maximale d'ypérite dans le sang se situe entre 30 min et 60 min après l'exposition. Elle reste détectable jusqu'à 8h pour la plus forte dose d'ypérite (10 mg/kg). Une autre preuve de la rapide diffusion de l'ypérite est la détection des adduits aux protéines du sang [130–132, 158] et de produits de dégradation [157, 160, 217]. Les protéines plasmatiques n'étant synthétisé que dans le foie, leur dérivés alkylés par l'ypérite ne peuvent donc pas provenir de la peau exposée, ni même d'autres localisations de l'organisme.

Nous avons observé que dans le plasma de souris non exposées, GSH-CEES, NAC-CEES et N7Gua-CEES sont spécifiques au CEES. Il y a la présence d'un peu d'interférents pour Cys-CEES. Au premier temps de prélèvement, jour 1, tous ont été détectés. Ce temps correspond pour l'ensemble à la concentration maximale observée dans le plasma. Les cellules de la peau comme celles d'autres organes excrètent le conjugué au glutathion, ce dernier est converti en conjugué à la cystéine au niveau des membranes. Ces conjugués peuvent ainsi être générés partout dans l'organisme et être ensuite retrouvés dans le système sanguin. Une autre source de ces conjugués peut impliquer une réaction de l'ypérite ou du CEES directement dans le plasma avec de petites biomolécules telles que le glutathion et la cystéine. Cette dernière a une concentration comprise entre 8 et 10 μM dans le sang [218] alors que le glutathion y a une concentration de 2,8 μM . Nous avons par ailleurs observé que non seulement le conjugué au glutathion et à la cystéine étaient présents dans le plasma mais aussi le conjugué à la NAC, ce qui n'avait pas été le cas lors des expériences *in vitro*.

La concentration maximale que nous avons déterminée pour les biomarqueurs du CEES a été obtenue au jour 1. Lors d'une autre étude, des souris ont été intoxiquées par du 1-bromopentane. Dans le foie, le taux maximum du conjugué au glutathion a été observé dès 6h après l'intoxication suivi d'une rapide diminution de la quantité de ce conjugué [219]. Janobi *et al.* ont suivi la présence dans le plasma et les urines de conjugués issus de la voie de l'acide mercapturique de certains composés après ingestion chez l'homme [201]. Les concentrations maximales des conjugués se situent environ 4h suivant l'exposition. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les observations que l'ypérite ou le CEES diffusent efficacement après une exposition cutanée [20]. Les cinétiques que nous observons dans le plasma montrent que la production de conjugués et leur excrétion dans le sang sont elles aussi rapides.

Lors des expériences de Janobi *et al.* [201], l'ordre décroissant des concentrations des conjugués dans le plasma au point maximal pour un des composés est : le conjugué à la cystéine > le conjugué à la cystéine-glycine > le conjugué au glutathion > le conjugué à la NAC. Pour l'autre composé étudié, toujours dans le plasma, l'ordre est légèrement différent : le conjugué à la cystéine \geq le conjugué à la cystéine-glycine > le conjugué à la NAC (le conjugué au glutathion n'a pas été détecté). Dans les urines l'ordre est : conjugué à la NAC >> conjugué à la cystéine. Le conjugué le plus présent dans le plasma lors de nos expériences est Cys-CEES suivi de NAC-CEES puis GSH-CEES. Les conjugués Cys-CEES et NAC-CEES ont été détectés jusqu'à 14 jours. Au vue des différentes études, nous pouvons tirer quelques conclusions sur la présence de ces conjugués dans le plasma :

- Les concentrations maximales dans le plasma de ces métabolites sont atteintes dans les heures qui suivent l'intoxication.
- Le conjugué au GSH est présent en faible quantité voire non détecté dans le plasma.
- Le conjugué à la cystéine est le conjugué le plus présent dans le plasma.
- Le conjugué à la NAC est présent dans le plasma avec des concentrations presque équivalentes au conjugué à la cystéine et il est persistant.

Très récemment, des analyses non ciblées de biomarqueurs dans le sang du paracétamol ont été réalisées [220]. David *et al.* ont détecté le conjugué à la cystéine et à la NAC. Dans le sang, dans les 48h suivant la prise du médicament, les conjugués de la voie de l'acide mercapturique représente moins de 12% de l'ensemble des métabolites détectés. Dans les urines, leur quantité correspond environ à 5-15%.

Avec des composés autres que le CEES et l'ypérite, les différents conjugués (au glutathion, à la cystéine et à la NAC) ont été montrés comme instables dans le plasma à 37°C [201]. C'est un paramètre essentiel que nous avons étudié pour les milieux de culture et qui est à prendre en compte surtout au moment de la conservation des échantillons mais aussi lors de la préparation des échantillons.

3.2. La présence des conjugués dans le cerveau

Les effets directement observés à la suite d'une exposition à l'ypérite sont souvent au niveau des yeux, de la peau et des poumons. Cependant, ce toxique induit aussi des perturbations psychologiques et neurologiques [76]. Une étude sur le comportement de souris à la suite d'une exposition cutanée au CEES pur a été faite par Gros-Désormeaux *et al.* Cinq jours après l'exposition des troubles cognitifs et émotionnels ont été observés comme l'augmentation de l'anxiété, altération de la mémoire de travail [190]. Il y a deux hypothèses non exhaustives pour expliquer ces effets. La première est qu'elles sont une réponse au stress induit par la contamination, la seconde est qu'ils viennent de la diffusion de l'ypérite ou du CEES de la peau jusqu'au cerveau. Un argument en faveur de cette deuxième hypothèse est que le cerveau est un des organes avec les plus grandes concentrations d'ypérite, comme cela a pu être montré dans une étude *post mortem* chez des soldats iraniens [100]. L'ypérite libre

s'accumule de façon significative dans les tissus adipeux tels que le gras périrénal, le gras de l'épididyme, le gras sous-cutané et la graisse brune. La concentration de l'ypérite dans ces tissus est au moins 15 fois supérieures à celles dans les tissus non adipeux [102]. Ces données pourraient expliquer l'accumulation d'ypérite dans le cerveau qui possède un contenu lipidique important.

Nous avons pu montrer, suite à des extractions de métabolites, la présence des conjugués GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES dans le cerveau. Cette observation rejoint celle faite après une exposition à des vésicants, d'une augmentation de l'activité de GST dans le cerveau de souris et d'une diminution de la quantité de glutathion libre (-23% les 24h suivant l'exposition) [221]. Nous observons cependant que le premier conjugué de la voie de métabolisation, GSH-CEES, est le moins présent au jour 1 après l'exposition. Au contraire, le conjugué à la cystéine est le conjugué le plus concentré et le plus persistant. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'enzyme GGT (γ -glutamyltransférase), qui permet la conversion au conjugué à la cystéine, est exprimée dans les capillaires de l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique. NAC-CEES a été aussi détecté, sa quantité représente 75% de celle de Cys-CEES. Une quantité si importante peut sembler surprenante puisque l'enzyme responsable de la conversion de Cys-CEES en NAC-CEES se situe majoritairement dans le foie et les reins [187, 189].

Miller *et al.* avait toutefois déjà observé la formation d'un conjugué à l'acide mercapturique pour l' α -méthyl-dopamine dans toutes les régions du cerveau de rats [222]. Les concentrations des dérivés mercapturiques ont été trouvées dans l'ordre suivant : l'hypothalamus > mésencéphale / diencéphale / télencéphale > pont / moelle allongée > hippocampe > cortex > striatum. La présence et l'activité de l'enzyme N-acétyl transférase ont été découvertes dans le foie au début des années 1960 [223]. Le cerveau est aussi capable d'exprimer l'enzyme N- acétyltransférase [188]. L'activité de cette enzyme varie d'un facteur deux entre les différentes régions du cerveau de rat. Le maximum d'activité a été détecté dans le cervelet et le minimum dans le cortex [224]. En revanche, malgré la capacité de métabolisation de xénobiotique dans le cerveau *via* la voie de l'acide mercapturique, le cerveau est moins bien équipé pour détoxifier que le foie [225].

Une autre explication à ces quantités importantes de NAC-CEES déterminées dans notre étude *in vivo* est que le cerveau est un organe très irrigué par le sang. Il reçoit 15 à 20% du sang envoyé par le cœur. C'est un organe extrêmement vascularisé. Ainsi, une part de la

concentration de NAC-CEES détectée pourrait provenir directement du sang où ce conjugué est présent.

Nous avons aussi remarqué que l'élimination des conjugués présents dans le cerveau est plus lente que celle dans le plasma. Ce comportement peut être expliqué par une plus longue persistance du CEES dans cet organe qui contient une part non négligeable de lipides [113]. Le cerveau est composé à 12% de lipides.

4. L'adduit de la N7-guanine dans les biofluides

4.1. Formation de l'adduit

Après une exposition cutanée, le CEES ou l'ypérite, pénètrent rapidement dans la peau et dans les cellules. Le toxique alkyle de nombreuses biomolécules dont l'ADN. Différents adduits peuvent être formés mais nous nous sommes concentrés sur l'adduit à la position N7 de la guanine qui est le plus fréquent après traitement de cellules au CEES [116]. Cette prédominance du monoadduits à la guanine est aussi vérifiée lors d'une exposition à l'ypérite [59]. Des cellules HaCaT ont été déjà traitées par de l'ypérite par Wang *et al.* [113]. L'ADN a été extrait afin de quantifier ses adduits. Parmi les adduits à l'ADN observés, celui présent en plus grande proportion est bien N7Gua-Yp comme l'avait aussi observé Batal *et al* dans la peau de souris [30].

La formation des adduits à la position N7 de la guanine de l'ADN est dose-dépendante. C'est le cas lors de traitements de cellules HaCaT par du CEES où la quantité d'adduit augmente avec l'augmentation de la dose de CEES comme dans nos travaux [163]. Cela a été observé entre 1 et 10 mM de CEES dans notre cas et entre 0,01 μ M et 0,1 mM par Zubel *et al.* [163]. Le traitement a aussi eu lieu dans du PBS contenant le CEES. Cependant, le temps de traitement était de 1h à 37°C contre 30 min à température ambiante dans notre cas. Les cellules étaient aussi remises dans du milieu de culture pendant leur incubation.

La formation de ces adduits par le CEES est rapide puisqu'ils ont été détectés dès 5 min dans le cas de cellules HaCaT traitées par le CEES d'après les travaux de Zubel *et al.* Dans le cas de traitement de HaCaT avec de l'ypérite, la concentration maximale de N7Gua-Yp a été

aussi observée après 5 min d'incubation donc très rapidement après l'exposition. Ce temps correspond aussi à la valeur maximale détectée de 225 ± 6 adduits par million de nucléosides. Après exposition des explants de peau, les adduits ont été détectés au premier temps de collecte c'est-à-dire 1h après l'exposition. Le maximum se situe entre 1h et 6h donc aussi très rapidement après l'exposition. Ils ont été détectés jusqu'à 24h. Dans les cellules HaCaT, les adduits ont été montrés persistant au moins jusqu'à 6 jours. Le temps de demi-vie de N7Gua-CEES est de 21,7 h. *In vitro*, nous n'avons pas étudié la persistance des métabolites au-delà de 24h. Plus récemment, Batal *et al.* [30] a déterminé la cinétique de formation des adduits à l'ypérite dans la peau de souris exposées de façon topique à l'ypérite. Le maximum des adduits était 6h après le début du traitement. Le monoadduit N7Gua-Yp a été détecté jusqu'à 21 jours après l'exposition dans l'ADN. La peau située à la périphérie de la zone d'exposition (à 2 cm), a été aussi analysée. Des adduits y ont aussi été détectés ce qui montre la diffusion de l'ypérite dans la peau et la formation d'adduit hors de la zone traitée.

L'ypérite ou le CEES forment bien de nombreux adduits à l'ADN des cellules de la peau, souvent le premier tissu en contact avec le toxique. Cependant, des adduits de l'ADN sont aussi formés dans l'ensemble de l'organisme. En effet, nous avons détectés dans le cerveau des souris des quantités importantes de N7Gua-CEES dans l'ADN, ce qui est en parfait accord avec des études précédentes [121, 226]. Le cerveau est une des principales cibles de l'ypérite, d'importantes quantités d'adduit à l'ADN ayant été détectées [226]. La formation d'adduit de l'ADN dans le cerveau est une observation qui peut expliquer en partie les effets neurologiques de l'ypérite. En effet, des quantités importantes de dommages à l'ADN est une des mécanismes proposés conduisant à la mort de la cellule [56, 71].

Que ce soit une exposition au CEES ou à l'ypérite, des adduits sont très rapidement formés, de l'ordre de quelques minutes. L'ypérite, et le CEES par analogie, à cause de leurs caractères lipophiles pénètrent rapidement dans la peau et s'accumulent dans les tissus adipeux [20]. L'adduit à la guanine atteint son maximum rapidement après l'exposition. Il y a peu de différences entre les concentrations de l'adduit parmi les différences lignées cellulaires de différents organes, ce qui s'explique par l'absence de diffusion et de barrière dans ce type de modèle. Au contraire, *in vivo*, des différences bien plus importantes de concentrations ont été observées entre les différents organes. Le niveau de dommages à l'ADN dans différents tissus résulte fortement de la distribution de l'ypérite par le système sanguin au sein de

l'organisme. Ainsi, les tissus les plus vascularisés sont exposés à de plus grandes proportions d'ypérite transporté par le système sanguin [113]. Dans cette même étude, différents organes ont été analysés pour quantifier des adduits à l'ADN au cours de temps. Le poumon est l'organe avec la plus longue persistance en adduit, ce qui corrèle bien avec les résultats de Batal *et al.* [226].

4.2. Excrétion de l'adduit

La quantification des adduits à l'ADN par extraction de l'ADN est une méthode invasive. Il n'est donc pas possible d'imaginer une méthode de routine basée sur cette approche. A l'inverse, la quantification d'adduits excrétés des cellules dans les fluides biologiques est plus pertinente. Ainsi les milieux de culture des cellules ont été analysés et ont révélés la présence de l'adduit N7Gua-CEES. Sa présence dans les milieux peut être expliquée par son instabilité chimique. Il se dépurine spontanément ce qui libère l'adduit N7Gua-CEES [44]. Il peut se passer la même chose avec l'ARN alkylé par le CEES [116] et avec la dGTP du *pool* de nucléotide. De même, les mécanismes de réparation de l'ADN tels que NER et BER peuvent contribuer à la libération de N7Gua-CEES hors de l'ADN et des cellules [93].

Il est possible de retrouver cet adduit libre dans les organes. En effet après extraction de métabolites du cerveau, l'adduit N7Gua-CEES a été détecté. Dans le plasma de souris traitées au CEES, l'adduit est spécifique et détectable 24h après l'exposition. La concentration de N7Gua-CEES diminue fortement après son maximum au jour 1. Après 14 jours, l'adduit est toujours détectable avec une concentration supérieure à la LOD correspondant à 1% de la concentration du jour 1. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Zhang *et al.* [131] où des lapins ont été intoxiqués par de l'ypérite par voie cutanée (entre 2 et 15 mg/kg d'ypérite). Dans ce cas, les urines ont été analysées entre 8h et 29 jours après l'exposition. L'élimination de N7Gua-Yp augmente entre 8h et 48h, le maximum de la concentration de cet adduit se situe entre le jour 2 et le jour 4. Après la quantité de N7Gua-Yp diminue rapidement dans les urines. Des concentrations de N7Gua-Yp très proches de la LOD ont été détectée après 29 jours pour les doses les plus importantes d'ypérite.

L'adduit N7Gua-Yp a déjà été détecté dans les urines de personnes exposées à l'ypérite par accident [32]. Il a été détecté du jour 3 (premier jour de prélèvement) jusqu'à 32 jours après l'exposition avec un maximum de concentration entre les jours 4 et 7 [131]. D'autres adduits à

l'ADN ont été aussi quantifiés. L'adduit à la position N7 de la guanine a été aussi dans ce cas l'adduit majoritaire.

L'ensemble de ces études montrent que l'adduit à la position N7 de la guanine est un biomarqueur persistant (au-delà de 30 jours) détectable dans le plasma et les urines.

Conclusions et Perspectives

Le travail effectué a permis de mettre en place une méthode analytique spécifique à l'ypérite, sensible, capable de quantifier des biomarqueurs d'exposition persistants, présents dans les fluides biologiques et adaptés à une analyse par couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). La principale optimisation de la préparation d'échantillon a été la mise en place de la SPE en ligne.

Pour cela, tout d'abord, nous avons développé et validé une méthode de quantification de biomarqueurs du CEES, analogue de l'ypérite, présents dans les milieux de culture. L'ensemble des étapes de la préparation d'échantillons comportant une étape de SPE permet d'avoir un recouvrement supérieur à 60%. La séparation et la détection sont réalisées par un système UHPLC-MS/MS en utilisant le mode de scan MRM. Ce couplage permet de quantifier rapidement (moins de 15 minutes) de façon spécifique les biomarqueurs.

Nous avons ensuite, dans un deuxième temps, réalisé des expériences *in vitro* concernant la peau. Une lignée cellulaire, des cellules primaires, des explants de peau ont été traités par du CEES afin de vérifier la formation et l'excrétion des biomarqueurs. Nous avons tout d'abord pu montrer que l'adduit N7Gua-CEES est formé dans l'ADN nucléaire, ce qui avait déjà été fait. Sa détection dans le milieu de culture des cellules intoxiquées, montrant son excrétion, est nouvelle. Nous pouvons par ailleurs confirmer que les biomarqueurs GSH-CEES et Cys-CEES sont formés et excrétés grâce à leur présence dans le milieu de culture. Le biomarqueur NAC-CEES n'a pas été détecté dans les milieux de culture même avec la dose de CEES la plus élevée.

Une application de ces biomarqueurs chez l'Humain nécessite une validation *in vivo*, il a été nécessaire de faire une étude animale. Ceci a été réalisé par des traitements au CEES de souris sans poil en collaboration avec l'IRBA. Dans le plasma, tous les biomarqueurs ont été détectés. Cependant après 14 jours, seul NAC-CEES est quantifiable chez l'ensemble des souris. Toutes ces expériences biologiques *in vitro* et *in vivo* réalisées avec du CEES permettent de conclure à la pertinence biologique des biomarqueurs choisis au début des travaux de cette thèse. Après exposition, l'adduit à la position N7 de la guanine est formé puis excrété par les cellules pour se retrouver dans le système sanguin jusqu'à 7 jours chez toutes les souris et 14 jours dans la moitié des cas. Le premier conjugué de la voie de l'acide mercapturique GSH-

CEES est rapidement formé mais est peu persistant. Son dérivé, le conjugué Cys-CEES, est formé efficacement mais difficilement quantifiable au-delà du 7^{ème} jour à cause de la présence d'interférents chez la souris. L'acide mercapturique, NAC-CEES, dans un organisme entier, est bien présent dans le sang au moins deux semaines après l'exposition.

De plus, l'adduit N7Gua-CEES libre et les métabolites de la voie de l'acide mercapturique GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES ont été détectés dans les extraits de cerveau. Leur présence montre bien que le CEES a la capacité de traverser la peau et de se diffuser dans l'organisme *via* la circulation sanguine pour atteindre des organes internes. C'est d'ailleurs ce que suggère la présence des biomarqueurs dans le plasma. Une autre explication non exclusive pourrait être que le cerveau est fortement irrigué par le sang, ce qui pourrait expliquer la forte concentration de biomarqueurs qui y est retrouvée. De plus, récemment, une étude métabolomique confirme l'effet systémique de l'ypérite, leurs résultats sont présentés dans la publication (Annexe 2).

Grâce à ces premiers travaux préliminaires utilisant le CEES, le développement d'une méthode de quantification de biomarqueurs spécifiques à l'ypérite a été facilité. L'ensemble des outils d'analyse ont été mis en place pour l'analyse dans du plasma des biomarqueurs de l'ypérite choisis : Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp. Afin de pouvoir synthétiser les standards de l'ypérite, le CESE a été utilisé. Tout comme le CEES, il peut être considéré comme un analogue de l'ypérite. Le CESE, de par ses propriétés physico-chimiques, sa toxicité, et sa capacité à former des mono-adduits et des mono-conjugués exactement identiques à ceux de l'ypérite, est un analogue pertinent. Nous avons développé une méthode de SPE en ligne ce qui permet de réduire considérablement le temps de préparation des échantillons. Cette méthode validée peut donc être utilisée pour l'analyse de plasma dans le cadre d'une exposition à l'ypérite animale et humaine.

Parmi les quatre biomarqueurs étudiés, les deux plus pertinents, biologiquement et analytiquement, sont N7Gua-Yp et NAC-Yp. Lors des prochains développements analytiques, en ne gardant comme biomarqueur que N7Gua-Yp et NAC-Yp, il devrait être possible de réduire le temps d'analyse et d'améliorer le lavage de l'échantillon pendant la SPE en ligne. Le développement des méthodes pendant ces travaux a été limité par la faible rétention de

Cys-Yp. Au niveau analytique, il pourrait être aussi intéressant d'adapter la préparation d'échantillon à un prélèvement de type DBS (Dry Blood Spot). L'idée est de collecter du sang sur une carte de papier et d'analyser par la suite les taches de sang séché (DBS) à des fins de diagnostics. Les avantages de ce type de prélèvement, facilement utilisable dans un contexte NRBC(E), sont : moins de volume sanguin nécessaire ; la collecte de sang est simple, peu invasif et peu coûteux ; le risque de contamination bactérienne ou une hémolyse est minime ; et les échantillons peuvent être conservés pendant de longues périodes avec presque aucune détérioration des analytes. Cette technique a déjà fait l'objet d'une étude dans le cadre NRBC(E), pour les intoxications aux agents organophosphorés [227, 228]. Des premiers essais ont été aussi faits par Zubel *et al.* pour la détection d'adduits à l'ADN de l'ypérite [163].

Il serait également important de compléter les études *in vivo*. Pour cela, des traitements de souris pourraient être fait avec de l'ypérite ou du CESE, pour confirmer les résultats obtenus avec le CEES et avoir des prélèvements de fluides biologiques au-delà de 14 jours.

Ces travaux se sont concentrés sur le plasma, matrice peu invasive. Il serait judicieux de développer un méthode analytique adaptée aux urines afin d'y quantifier N7Gua-Yp et NAC-Yp. Sachant que les métabolites sont éliminés par les urines [153], il serait intéressant de comparer leur concentration et leur persistance dans les urines et dans le sang.

Conditions expérimentales

1. Culture cellulaire

1.1. HaCaT

Les cellules HaCaT sont des kératinocytes humains immortalisés mutés p53.

1.1.1. Produits et matériel

Le milieu de culture DMEM-GlutaMAX™, le sérum de veau foetal (SVF), la trypsine (0,5 g/L) /EDTA (0,2 g/L; acide éthylènediaminetétraacétique), la pénicilline-streptomycine (pénicilline à 5 000 U/ml et streptomycine à 5 000 µg/mL), le PBS sans calcium et sans magnésium, ont été fournis par Gibco de ThermoFisher Scientific (Courtaboeuf, France). Le MTT a été obtenu chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le DMSO vient de Fisher bioreagents (Illkirch, France).

Les cellules ont été cultivées dans des flasques (75 cm²) et des boîtes de Pétri fournies par Falcon® de Corning, de même que les tubes utilisés pour la récolte des cellules et les cryotubes pour leur congélation.

Le comptage a été effectué à l'aide du compteur automatique Countess™ de chez Invitrogen. Un volume de 10 µL de cellules en suspension est mélangé à 10 µL d'une solution de bleu de trypan. Le principe du comptage des cellules repose sur la capacité des cellules vivantes à ne pas internaliser le bleu de trypan (colorant d'exclusion) contrairement aux cellules mortes.

1.1.2. Culture des HaCaT

Ces cellules sont cultivées dans un milieu DMEM-GlutaMAX™ supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau foetal, et 1% (v/v) d'un mélange d'antibiotiques (50 U/mL de pénicilline et 50 mg/mL of streptomycine) afin de limiter la contamination par des micro-organismes.

L'amplification des cellules se fait dans des flasques de 75 cm² (volume final 10 ml) placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de dioxyde de carbone (CO₂). Les HaCaT sont des cellules adhérentes qui poussent donc fixées à un support (formation d'un tapis cellulaire sur la paroi de la flasque). Les cellules ont été divisées une fois par semaine à raison d'une dilution au 1/12^{ème} pour chaque passage. Pour cela, les cellules ont été rincées avec du PBS puis trypsinées avec 3 mL de trypsine/EDTA pendant 10 min à 37°C pour obtenir des cellules en suspension. L'action de la trypsine a été interrompue par l'ajout de milieu de culture. Les cellules ont été ensuite centrifugées (5 min, 1200 x g) avec l'appareil Megafuge 1.0R (Heraeus). Elles ont été suspendues dans du milieu de culture et réparties dans de nouvelles flasques.

1.1.3. Traitements des HaCaT

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre au nombre de 14 300/cm². Les traitements ont été faits en triplicat pour chaque concentration de CEES (0 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mM). Avant chaque traitement, le milieu de culture a été enlevé, puis remplacé par 3 mL de PBS, contenant les différentes concentrations de CEES. L'exposition au CEES dure 30 min à température ambiante. Après le traitement, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS pour enlever toutes traces de CEES. Les cellules sont incubées pendant 6h à 37°C avec du milieu de culture « frais ». Pour finir, après ce temps d'incubation, le milieu est collecté et conservé à -20°C, avant d'être purifié par SPE. De leur côté, les cellules sont trypsinées. Après la désactivation de la trypsine par ajout de milieu, les cellules sont centrifugées (1500 rpm, 5 min) et le surnageant est éliminé. Finalement, le culot est suspendu dans 1 mL de PBS et mis dans des tubes Eppendorf de 2 mL. Les échantillons sont à nouveau centrifugés (400 x g, 5min) avec élimination du surnageant. Les culots sont ainsi congelés à -20°C avant extraction de leur ADN.

1.1.4. Test de cytotoxicité

Les HaCaT ont étéensemencées dans des boites de pétri de 35 mm à raison de 150 000 cellules/mL. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24h à l'issue desquelles elles ont été exposées à une gamme de 8 concentrations de CEES (de 0 à 100 mM). Pour ce faire, le milieu

de culture a été aspiré et a été remplacé par du PBS. C'est dans ce dernier que les cellules ont été exposées aux différentes concentrations de CEES pendant 30 min. A l'issue de l'exposition, le PBS a été enlevé et remplacé par 3 mL de milieu de culture. Les cellules ont alors été incubées pendant 24 h à 37°C. Ensuite, 200 µL d'une solution de MTT à 10% (5 mg/mL) ont été ajoutés à chacune des boîtes de Pétri et les cellules ont été à nouveau incubées à 37°C pendant 2h. Les cellules ont été révélées avec 2 ml de DMSO ajoutés aux boites de Pétri pour solubiliser les cristaux de formazan créés par la succinate déshydrogénase. Ensuite, 200 µL de chaque Pétri ont été transférés dans une plaque 96 puits et l'absorption à 570 nm mesurée dans un lecteur de plaque SpectraMax M2 (Molecular Devices). Le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé par rapport aux cellules contrôle non traitées au CEES.

1.2. Kératinocytes primaires humains mammaires

Les kératinocytes primaires sont issus de leur extraction d'explants de biopsies mammaires de patients sains ayant donné leur consentement (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France) d'après l'article L1245 2 du code de la santé publique. Tous les donneurs sont Caucasiens, and leur peau a un phototype II ou III selon la classification de Fitzpatrick.

1.2.1. Produits et matériel

Les milieux de culture KSFM (*keratinocytes serum free medium*) et DMEM-F12, le sérum de veau foetal (SVF), trypsine-EDTA (0,5 g/L trypsine, 0,2 g/L EDTA), la pénicilline-streptomycine (pénicilline à 5 000 U/ml et streptomycine à 5 000 µg/mL), le PBS sans calcium et sans magnésium, le BPE et l'EGF ont été fournis par Gibco de ThermoFisher Scientific. Le MTT a été obtenu chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La bétadine vient de Cooper et le DMSO de Fisher bioreagents (Illkirch, France). La primocine (50 mg/mL) vient de InvivoGen.

Les cellules ont été cultivées dans des flasques (75 cm²) fournies par Falcon® de Corning, de même que les boîtes de Pétri. Les tubes utilisés pour la récolte des cellules viennent de Falcon.

Le comptage a été effectué à l'aide du compteur automatique Countess™ de chez Invitrogen. Un volume de 10 µL de cellules en suspension est mélangé à 10 µL d'une solution de bleu de trypan.

1.2.2. Extraction des kératinocytes primaires

Les biopsies ont été transportées du bloc de chirurgie dans un tube de 50 mL et pouvaient être conservées 48h au maximum à 4°C dans du milieu DMEM-F12 supplémenté par 5% (v/v) de pénicillines-streptomycine. Les explants de peau ont été placés dans du PBS contenant 0,4% (v/v) de bétadine pendant 15 min à température ambiante. Ils ont ensuite été transvasés dans des boîtes de Pétri contenant 10 mL de PBS supplémenté par 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine. Puis ils ont été traités un par un en les plaçant dans le couvercle de la boîte de Pétri où ils ont été étalés du côté épiderme. Le tissu adipeux a alors été retiré à l'aide d'un scalpel et les échantillons de peau ont été incubés à 4°C sur la nuit dans une solution de trypsine (0,5% v/v) à laquelle a été ajoutée 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine.

Les échantillons de peau ont été incubés le lendemain à 37°C pendant 1 h et ont été ensuite transvasés dans des boîtes de Pétri contenant 10 mL de PBS supplémenté par 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine et 10% (v/v) de SVF. Ils ont de nouveau été traités isolément en les plaçant dans le couvercle de la boîte de Pétri où ils ont été étalés du côté épiderme. Les cellules mortes ont été éliminées par un grattage délicat effectué à l'aide d'un scalpel. Puis, les échantillons ont été placés dans une autre boîte de Pétri contenant 10 mL de PBS auquel a été ajouté 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine et 10% (v/v) de SVF. Là, les kératinocytes ont été isolés par un grattage énergique au scalpel jusqu'à ce que la peau soit transparente. Ils ont alors été récupérés avec le PBS, le SVF et la pénicilline-streptomycine dans un tube de 50 mL. Une première filtration des cellules a été réalisée avec une compresse stérile suivie d'une seconde filtration effectuée avec un tamis cellulaire. Les kératinocytes ont alors été centrifugés (10 min, 8000 x g) après comptage (Countess™). Les cellules ont été resuspendues dans du milieu KSFM supplémenté par 25 µg/mL de BPE et 0,9 ng/mL de EGF. Vingt mille à 40000 cellules/cm² ont été réparties dans des flasques de 175 cm² avec un volume final de milieu KSFM de 30 mL. De la primocine a été ajoutée (50 µg/mL final), c'est un agent antimicrobien spécifique aux culture primaires, actif contre les bactéries, les champignons et les mycoplasmes. Les kératinocytes ont été cultivés pendant 15 jours à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été congelées. Pour cela elles ont tout d'abord

été rincées avec 15 mL de PBS, puis ont été trypsinées avec 4 mL de trypsine/EDTA pendant 2 min à 37°C (0,5g/L trypsine, 0,2 g/L EDTA). Les cellules, qui croissent en adhérant aux flasques, ont alors été décollées et centrifugées (5 min, 800 x g) après comptage. Les kératinocytes ont été repris dans du SVF contenant 10% (v/v) de DMSO (milieu de congélation). Des cryotubes contenant 2 ou 4 millions de kératinocytes ont été congelés à -80°C avant d'être conservés dans de l'azote liquide.

1.2.3. Culture des kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires sont cultivés dans un milieu KSFM supplémenté par 25 µg/mL de BPE et 0,9 ng/mL de EGF.

L'amplification des cellules se fait dans des flasques de 75 cm² (volume final 15 ml) placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de dioxyde de carbone (CO₂). Les kératinocytes sont des cellules adhérentes qui poussent donc fixées à un support (formation d'un tapis cellulaire sur la paroi de la flasque). Après décongélation, un autre passage est effectué au bout de 8 jours où les cellules sontensemencées dans les boîtes de pétri servant aux traitements. Pour cela, les cellules ont été rincées avec du PBS puis trypsinées avec 2 mL de trypsine/EDTA pendant 8 min à 37°C pour obtenir des cellules en suspension. L'action de la trypsine a été interrompue par l'ajout de PBS contenant 10% (v/v) de SVF. Les cellules ont été ensuite centrifugées (5 min, 1200 x g) avec l'appareil Megafuge 1.0R (Heraeus). Elles ont été suspendues dans du milieu de culture et réparties dans des boîtes de Pétri.

1.2.4. Traitements des cellules primaires

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre au nombre de 18 800/cm². Les traitements ont été faits en triplicats pour chaque concentration de CEES ou de CESE (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 et 0,5 mM). Avant chaque traitement, le milieu de culture a été enlevé, puis remplacé par 3 mL de PBS, contenant les différentes concentrations de CEES ou de CESE. L'exposition dure 30 min à température ambiante. Après le traitement, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS pour enlever toutes traces de CEES ou de CESE. Les cellules sont incubées pendant 6h à 37°C avec du milieu de culture « frais ». Après ce temps d'incubation, d'un côté, le milieu est collecté et conservé à -20°C, avant d'être analysé. De

l'autre côté, les cellules sont trypsinées. Après la désactivation de la trypsine par ajout de PBS contenant 10% (v/v) de SVF, les cellules sont centrifugées (1500 rpm, 5 min) et le surnageant est éliminé. Finalement, le culot est suspendu dans 1 mL de PBS et mis dans des tubes Eppendorf de 2 mL. Les échantillons sont à nouveau centrifugés (400 x g, 5min) avec élimination du surnageant. Les culots sont ainsi congelés à -20°C avant extraction de leur ADN.

1.2.5. Test de cytotoxicité

Les kératinocytes ont été ensemencés dans des boîtes de pétri de 35 mm à raison de 120 000 cellules/mL. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24h à l'issue desquelles elles ont été exposées à une gamme de 6 concentrations de CEES ou de CESE (de 0 à 5 mM). Pour ce faire, le milieu de culture a été aspiré et a été remplacé par du PBS. C'est dans ce dernier que les cellules ont été exposées aux différentes concentrations de CEES et de CESE pendant 30 min. A l'issue de l'exposition, le PBS a été enlevé et remplacé par 3 mL de milieu de culture. Les cellules ont alors été incubées pendant 24 h à 37°C. Ensuite, 200 µL d'une solution de MTT à 10% (5 mg/mL) ont été ajoutés à chacune des boîtes de Pétri et les cellules ont été à nouveau incubées à 37°C pendant 2h. Les cellules ont été révélées avec 2 mL de DMSO ajoutés aux boîtes de Pétri pour solubiliser les cristaux de formazan créés par la succinate déshydrogénase. Ensuite, 200µl de chaque pétri ont été transférés dans une plaque 96 puits et l'absorption à 570 nm mesurée dans un lecteur de plaque SpectraMax iD3 (Molecular Devices). Le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé par rapport aux cellules contrôle non traitées au CEES ou CESE.

1.3. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN des différentes cellules cultivées a été effectuée selon un protocole qui a été optimisé au laboratoire [229]. Les membranes plasmiques ont tout d'abord été lysées en ajoutant au culot de cellules un premier tampon (tampon A : sucrose 320 mM, dichlorure de magnésium (MgCl₂) 5 mM, hydrochlorure de trishydroxyméthylaminoéthane (Tris-HCl) 10 mM, déferoxamine 0,1 mM, pH 7,5) contenant 1 % (v/v) de triton X-100. Les noyaux ont été récupérés après centrifugation (5 min, 1500 x g) avec l'appareil Megafuge 40R (Heraeus). Puis

les membranes nucléaires ont été lysées et l'ADN extrait en ajoutant un second tampon (tampon B : EDTA- Na₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, déferoxamine 0,15 mM, pH 8) contenant 0,5% (v/v) de dodécylsulfate de sodium. L'ARN a été hydrolysé en utilisant les RNAses A (0,15 mg) et T1 (3,5 U) à 37°C pendant 15 min. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 1 h à 37°C après l'ajout de 15 µL (20 mg/ml) de protéase K (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ADN a été précipité par ajout de 2 volumes de solution tamponnée d'iodure de sodium (EDTA-Na₂ 20 mM, iodure de sodium 7,6 M, Tris-HCl 40 mM, déferoxamine 0,3 mM, pH 8) et 3,3 volumes de propan-2-ol absolu. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation (5 min, 5000 x g) a ensuite lavé successivement par du propan-2-ol (40% dans l'eau, v/v) et de l'éthanol (70%, v/v), chaque lavage étant accompagné d'une centrifugation (5 min, 5000 x g). Le culot d'ADN a finalement été séché par lyophilisation avant sa digestion (p.235).

2. Peau humaine exposée au CEES

La peau humaine a été obtenue immédiatement après l'opération de chirurgie plastique mammaire de patients sains ayant donné leur consentement (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France) d'après l'article L1245 2 du code de la santé publique. Tous les donneurs sont Caucasiens, and leur peau a un phototype II ou III selon la classification de Fitzpatrick.

2.1. Produits et matériel

Le milieu de culture DMEM-F12, la pénicilline-streptomycine (pénicilline à 5 000 U/ml et streptomycine à 5 000 µg/mL), le PBS sans calcium et sans magnésium, ont été fournis par ThermoFisher Scientific. La bétadine chez Cooper.

Le trépan est fourni par Cooper. Les inserts ThinCert™ (14 mm de diamètre interne, membrane avec une porosité de 1 µm et les plaques multi-puits de 12 puits (stérile avec couvercle) viennent de Greiner Bio-One.

2.2. Préparation

Après l'intervention chirurgicale, la peau a été immédiatement transportée jusqu'au laboratoire à température ambiante dans des tubes de 50 mL. Après réception, la peau est directement désinfectée avec du PBS contenant de la Bétadine à 0,4%. La peau y est plongée pendant 15 min puis rincée deux fois dans du PBS contenant 10% d'un mélange pénicilline-streptomycine. La couche de gras est enlevée par grattage sans retirer ni le derme ni l'épiderme. Finalement, les biopsies de peau ont été faites à l'aide d'un trépan appelé communément « punch », stérile à usage unique, qui correspond à un bistouri circulaire qui permet de récupérer une carotte de peau de 12 mm de diamètre.

2.3. Traitement

Les biopsies de peau ont été placées, côté derme vers le bas, dans des inserts ThinCert™. Ces inserts sont mis dans des plaques multi-puits de 12 puits (stérile avec couvercle). Le milieu de culture (600 µL), DMEM-F12 supplémenté avec 1% pénicilline-streptomycine, a été ajouté dans les puits sous les inserts. Quatre doses de CEES (0, 2, 4, 10 mg/ml) en solution dans 5 µL de dichlorométhane ont été déposés sur la peau (face épiderme), correspondant à un dépôt de 0 ; 0,08 ; 0,16 ; 0,40 µmol de CEES respectivement. Un temps d'attente de 30 s avant de placer le couvercle de la plaque multi-puits permet l'évaporation du dichlorométhane. Ensuite, les biopsies ont été incubées à 37°C dans un incubateur (5% de CO₂). Trois temps d'incubation ont été choisis : 1 h, 6 h et 24 h. Après ces temps, le milieu des échantillons a été récupéré et directement congelé à -20°C avant la purification par SPE. Les biopsies de peau ont été aussi congelées à -20°C jusqu'à extraction de leur ADN. Ces expériences ont été faites avec deux donneurs, en effectuant des tripliquâts pour chacun.

2.4. Broyage des tissus et extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des biopsies de peaux a été effectuée en utilisant le « kit » DNEasy® Blood & Tissue de Qiagen (Courtaboeuf, France). La première étape a été un broyage mécanique à l'aide d'un TissueLyzer II (15min, 25Hz) de Qiagen (Courtaboeuf, France) après avoir ajouté 350 µL de tampon ATL et une bille d'acier (retirée après broyage) à chaque biopsie. Une première lyse des tissus a été réalisée en ajoutant la protéinase K pendant 3 h à 55°C.

Après un traitement à la RNase A (100 µg/mL), une seconde étape de lyse a été effectuée en ajoutant 400 µL de tampon AL (70°C, 10 min). Les échantillons ont alors été introduits dans des colonnes après avoir ajouté 400 µL d'éthanol absolu. Les débris cellulaires ont été éliminés par l'ajout successif des tampons AW1 et AW2, précédé à chaque fois d'une centrifugation (5 min, 6300 x g). Finalement, l'ADN a été élué des colonnes par deux ajouts successifs de 100 µL d'eau ultrapure et centrifugation (3 min, 6300 x g). La solution d'ADN a été lyophilisée puis congelé (-20°C) avant sa digestion.

3. Souris exposés au CEES

Les expérimentations effectuées sur les souris SKH-1 ont toutes été soumises et approuvées par le comité d'éthique de l'IRBA et ce en accord avec la législation française (décret 2013-118) et européenne (décret 2010/63). Les traitements ont été effectués par l'IRBA sur leur site à Brétigny-sur-Orge. N'ayant pas réalisé nous-mêmes ces expériences animales, nous détaillons seulement le type d'exposition et les analyses faites à partir des tissus reçus (cerveaux et plasmas).

3.1. Exposition vapeur

Sous une sorbonne, les souris ont été exposées à des vapeurs saturantes de CEES par un système occlusif réalisé à l'IRBA (*Figure 88*). Ce système est composé d'un bouchon à vis en propylène (8 mm de diamètre, FisherBrand®, Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) utilisé pour les vials en HPLC. Afin d'assurer son étanchéité, il dispose d'un septum UltraClean en silicone/téflon. Un disque de 8 mm de diamètre en papier filtre Whatman® (Brandel Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) a été déposé dans le fond du bouchon. Dix microlitres de CEES pur ont été déposés sur le papier filtre et le bouchon a été immédiatement placé sur les 4 zones à exposer. Avec ce système, les souris sont exposées aux vapeurs générées par le CEES liquide. Les souris ont été exposées pendant 30 min. Après 4 h, les souris ont été décontaminées par du savon et de l'eau. Les souris ont été sacrifiées après 1 jour, 3 jours, 7 jours, 14 jours. Le sang a été prélevé au niveau du cœur. Le plasma a été récupéré par centrifugation (2000 x g, 10 min, 4°C) puis congelé.

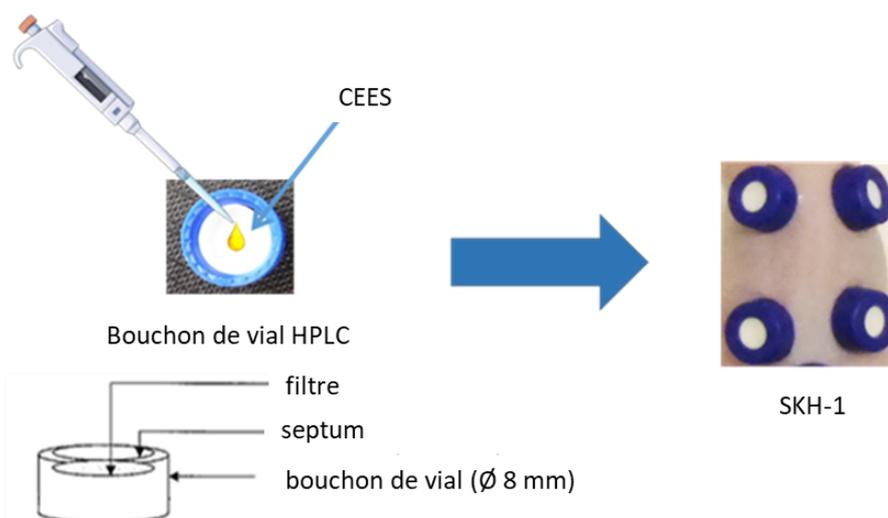


Figure 88 : Schéma de l'exposition cutanée des souris SKH-1 en utilisant un bouchon de vial HPLC.

3.2. Broyage des tissus et extraction de l'ADN

La moitié de chaque cerveau a été broyée. Le broyage a été effectué à l'aide d'un broyeur de tissus de type Potter, constitué d'un tube cylindrique en verre borosilicaté (2mL) et d'un piston en métal à embout rond en téflon (Dutscher, Brumath, France). Le piston a été fixé à un agitateur mécanique RZR 2020 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Allemagne). Chaque cerveau a été placé dans le tube en verre avec 1,5 mL de tampon A (p.230). Le broyage a été réalisé en plaçant le tube en verre contenant l'organe et le tampon autour du piston sous agitation pendant 30 s en fonction des échantillons. L'extraction d'ADN a ensuite été réalisée comme cela a été décrit précédemment (voir p.230). Le culot d'ADN a finalement été lyophilisé puis congelé (-20°C) avant sa digestion.

3.3. Les métabolites dans les organes

Un quart des cerveaux de chaque souris a été utilisé afin d'en extraire les métabolites polaires d'après le protocole de Malik *et al.* 2018.

Chaque échantillon a été pesé afin de pouvoir normaliser les résultats. La masse de ces quarts de cerveaux se trouve entre 50 et 150 mg. Les cerveaux sont placés dans des tubes Eppendorf de 2 mL puis mis dans de la glace le temps qu'ils décongèlent. A ce stade, les EI du

CEES sont ajoutés. La première étape a été un broyage mécanique à l'aide d'un TissueLyzer II (4min, 25Hz) de Qiagen (Courtaboeuf, France), dont les blocs ont été préalablement refroidis à -20°C, après avoir ajouté 300 µL d'un mélange méthanol : chloroforme (2 : 1) et une bille d'acier dans chaque tube. Après ce broyage, les tubes sont centrifugés en mode « pulse » jusqu'à 1000 x g, puis les billes en acier sont récupérées avant de replacer les échantillons dans la glace. Successivement, 100 µL d'eau froide (refroidie à 4°C) et 100 µL de méthanol (refroidi à -20°C) sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Afin de séparer les métabolites polaires et apolaires, les tubes sont centrifugés à 10 000 x g pendant 10 min à 4°C. Les échantillons sont à nouveau placés dans la glace, délicatement pour garder la ligne de séparation des phases. La phase supérieure, contenant les métabolites polaires, est collectée et placée dans un nouveau tube Eppendorf. Elle est séchée au speed vac. Les échantillons sont reconstitués avec 100 µL d'eau MilliQ. Les échantillons sont vortexés jusqu'à l'obtention d'une solution homogène puis centrifugés à 10 000 x g pendant 10 min à 20°C. Le surnageant est filtré à l'aide des filtres VWR de 0,22 µm en centrifugeant à 10 000 x g pendant 10 min à 20°C. Le filtrat est transféré dans des vials pour l'analyse.

3.4. Les fluides biologiques

Les plasmas des souris ont été décongelés. Ils ont été dopés par ajout de 10 µL (0,5 µM) de EI du CEES à 90 µL de plasma. Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide des filtres VWR de 0,22 µm (filtration à 8 000 x g pendant 5 min à 20°C). Afin d'éliminer le maximum de protéines, les filtrats sont centrifugés dans des filtres Nanosep® (Pall Laboratory) de 30 kDA pendant 30 min à 8 000 x g. La solution incolore obtenue est transvasée dans les vials pour l'analyse.

4. Digestion de l'ADN

Toutes les enzymes et les réactifs utilisés pour la digestion ont été achetés chez Sigma.

Les échantillons d'ADN extrait des cellules ou des organes, ont été digérés en ajoutant 50 µL d'un premier tampon (acide succinique 50 mM, CaCl₂ 25 mM, acétate d'ammonium 75 mM, pH 6), 1 U de nucléase P1, 5 U de désoxyribonucléase II et 0.05 U de phosphodiesterase II. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 2h à 37°C. Puis, pour chaque échantillon, 10 µL

d'un second tampon (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8), 2 U de phosphatase alcaline et 0,03 U de phosphodiesterase I sont ajoutés. Les échantillons ont alors été incubés à 37°C pendant 2h.

Pour la mesure des adduits de l'ypérite et du CEES dans l'ADN, le protocole a été poursuivi en chauffant les échantillons à 90°C pendant 20 min. Cela permet de dépuriner complètement les adduits instables en position N7 de la guanine, formés par ces deux toxiques.

5. Synthèse des standards

5.1. Standards du CEES

Dans une solution de 5 mL de tampon de phosphate (10 mM, pH=7) y a été dissout soit 10,8 mg de cystéine, soit 10,9mg de NAC, soit 10mg de dGuo soit 10,4 mg de GSH. Chaque solution a été préparée dans un tube à essai. Du CEES (5 µL, 2,9 mM) a été ajouté dans chaque tube. La réaction a duré toute la nuit à température ambiante avec une agitation magnétique. Plusieurs étapes de lavages ont été effectuées avec du dichlorométhane pour éliminer toutes traces de CEES. Il a fallu dépuriner le produit de la réaction entre le dGuo et le CEES par hydrolyse thermique (90°C pendant 20 min dans un bloc chauffant) afin d'obtenir le composé N7-Gua-CEES [179]. Les standards ont été purifiés par un système HPLC composé d'une pompe L7100 de Merck-Hitachi, une injecteur 7125 de Rheodyne (San Jose, USA), une colonne C18 phase inverse (4,0 x 250 mm, 5 µm dp, Uptisphere, Interchim, Montluçon, France), un détecteur UV-Vis de Merck (Munich, Germany) réglé à 220 nm. Pour la séparation, un gradient d'acétonitrile dans une solution aqueuse 5mM de formiate d'ammonium (0 min : 0% ACN ; 10min : 5% ACN ; 30 min : 20% ; 45 min : 30% ACN) à un débit de 1 mL/min a été utilisé. Des fractions de 2 mL ont été collectées dont 20 µL ont été analysés par UHPLC-MS/MS. Les fractions d'intérêt ont été regroupées et purifiées par HPLC une seconde fois pour obtenir une solution pure. Les solutions finales ont été lyophilisées puis suspendues avec de l'eau MilliQ. Les standards purs ont été calibrés par UHPLC couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes.

5.2. Etalons Internes du CEES

Des solutions de 10 mM de chaque biomolécule marquée ont été préparées (Cys *, NAC*, GSH* et dGuo*) dans du PBS à 1/10. La cystéine marquée contient trois ¹³C et un ¹⁵N, pour la NAC* trois ¹³C et un ¹⁵N, pour le GSH* deux ¹³C et un ¹⁵N et pour la dGuo* cinq ¹⁵N (*Figure 35*). Le CEES (20 µL) a été ajouté à l'équivalent de 5mg de biomolécule marquée, soit 4 mL de Cys*, 1.61 mL de GSH*, 1.72 mL de dGuo* et 3 mL NAC*. La réaction a été maintenue toute la nuit à température ambiante avec une agitation magnétique. Plusieurs étapes de lavages ont été effectuées avec du dichlorométhane pour éliminer toutes traces de CEES. Il a fallu dépuriner le produit de la réaction entre la dGuo* et le CEES par hydrolyse thermique (90°C pendant 20 min dans un bloc chauffant) afin d'obtenir le composé N7Gua*-CEES [116]. Les composés ont été purifiés par SPE. L'élution a été faite par ajouts de 1 mL de proportions croissantes de méthanol et 20 µL de chaque fraction a été analysées par UHPLC-MS/MS. Les fractions d'intérêt ont été regroupées. Les solutions finales ont été lyophilisées puis suspendues avec de l'eau MilliQ. Les étalons internes purifiés ont été calibrés par UHPLC-MS/MS à partir des standards du CEES calibrés.

5.3. Standards de l'ypérite

Dans une solution de 5 mL de PBS (dilué par 10) y a été dissout soit 10,7 mg de cystéine (solution finale de cystéine à 18 mM), soit 12,2 mg de NAC (solution finale de NAC à 15 mM), soit 10,6 mg de dGuo (solution finale de dGuo à 7mM). Chaque solution a été préparée dans un tube à essai. Du CESE (7 µL, 10,0 mM) a été ajouté dans les tubes de cystéine et de NAC. Dans celui de dGuo y a été ajouté 5 µL (7,1 mM) de CESE. La réaction a duré toute la nuit à température ambiante avec une agitation magnétique. Plusieurs étapes de lavages ont été effectuées avec du dichlorométhane pour éliminer toutes traces de CESE. Il a fallu dépuriner le produit de la réaction entre le dGuo et le CESE par hydrolyse thermique (90°C pendant 20 min dans un bloc chauffant) afin d'obtenir le composé N7-Gua-CESE. Les standards ont été purifiés par un système HPLC composé d'une pompe L7100 de Merck-Hitachi, une injecteur 7125 de Rheodyne (San Jose, USA), une colonne C18 phase inverse (4,0 x 250 mm, 5 µm dp, Uptisphere, Interchim, Montluçon, France), un détecteur UV-Vis de Merck (Munich, Germany) réglé à 230 nm. Pour la séparation, un gradient d'acétonitrile dans une solution aqueuse 2mM de formiate d'ammonium (0 min : 0% ACN ; 10min : 5% ACN ; 30 min : 20% ; 45 min : 30% ACN) à un débit de 1 mL/min a été utilisé. Des fractions de 2 mL ont été collectées

dont 20 µL ont été analysés par UHPLC-MS/MS. Les fractions d'intérêt ont été regroupées et purifiées par HPLC une seconde fois pour obtenir une solution pure. Les solutions finales ont été lyophilisées puis suspendues avec de l'eau MilliQ. Les standards purs ont été calibrés par UHPLC couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes.

5.4. Etalons internes de l'ypérite

Des solutions de 10 mM de chaque biomolécule marquée ont été préparées (Cys*, NAC* et dGuo*) dans du PBS à 1/10. La cystéine marquée contient trois ¹³C et un ¹⁵N, pour la NAC* trois ¹³C et un ¹⁵N et pour la dGuo* cinq ¹⁵N (*Figure 76*). Ces solutions avaient déjà été préparées lors de la synthèse des étalons internes du CEES. Le CESE pur (10 µL) a été ajouté aux solutions de Cys* (10mM), de dGuo* (10mM) et de NAC* (10mM). La réaction a été maintenue toute la nuit à température ambiante avec une agitation magnétique. Plusieurs étapes de lavages ont été effectuées avec du dichlorométhane pour éliminer toutes traces de CESE. Il a fallu dépuriner le produit de la réaction entre la dGuo* et le CESE par hydrolyse thermique (90°C pendant 20 min dans un bloc chauffant) afin d'obtenir le composé N7Gua*-Yp. Les composés ont été purifiés par SPE. L'élution a été faite par ajouts de 1 mL de proportions croissantes de méthanol et 20 µL de chaque fraction a été analysées par UHPLC-MS/MS. Les fractions d'intérêt ont été regroupées. Les solutions finales ont été lyophilisées puis suspendues avec de l'eau MilliQ. Les étalons internes purifiés ont été calibrés par UHPLC-MS/MS à partir des standards du CESE calibrés.

6. Préparation des échantillons

6.1. SPE

L'extraction sur phase solide est faite sur les colonnes Chromabond® HR-X 45 µm de 100 mg à l'aide d'un système manifold à vide. Tout d'abord, les colonnes sont conditionnées avec 1 mL de méthanol contenant 0,1% d'acide formique suivi d'1 mL d'eau acidifiée par 0,1% d'acide formique. Le milieu de culture à purifier (500 µL) est d'abord dopé par ajout de EI (10 µL, 0,2 mM) puis chargé sur la colonne. L'échantillon est lavé par 1 mL d'eau acidifiée suivi d'une solution de 5% de méthanol contenant 0,1% d'acide formique. La colonne est séchée pendant 10 min sous vide. La dernière étape, l'élution, est faite par écoulement de 1 mL de

méthanol tamponné par du formiate d'ammonium. Cette solution a été préparée en ajoutant 200 µL de formiate d'ammonium en solution aqueuse à 10 M dans 200 mL de méthanol. L'éluat est collecté dans des tube à hémolyse puis séché au Speed Vac à 35°C. Les échantillons sont reconstitués dans 200 µL d'eau et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par UHPLC-MS/MS.

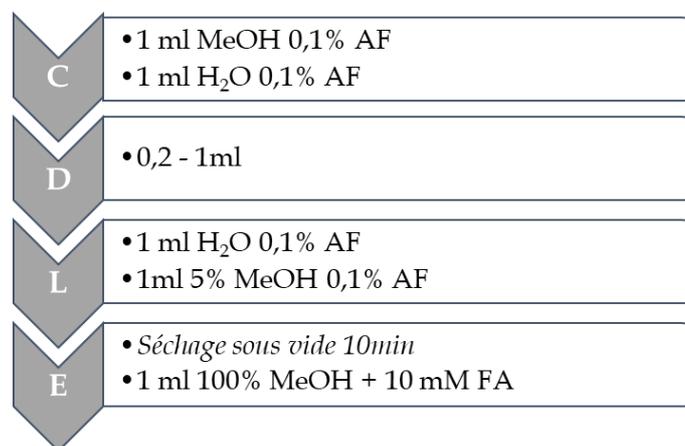


Figure 89 Protocole optimisé de l'extraction sur phase solide pour la colonne polymérique de 100mg. C : Conditionnement, D : Dépôt, L : Lavage, E : Elution, MeOH : Méthanol, AF : Acide Formique, FA : Formiate d'ammonium.

6.2. SPE en ligne

6.2.1. Les biomarqueurs du CEES dans le plasma

La SPE en ligne a été faite sur une colonne Nucleodur® PFP de petite taille et de granulométrie classique (longueur : 5 cm, diamètre interne : 2 mm, diamètre des particules : 5 µm) de Macherey-Nagel. La phase mobile A est de l'eau ultra-pure tamponnée avec du formiate d'ammonium (5 mM). La phase mobile B est du méthanol de qualité HPLC-MS (avec du formiate d'ammonium à 5 mM). Le débit est fixé à 500 µL/min. Le four de la colonne est réglé à 50°C. Les conditions initiales sont 0% de la phase mobile B. La proportion de B augmente linéairement jusqu'à 50% en 1 min. Ensuite les analytes sont transférés sur la colonne analytique.

6.2.2. Les biomarqueurs de l'ypérite dans le plasma

La SPE en ligne a été faite sur une colonne PFP de Macherey-Nagel Nucleodur® (longueur : 5 cm, diamètre interne : 2 mm, diamètre des particules : 5 µm). La phase mobile A est de l'eau ultra-pure tamponnée avec du formiate d'ammonium (5 mM). La phase mobile B est du méthanol de qualité HPLC-MS (avec du formiate d'ammonium à 5 mM). Le débit est fixé à 180 µL/min. Le four de la colonne est réglé à 50°C. Les conditions initiales sont 100% de la phase mobile A pendant 1 min. Ensuite les analytes sont transférés sur la colonne analytique.

7. Analyses UHPLC-MS/MS

7.1. La séparation par chromatographie liquide des standards du CEES

Le laboratoire dispose d'une chaîne Exion UHPLC de Sciex (Framingham, MA) équipée d'un passeur automatique d'échantillons, d'une pompe binaire et d'un four pour colonnes intégrant un système de SPE en ligne. La séparation chromatographique a été faite sur une colonne de silice greffée en phase inverse C18 de Macherey-Nagel Nucleodur® (longueur : 10 cm, diamètre interne : 2 mm, diamètre des particules : 1,8µm). La phase mobile A est de l'eau ultra-pure tamponnée avec du formiate d'ammonium (2 mM) et de l'acide formique (0,2%). La phase mobile B est d'acétonitrile de qualité HPLC-MS.

7.1.1. Quantification du biomarqueur N7Gua-CEES dans l'ADN

Les conditions initiales sont 2% de la phase mobile B pendant 5 min. La proportion de B augmente jusqu'à 8% entre 5 et 8 min suivi d'un gradient plus important pour atteindre 40% de B à 11,5 min. Ensuite, un plateau de 1 min à 95% de B est maintenu avant un retour aux conditions initiales à partir de 12,6 min. Le temps d'analyse total est de 15 min. Le débit est fixé à 350 µL/min. Le four de la colonne est réglé à 40°C alors que le passeur automatique d'échantillons conserve les vials à 15°C. La quantité de bases normales de l'ADN, détectées sous forme de nucléosides, est déterminée par le détecteur UV (λ comprises entre 230 et 330 nm). La quantification des bases d'ADN modifiées, *i.e.* d'adduits, et des nucléosides normaux a été faite par calibration externe en utilisant des standards. Les résultats sont ainsi exprimés en nombre d'adduits par million de bases normales.

7.1.2. Analyse des biomarqueurs du CEES issus du milieu de culture

Les conditions initiales sont 5% de la phase mobile B pendant 1,2 min. La proportion de B augmente linéairement jusqu'à 35% entre 1,2 et 7,2 min d'un plateau de 1 min à 70% de B avant un retour aux conditions initiales à partir de 8,4 min. Le temps d'analyse total est de 11 min. Le débit est fixé à 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le four de la colonne est réglé à 50°C alors que le passeur automatique d'échantillons conserve les vials à 15°C. La quantification a été faite par dilution isotopique en utilisant les étalons internes marqués.

7.1.3. Analyse des biomarqueurs du CEES dans le plasma de souris

Les conditions initiales sont 5% de la phase mobile B pendant 2 min. La proportion de B augmente linéairement jusqu'à 60% entre 2 et 11 min d'un plateau de 1 min à 60% de B avant un retour aux conditions initiales à partir de 12 min. Le temps d'analyse total est de 14 min. Le débit est fixé à 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le four de la colonne est réglé à 50°C alors que le passeur automatique d'échantillons conserve les vials à 15°C. La quantification a été faite par dilution isotopique en utilisant les étalons internes marqués.

7.2. La séparation par chromatographie liquide des standards de l'ypérite dans le plasma

La phase mobile B est du méthanol de qualité HPLC-MS tamponnée avec du formiate d'ammonium (2 mM) et de l'acide formique (0,2%). La phase mobile A reste l'eau ultra-pure tamponnée avec du formiate d'ammonium (2 mM) et de l'acide formique (0,2%).

Les conditions initiales sont 1% de la phase mobile B pendant 2 min. La proportion de B augmente linéairement jusqu'à 10% entre 2 et 4 min puis jusqu'à 60% entre 4 min et 8min. Il y a un plateau de 1 min à 60% de B avant un retour aux conditions initiales à partir de 9,1 min. Le temps d'analyse total est de 11 min. Le débit est fixé à 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le four de la colonne est réglé à 50°C alors que le passeur automatique d'échantillons conserve les vials à 15°C. La quantification a été faite par dilution isotopique en utilisant les étalons internes marqués.

7.3. La détection par spectrométrie de masse

Le laboratoire dispose d'un système QTRAP de la série 6500+ de Sciex (Framingham, MA) (*Figure 90*). La détection a toujours été faite en utilisant le mode de scan MRM pour les méthodes validées. La source d'ionisation a été utilisée en mode positif. Certains paramètres du SM ont été optimisés au tout début de ces travaux de thèse avec les biomarqueurs du CEES. Ces paramètres sont restés inchangés pour les différences méthodes développées, ils sont présentés dans le *Tableau 18*. D'autres paramètres sont dépendants des transitions utilisées en MRM. Le *Tableau 19* résume l'ensemble des paramètres de chaque transition de la méthode validée pour les biomarqueurs du CEES dans les milieux de culture dont le *Dwell Time* est de 50 msec. Le *Tableau 20* résume l'ensemble des paramètres de chaque transition de la méthode validée pour les biomarqueurs de l'ypérite dans le plasma dont le *Dwell Time* est de 150 msec.



Figure 90 : Représentation du spectromètre de masse utilisé pendant ces travaux, le QTRAP 6500+ de Sciex.

CUR (psi)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (psi)	GS2 (psi)
45	5300	550	60	60

Tableau 18 : Paramètres invariables dans ces travaux de thèse de la source du SM.

Nom	Transition (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CxP (V)
N7Gua-CEES 61	240 → 61	50	8	50	10
N7Gua-CEES 89	240 → 89	45	15	20	10
N7Gua-CEES 55	240 → 55	45	8	50	5
N7Gua-CEES* SI 61	245 → 61	50	8	50	10
N7Gua-CEES* SI 89	245 → 89	45	15	20	10
N7Gua-CEES* SI 55	245 → 55	45	8	50	5
GSH-CEES 89	396 → 89	45	8	20	10
GSH-CEES 121	396 → 121	45	8	20	10
GSH-CEES 321	396 → 321	45	8	20	10
GSH-CEES* SI 61	399 → 61	45	8	70	10
GSH-CEES* SI 89	399 → 89	45	8	20	10
GSH-CEES* SI 121	399 → 121	45	8	20	10
Cys-CEES 61	210 → 61	45	8	60	10
Cys-CEES 89	210 → 89	45	8	20	10
Cys-CEES 120	210 → 120	45	8	20	5
Cys-CEES* SI 61	214 → 61	45	8	60	10
Cys-CEES* SI 89	214 → 89	45	8	20	10
Cys-CEES* SI 93	214 → 93	45	8	20	5
NAC-CEES 61	252 → 61	45	8	60	5
NAC-CEES 89	252 → 89	45	8	10	5
NAC-CEES 116	252 → 116	45	15	50	5
NAC-CEES* SI 61	256 → 61	45	8	60	5
NAC-CEES* SI 89	256 → 89	45	8	10	5
NAC-CEES* SI 119	256 → 119	45	15	50	5

Tableau 19 : Les transitions MRM utilisées pour la méthode validée au chapitre 1 pour les biomarqueurs du CEES et leurs EI dans les milieux de culture, et leurs paramètres optimisés en spectrométrie de masse.

Nom	Transition (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CxP (V)
N7Gua-Yp 61	256 → 61	20	5	40	30
N7Gua-Yp 87	256 → 87	20	10	35	20
N7Gua-Yp 105	256 → 105	20	10	20	30
N7Gua-Yp* SI 61	261 → 61	20	5	40	30
N7Gua-Yp* SI 87	261 → 87	20	10	35	20
N7Gua-Yp* SI 105	261 → 105	20	10	20	30
Cys-Yp 61	226 → 61	20	10	50	10
Cys-Yp 74	226 → 74	40	10	50	10
Cys-Yp 105	226 → 105	50	5	20	15
Cys-Yp* SI 61	230 → 61	20	5	40	10
Cys-Yp* SI 74	230 → 74	40	10	50	10
Cys-Yp* SI 105	230 → 105	50	5	20	15
NAC-Yp 84	268 → 84	50	10	40	10
NAC-Yp 116	268 → 116	20	5	50	20
NAC-Yp 162	268 → 162	20	10	20	20
NAC-Yp* SI 87	272 → 87	50	10	40	10
NAC-Yp* SI 119	272 → 119	20	5	50	20
NAC-Yp* SI 166	272 → 166	20	10	20	20

Tableau 20 : Les transitions MRM utilisées pour la méthode validée au chapitre 5 pour les biomarqueurs de l'ypérite et leurs EI dans le plasma, et leurs paramètres optimisés en spectrométrie de masse. Le paramètre « dwell time » est identique pour toutes les transitions et fixé à 50 ms.

8. Analyses statistiques

Les données ont été analysées par le logiciel GraphPad PRISM. Dans le chapitre 3 et le chapitre 6, concernant le traitement des explants de peau et le traitement des cellules primaires, la comparaison des moyennes a été faite par des tests ANOVA et de Student. Dans le chapitre 4, concernant le traitement des souris, les données ont été analysées par un test ANOVA suivi d'un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis pour des comparaisons multiples.

Liste des communications

1. Publications

Roser M., Béal D., Eldin C., Gudimard L., Caffin F., Gros-Désormeaux F., Léonço D., Fenaille F., Junot C., Piérard C., Douki T.(2021) Specific biomarkers from the mercapturate pathway for retrospective detection of sulfur mustard exposure: glutathione, cysteine, and N-acetyl-cysteine conjugates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **413**, 1337-1351

Gilardoni M., Léonço D., Caffin F., Gros-Désormeaux F., Eldin C., Béal D., Ouzia S., Junot C., Fenaille F., Piérard C.; Douki T., Evidence for the systemic diffusion of (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide, a sulfur mustard simulant, and its deleterious effects in brain. *Toxicology*

2. Présentations orales

Evaluation de l'exposition à un simulant de l'ypérite grâce aux conjugués du glutathion et à un adduit de l'ADN. - Congrès SFTA - septembre 2021 - Biarritz (à venir)

3. Posters

Des biomarqueurs d'exposition aux agents vésicants - Journées NRBC du CEA - janvier 2019 - Paris Saclay

De nouveaux biomarqueurs spécifiques pour l'évaluation de l'exposition à l'ypérite - Journées NRBC du CEA - janvier 2020 - Paris Saclay

Glutathione, cysteine, and N-acetyl-cysteine conjugates as biomarkers of exposure to sulphur mustard for a specific and non-invasive analytical method - Congrès SOT - mars 2020 - Anaheim (e-poster car congrès annulé)

4. Autre

Participation, après sélections des candidats, au **Global Young Scientists Summits** - janvier 2021 - Singapour (congrès en-ligne)

Glossaire de termes médicaux

Aérosol β_2 mimétique	Traitement de la crise d'asthme.
Anémie	État morbide dû à un appauvrissement du sang dans lequel on constate une diminution du nombre des globules rouges, et qui se manifeste notamment par une pâleur extrême de la peau.
Asthénie	Affaiblissement pathologique de l'état général.
Atélectasie	Pathologie de l'appareil respiratoire. Elle correspond à l'affaissement des alvéoles de tout ou partie d'un des deux poumons
Blépharospasme	Spasme des muscles orbiculaires de l'œil provoquant un clignement involontaire et une fermeture de l'œil.
Bronchopneumonie	Inflammation plus ou moins étendue des bronches, des bronchioles, et des alvéoles pulmonaires, ainsi que du tissu interstitiel pulmonaire, c'est-à-dire du parenchyme (tissu situé entre ces organes).
Dysphonie	Trouble de la voix qui peut concerner son intensité, sa hauteur et son timbre. Elle peut notamment être d'origine inflammatoire, traumatique, tumorale ou nerveuse.
Dyspnée	Inconfort respiratoire qui peut avoir des causes pulmonaires, cardiaques ou générales.
Effet systémique	Systémique est le terme médical utilisé pour qualifier un trouble qui affecte la totalité de l'organisme et non pas seulement une partie du corps.
Érythème	Rougeur congestive de la peau, plus ou moins étendue, qui résulte d'une dilatation des vaisseaux sanguins cutanés expliquant le phénomène de vitropression (la rougeur disparaît à l'appui).
Expectoration	Action de rejeter par la bouche les mucosités des voies respiratoires.
Hyperleucocytose	Élévation anormale du nombre des leucocytes.
Irritation conjonctivale	Inflammation de la muqueuse lisse et transparente qui tapisse la paroi intérieure de la paupière et la face externe du globe oculaire, et qui unit ces organes en leur permettant de glisser l'un sur l'autre.
Laryngite	Inflammation du larynx.

Leucopénie	Diminution du nombre des globules blancs circulant dans le sang au-dessous d'un certain taux.
Nécrose	Processus d'altération aboutissant à la destruction d'une cellule, d'un tissu organique.
Oedème	Infiltration séreuse de divers tissus et en particulier des tissus sous-cutané et sous-muqueux, se révélant, au niveau de la peau, par un gonflement indolore gardant quelque temps l'empreinte du doigt.
Pharyngite	Inflammation du pharynx qui peut avoir des origines diverses, notamment microbienne, toxique, allergique.
Photophobie	Crainte de la lumière vive due à certaines affections nerveuses ou à une extrême sensibilité de la rétine dans certaines affections oculaires.
Prurit	Sensation de démangeaison cutanée due à une maladie de la peau, une affection générale ou un trouble fonctionnel des nerfs de la peau qui déclenche un réflexe de grattage plus ou moins vif.
Rhinite	Inflammation de la muqueuse nasale.
Thrombopénie	Trouble de la coagulation provoqué par une diminution du nombre de plaquettes.
Trachéo-bronchite	Inflammation de la trachée et des voies respiratoires se ramifiant à partir de la trachée, causée par une infection.
Vésication	Formation d'ampoules sur la peau, causées par un vésicatoire.
Vésication palpébrale	Vésication de la conjonctive palpébrale, membrane qui forme la partie inférieure de la paupière.
Vésicule	Cloque remplie de liquide transparent.

Références bibliographiques

1. Mathias PI, B'hymer C (2016) Mercapturic acids: recent advances in their determination by liquid chromatography/mass spectrometry and their use in toxicant metabolism studies and in occupational and environmental exposure studies. *Biomarkers* 21:293–315 .
<https://doi.org/10.3109/1354750X.2016.1141988>
2. Watson W, Mutti A (2004) Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers* 9:211–242
3. Convention sur l'interdiction des armes chimiques.
4. Despretz (1822). *Annales de chimie et de physique* 21:437–438
5. Cattelain E (1939) L'ypérite ou gaz moutarde: son histoire, le secret de sa puissance, son avenir. *Revue générale des sciences pures et appliquées* 49:205–211
6. Niemann A (1860) Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaylgas. *Ann Chem Pharm* 113:288–292 . <https://doi.org/10.1002/jlac.18601130304>
7. Guthrie F (1860) On some derivatives from the olefines. *Chemical Society of London* 12:109–126
8. Meyer V (1886) Ueber Thiodiglykolverbindungen. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin* 12:3259–3266
9. Duchovic RJ, Vilensky JA (2007) Mustard Gas: Its Pre-World War I History. *J Chem Educ* 84:944 . <https://doi.org/10.1021/ed084p944>
10. Romano JA, Lukey BJ, Salem H (2008) *Chemical warfare agents: chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton
11. Szinicz L (2005) History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214:167–181 .
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.011>
12. Vanninen P, Östin A, Bełdowski J, Pedersen EA, Söderström M, Szubska M, Grabowski M, Siedlewicz G, Czub M, Popiel S, Nawala J, Dziedzic D, Jakacki J, Pączek B (2020) Exposure status of sea-dumped chemical warfare agents in the Baltic Sea. *Marine Environmental Research* 161:105112 . <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105112>
13. Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Panahi Y, Shoja MM (2011) Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Critical Reviews in Toxicology* 41:384–403 . <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.541224>
14. Sezigen S, Ivelik K, Ortatatli M, Almacioglu M, Demirkasimoglu M, Eyison RK, Kunak ZI, Kenar L (2019) Victims of chemical terrorism, a family of four who were exposed to sulfur mustard. *Toxicology Letters* 303:9–15 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.006>
15. Kilic E, Ortatatli M, Sezigen S, Eyison RK, Kenar L (2018) Acute intensive care unit management of mustard gas victims: the Turkish experience. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 37:332–337 . <https://doi.org/10.1080/15569527.2018.1464018>
16. Wattana M, Bey T (2009) Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital and Disaster Medicine* 24:19–29 .
<https://doi.org/10.1017/S1049023X0000649X>
17. Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale (2017) Étude prospective à l'horizon 2030 : impacts des transformations et ruptures technologiques sur notre environnement stratégique et de sécurité. http://www.sgdsn.gouv.fr/rapport_thematique/chocs-futurs/

18. Renshaw B (1946) Mechanisms in production of cutaneous injuries by sulfur and nitrogen mustards. In: *Chemical Warfare Agents, and Related Chemical Problems*
19. Cullumbine H (1947) Medical aspects of mustard gas poisoning. *Nature* 151–153
20. Nagy SM, Golumbic C, Stein WH, Fruton JS, Bergmann M (1946) The penetration of vesicant vapors into human skin. *The Journal of General Physiology* 29:441–469 .
<https://doi.org/10.1085/jgp.29.6.441>
21. Langenberg JP, Spruit HET, Trap HC, Kuijpers WC, Mars-Groenendijk RH (1998) Respiratory And Percutaneous Toxicokinetics Of Sulfur Mustard And Its Dna-Adducts In The Hairless Guinea Pig. *Drug and Chemical Toxicology* 131–147 .
<https://doi.org/10.3109/01480549809007407>
22. Cameron GR, Gaddum JH, Short RHD (1946) The absorption of war gases by the nose. *J Pathol* 58:449–455 . <https://doi.org/10.1002/path.1700580315>
23. Clemedson C-J, Kristoffersson H, Sörbo B, Ullberg S (1963) Whole Body Autoradiographic Studies of the Distribution of Sulphur 35-Labelled Mustard Gas in Mice. *Acta Radiologica: Therapy, Physics, Biology* 1:314–320 . <https://doi.org/10.3109/02841866309134109>
24. Bournsnel JC, Greville GD, Needham DM, Wormall A (1946) Studies on Mustard Gas ($\beta\beta'$ -Dichlorodiethyl Sulphide) and some Related Compounds. *Biochemical Journal* 40:768–774
25. Axelrod DJA, Hamilton JG (1947) Radio-autographic studies of the distribution of lewisite and mustard gas in skin and eye tissues. *American Journal of Pathology* 23:389–411
26. Davison C, Rozman R, Smith P (1961) Metabolism of bis- β -chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas). *Biochemical Pharmacology* 7:65–74
27. Roberts JJ, Warwick GP (1963) Studies of the mode of action of alkylating agents – VI The metabolism of bis-2-chloroethylsulphide (mustard gas) and related compounds. *Biochemical Pharmacology* 12:1329–1334 . [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(63\)90202-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(63)90202-8)
28. Reid E (1958) Organic chemistry of bivalent sulfur.
29. Ward JR, Seiders RP (1984) On the activation energy for the hydrolysis of bis-(2-chloroethyl) sulfide. *Thermochimica Acta* 81:343–348 . [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(84\)85140-0](https://doi.org/10.1016/0040-6031(84)85140-0)
30. Batal M, Boudry I, Mouret S, Wartelle J, Emorine S, Bertoni M, Bérard I, Cléry-Barraud C, Douki T (2013) Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273:644–650 .
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.010>
31. Blair IA (2010) Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. *Biomed Chromatogr* 24:29–38 . <https://doi.org/10.1002/bmc.1374>
32. Barr JR, Pierce CL, Smith JR, Capacio BR, Woolfitt AR, Solano MI, Wooten JV, Lemire SW, Thomas JD, Ash DH, Ashley DL (2008) Analysis of Urinary Metabolites of Sulfur Mustard in Two Individuals after Accidental Exposure. *Journal of Analytical Toxicology* 32:10–16 .
<https://doi.org/10.1093/jat/32.1.10>
33. Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghavan R (2001) Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes. *Chemico-biological interactions* 134:1–12

34. Shohrati M, Ghanei M, Shamspour N, Babaei F, Abadi MN, Jafari M, Ali AH (2010) Glutathione and Malondialdehyde Levels in Late Pulmonary Complications of Sulfur Mustard Intoxication. *Lung* 188:77–83 . <https://doi.org/10.1007/s00408-009-9178-y>
35. Pohanka M, Stetina R, Svobodova H, Ruttkay-Nedecky B, Jilkova M, Sochor J, Sobotka J, Adam V, Kizek R (2013) Sulfur mustard causes oxidative stress and depletion of antioxidants in muscles, livers, and kidneys of Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology* 36:270–276 . <https://doi.org/10.3109/01480545.2012.710629>
36. Naghii MR (2002) Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Military Medicine* 573–575
37. Sabnam S, Rizwan H, Pal S, Pal A (2020) CEES-induced ROS accumulation regulates mitochondrial complications and inflammatory response in keratinocytes. *Chemico-Biological Interactions* 321:109031 . <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109031>
38. Varmazyar M, Kianmehr Z, Faghizadeh S, Ghazanfari T, Ardestani SK (2019) Time course study of oxidative stress in sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced toxicity. *International Immunopharmacology* 73:81–93 . <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.055>
39. Bartsch H, Nair J (2006) Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery* 391:499–510
40. Vijayaraghavan R, Sugendran K, Pant SC, Husain K, Malhotra RC (1991) Dermal intoxication of mice with bis(2-chloroethyl)sulphide and the protective effect of flavonoids. *Toxicology* 69:35–42 . [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(91\)90151-P](https://doi.org/10.1016/0300-483X(91)90151-P)
41. Miccadei S, Kyle ME, Gilfor D, Farber JL (1988) Toxic consequence of the abrupt depletion of glutathione in cultured rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 265:311–320 . [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90133-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90133-6)
42. Mol MAE, Smith WJ (1996) Ca²⁺ homeostasis and Ca²⁺ signalling in sulphur mustard-exposed normal human epidermal keratinocytes. *Chemico-Biological Interactions* 100:85–93 . [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(96\)03692-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(96)03692-7)
43. Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CMG, Iyer S, Smulson ME, Spoonde A, Smith W, Ray R (1998) Sulfur Mustard Induces Markers of Terminal Differentiation and Apoptosis in Keratinocytes Via a Ca²⁺-Calmodulin and Caspase-Dependent Pathway. *Journal of Investigative Dermatology* 111:64–71 . <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00250.x>
44. Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J, Swenberg JA (2009) The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 678:76–94 . <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.006>
45. Ludlum DB, Kent S, Mehta JR (1986) Formation of O6-ethylthioethylguanine in DNA by reaction with the sulphur mustard, chloroethyl sulfide, and its apparent lack of repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 7:1203–1206
46. Batal M (2013) Etude de la formation et de la réparation des dommages à l'ADN causés par l'ypérite chez l'animal. PhD Thesis, Université de Grenoble
47. Fox M, Scott D (1980) The genetic toxicology of nitrogen and sulphur mustard. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 75:131–168 . [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(80\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(80)90012-3)

48. Schärer OD (2005) DNA Interstrand Crosslinks: Natural and Drug-Induced DNA Adducts that Induce Unique Cellular Responses. *ChemBioChem* 6:27–32 .
<https://doi.org/10.1002/cbic.200400287>
49. Noll DM, Mason TM, Miller PS (2006) Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chem Rev* 106:277–301 . <https://doi.org/10.1021/cr040478b>
50. Matijasevic Z, Volkert MR (2007) Base excision repair sensitizes cells to sulfur mustard and chloroethyl ethyl sulfide. *DNA Repair* 6:733–741 .
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.12.014>
51. Jowsey PA, Williams FM, Blain PG (2009) DNA damage, signalling and repair after exposure of cells to the sulphur mustard analogue 2-chloroethyl ethyl sulphide. *Toxicology* 257:105–112 .
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.001>
52. Her J, Bunting SF (2018) How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 293:10502–10511 . <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>
53. Jost P, Svobodova H, Stetina R (2015) Induction and repair of DNA cross-links induced by sulfur mustard in the A-549 cell line followed by a comet assay. *Chemico-Biological Interactions* 237:31–37 . <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.05.009>
54. Mol MAE, van der Schans GP, H.M. Lohman P (1993) Quantification of sulfur mustard-induced DNA interstrand cross-links and single-strand breaks in cultured human epidermal keratinocytes. *Mutation Research/DNA Repair* 294:235–245 . [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(93\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0921-8777(93)90006-3)
55. Bhat KR, Benton BJ, Ray R (2006) Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is essential for sulfur mustard-induced DNA damage repair, but has no role in DNA ligase activation. *J Appl Toxicol* 26:452–457 . <https://doi.org/10.1002/jat.1161>
56. Papirmeister B, Gross L, Meier HL (1985) Molecular Basis for Mustard-Induced Vesication. *Fundamental and applied toxicology* 5:134–149
57. Bürkle A (2001) PARP-1: A Regulator of Genomic Stability Linked with Mammalian Longevity. *Biochemistry* 2:725–728
58. Pieper A (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends in Pharmacological Sciences* 20:171–181 . [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01292-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01292-4)
59. Lawley P, Brookes P (1963) Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochemical Journal* 89:127–138 . <https://doi.org/10.1042/bj0890127>
60. Shukla PK, Mishra PC (2010) A quantum chemical study of reactions of DNA bases with sulphur mustard: a chemical warfare agent. *Theor Chem Acc* 125:269–278 .
<https://doi.org/10.1007/s00214-009-0514-3>
61. Kehe K, Szinicz L (2005) Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* 214:198–209 . <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.014>
62. Lodhi IJ, Sweeney JF, Clift RE, Hinshaw DB (2001) Nuclear Dependence of Sulfur Mustard-Mediated Cell Death. *Toxicology and Applied Pharmacology* 170:69–77 .
<https://doi.org/10.1006/taap.2000.9083>
63. Thavaselvam D, Flora SS (2014) Chemical and biological warfare agents. In: *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier, pp 521–538

64. Husain K, Dube SN, Sugendran K, Singh R, Gupta' SD, Soman SM (1996) Effect of Topically Applied Sulphur Mustard on Antioxidant Enzymes in Blood Cells and Body Tissues of Rats. *Journal of Applied Toxicology* 16:245–248
65. Mirbagheri L, Roudkenar MH, Fooladi AAI, Ghanei M, Nourani MR (2013) Downregulation of Super Oxide Dismutase Level in Protein Might Be Due to Sulfur Mustard Induced Toxicity in Lung. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 12:153–160
66. van der Schans GP, Noort D, Mars-Groenendijk RH, Fidder A, Chau LF, de Jong LPA, Benschop HP (2002) Immunochemical Detection of Sulfur Mustard Adducts with Keratins in the Stratum Corneum of Human Skin. *Chem Res Toxicol* 15:21–25 .
<https://doi.org/10.1021/tx0100136>
67. Dillman JF, McGary KL, Schlager JJ (2003) Sulfur mustard induces the formation of keratin aggregates in human epidermal keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 193:228–236 . <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.003>
68. Werrlein RJ, Madren-Whalley JS (2000) Effects of sulfur mustard on the basal cell adhesion complex. *Journal of Applied Toxicology* 20:115–123 . <https://doi.org/10.1002/jat.682>
69. Mol MAE, van den Berg RM, Benschop HP (2008) Proteomic assessment of sulfur mustard-induced protein adducts and other protein modifications in human epidermal keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230:97–108 . <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.02.006>
70. Balali-Mood M, Mousavi S, Balali-Mood B (2008) Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans. *EHTJ* 1: .
<https://doi.org/10.3134/ehtj.08.007>
71. Kehe K, Thiermann H, Balszuweit F, Eyer F, Steinritz D, Zilker T (2009) Acute effects of sulfur mustard injury - Munich experiences. *Toxicology* 263:3–8 .
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.060>
72. Sezigen S, Kenar L (2020) Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. *Toxicology Letters* 320:52–57 .
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.001>
73. World Health Organization (1970) *Health Aspects of Chemical and Biological Weapons*. World Health Organization, Genève
74. Balali-Mood M (2015) Early and Delayed Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans After the Iraq-Iran Conflict. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier, pp 37–46
75. Steinritz D, Striepling E, Rudolf K-D, Schröder-Kraft C, Püschel K, Hullard-Pulstinger A, Koller M, Thiermann H, Gandor F, Gawlik M, John H (2016) Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. *Toxicology Letters* 244:112–120 .
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.1105>
76. Balali-Mood M, Hefazi M (2006) Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:273–282 . https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_429.x
77. Willem JL *Chemical management of mustard gas casualties*

78. Sezigen S, Eyison RK, Ortatatli M, Kilic E, Kenar L (2020) Myelosuppression and acute hematological complications of sulfur mustard exposure in victims of chemical terrorism. *Toxicology Letters* 318:92–98 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.10.017>
79. Etemad L, Moshiri M, Balali-Mood M (2018) II: Clinical Management and Therapy. *Iranian Journal of Medical Sciences* 43:235–247
80. Moradi F, Söderberg M, Moradi F, Daka B, Olin A-C, Lärstad M (2019) Health perspectives among Halabja’s civilian survivors of sulfur mustard exposure with respiratory symptoms - A qualitative study. *PLoS ONE* 14: . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218648>
81. Ghasemi H, Javadi MA, Ardestani SK, Mahmoudi M, Pourfarzam S, Mahdavi MRV, Yarmohammadi ME, Baradaran-Rafii A, Jadidi K, Shariatpanahi S, Rastin M, Heidary F, Safavi M, Mirsharif ES, Nasiri Z, Ghazanfari T (2020) Alteration in inflammatory mediators in seriously eye-injured war veterans, long-term after sulfur mustard exposure. *International Immunopharmacology* 80:105897 . <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105897>
82. Pleyer U, Sherif Z, Baatz H, Hartmann C (1999) Delayed Mustard Gas Keratopathy: Clinical Findings and Confocal Microscopy. *Brief reports* 128:506–507
83. Shoeibi N, Balali-Mood M, Abrishami M (2013) Sulfur Mustard Exposure and Non-Ischemic Central Retinal Vein Occlusion. *Iranian Journal of Medical Sciences* 41:5
84. Davoodzadeh H, Rahmani H (2015) Systemic Inflammation in Chemical Lung Veterans with Mustard Gas. *Persian Journal of Medical Sciences* 2:18–29
85. Weinberger B, Laskin JD, Sunil VR, Sinko PJ, Heck DE, Laskin DL (2011) Sulfur mustard-induced pulmonary injury: Therapeutic approaches to mitigating toxicity. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 24:92–99 . <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.09.004>
86. Asnaf SE, Sabetghadam M, Jafarnejad H, Halabian R, Parvin S, Vahedi E, Pazoki N, Salimian J (2019) Is the Inflammasome Pathway Active in the Peripheral Blood of Sulfur Mustard-exposed Patients? *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 18:218–224
87. Müller-Dott K, Thiermann H, Steinritz D, Popp T (2020) Effect of sulfur mustard on melanogenesis in vitro. *Toxicology Letters* 319:197–203 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.11.014>
88. Wada S, Miyanishi M, Nishimoto Y, Kambe S, Miller RW (1968) Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man. *The Lancet* 1:1161–1163 . [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)91863-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)91863-1)
89. Yamakido M, Ishioka S, Hiyama K, Maeda A (1996) Former Poison Gas Workers and Cancer: Incidence and Inhibition of Tumor Formation by Treatment with Biological Response Modifier N-CWS. *Environmental Health Perspectives* 104:485–488 . <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s3485>
90. Hosseini-khalili A, Haines DD, Modirian E, Soroush M, Khateri S, Joshi R, Zendehtdel K, Ghanei M, Giardina C (2009) Mustard gas exposure and carcinogenesis of lung. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 678:1–6 . <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.022>
91. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987) IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. *International Agency for Research on Cancer* 1–42:259–260

92. Beigi Harchegani A, Mirnam Niha M, Sohrabiyan M, Ghatrehsamani M, Tahmasbpour E, Shahriary A (2018) Cellular and molecular mechanisms of sulfur mustard toxicity on spermatozoa and male fertility. *Toxicology Research* 7:1029–1035 . <https://doi.org/10.1039/C8TX00062J>
93. Matijasevic Z, Precopio ML, Snyder JE, Ludlum DB (2001) Repair of sulfur mustard-induced DNA damage in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. *Carcinogenesis* 22:661–664 . <https://doi.org/10.1093/carcin/22.4.661>
94. Jain AK, Tewari-Singh N, Gu M, Inturi S, White CW, Agarwal R (2011) Sulfur mustard analog, 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced skin injury involves DNA damage and induction of inflammatory mediators, in part via oxidative stress, in SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicology Letters* 205:293–301 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.06.019>
95. Pal A, Tewari-Singh N, Gu M, Agarwal C, Huang J, Day BJ, White CW, Agarwal R (2009) Sulfur mustard analog induces oxidative stress and activates signaling cascades in the skin of SKH-1 hairless mice. *Free Radical Biology and Medicine* 47:1640–1651 . <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.011>
96. Inturi S, Tewari-Singh N, Gu M, Shrotriya S, Gomez J, Agarwal C, White CW, Agarwal R (2011) Mechanisms of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced DNA damage in skin epidermal cells and fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 51:2272–2280 . <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.020>
97. Roser M, Béal D, Eldin C, Gudimard L, Caffin F, Gros-Désormeaux F, Léonço D, Fenaille F, Junot C, Piérard C, Douki T (2021) Glutathione conjugates of the mercapturic acid pathway and guanine adduct as biomarkers of exposure to CEES, a sulfur mustard analog. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 1337–1351 . <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03096-4>
98. Black RM (2008) An Overview of Biological Markers of Exposure to Chemical Warfare Agents. *Journal of Analytical Toxicology* 32:2–9 . <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.2>
99. Blum M-M, Mamidanna RVSM (2014) Analytical chemistry and the Chemical Weapons Convention. *Anal Bioanal Chem* 406:5067–5069 . <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7931-4>
100. Drasch G, Kretschmer E, Kauert G, von Meyer L (1987) Concentrations of mustard gas [bis(2-chloroethyl)sulfide] in the tissues of a victim of a vesicant exposure. *J Forensic Sci* 32:1788–1793
101. United Nations (1986) Report of the Mission Disp. by the Secretary General to Investigate Actions of the Use of Chemical Weapons in Conflict between the Islamic Republic of Iran–Iraq
102. Xu B, Zong C, Zhang Y, Zhang T, Wang X, Qi M, Wu J, Guo L, Wang P, Chen J, Liu Q, Xu H, Xie J, Zhang Z (2017) Accumulation of intact sulfur mustard in adipose tissue and toxicokinetics by chemical conversion and isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Arch Toxicol* 91:735–747 . <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1774-z>
103. Noort D, Benschop HP, Black RM (2002) Biomonitoring of Exposure to Chemical Warfare Agents: A Review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184:116–126 . <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9449>
104. Jakubowski EM, Woodard CL, Mershon MM, Dolzine TW (1990) Quantification of thiodiglycol in urine by electron ionization gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 528:184–190 . [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82374-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82374-9)

105. Wils ERJ, Hulst AG, van Laar J (1988) Analysis of Thiodiglycol in Urine of Victims of an Alleged Attack with Mustard Gas, Part II. *Journal of Analytical Toxicology* 12:15–19 . <https://doi.org/10.1093/jat/12.1.15>
106. Black RM, Read RW (1991) Methods for the analysis of thiodiglycol sulphoxide, a metabolite of sulphur mustard, in urine using gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 558:393–404 . [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)80006-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)80006-3)
107. Black RM, Read RW (1988) Detection of trace levels of thiodiglycol in blood, plasma and urine using gas chromatography – electron-capture negative-ion chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 449:261–270 . [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94385-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94385-1)
108. Gómez-Caballero E, Martínez-Álvarez R, Sierra MA (2018) Unexpected Reaction Pathways Leading to Thiodiglycol During the Degradation of Long-Chain Sulfur Mustards. *The Journal of Organic Chemistry* 83:12432–12439 . <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01670>
109. Cooper AJL, Krasnikov BF, Niatsetskaia ZV, Pinto JT, Callery PS, Villar MT, Artigues A, Bruschi SA (2011) Cysteine S-conjugate β -lyases: important roles in the metabolism of naturally occurring sulfur and selenium-containing compounds, xenobiotics and anticancer agents. *Amino Acids* 41:7–27 . <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0552-0>
110. Rodin IA, Braun AV, Savelieva EI, Rybalchenko IV, Ananieva IA, Shpigun OA (2011) Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethane] in plasma and urine by liquid chromatography-negative electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 34:1676–1685 . <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.578320>
111. Read RW, Black RM (2004) Analysis of the sulfur mustard metabolite 1, 1'-sulfonylbis [2-S-(N-acetylcysteinyl) ethane] in urine by negative ion electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology* 28:352–356
112. Ludlum DB, Austin-Ritchie P, Hagopian M, Niu T-Q, Yu D (1994) Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. *Chemico-biological interactions* 91:39–49
113. Wang P, Zhang Y, Chen J, Guo L, Xu B, Wang L, Xu H, Xie J (2015) Analysis of Different Fates of DNA Adducts in Adipocytes Post-sulfur Mustard Exposure *in Vitro* and *in Vivo* Using a Simultaneous UPLC-MS/MS Quantification Method. *Chemical Research in Toxicology* 28:1224–1233 . <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00055>
114. Reiner B, Zamenhof S (1957) Studies on the chemically reactive groups of deoxyribonucleic acids. *Journal of Biological Chemistry* 228:475–486 . [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70727-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70727-8)
115. Lawley PD, Lethbridge JH (1969) Inactivation of Bacteriophage T7 by Mono- and Difunctional Sulphur Mustards in Relation to Cross-linking and Depurination of Bacteriophage DNA. *Journal of molecular biology* 39:181–198
116. Batal M, Boudry I, Cléry-Barraud C, Mouret S, Douki T (2013) Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry. *Toxicological & Environmental Chemistry* 95:260–276 . <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.758729>
117. Ludlum DB, Tong WP, Mehta JR, Kirk MC, Papirmeister B (1984) Formation of O6-Ethylthioethyldeoxyguanosine from the Reaction of Chloroethyl Ethyl Sulfide with Deoxyguanosine. 44:5

118. Fidder A, Moes GWH, Scheffer AG, van der Schans GP, Baan RA, de Jong LPA, Benschop HP (1994) Synthesis, Characterization, and Quantitation of the Major Adducts Formed between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood. *Chem Res Toxicol* 7:199–204 . <https://doi.org/10.1021/tx00038a013>
119. Yue L, Wei Y, Chen J, Shi H, Liu Q, Zhang Y, He J, Guo L, Zhang T, Xie J, Peng S (2014) Abundance of Four Sulfur Mustard-DNA Adducts ex Vivo and in Vivo Revealed by Simultaneous Quantification in Stable Isotope Dilution-Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol* 27:490–500 . <https://doi.org/10.1021/tx4003403>
120. Batal M, Rebelo-Moreira S, Hamon N, Bayle P-A, Mouret S, Cléry-Barraud C, Boudry I, Douki T (2015) A guanine-ethylthioethyl-glutathione adduct as a major DNA lesion in the skin and in organs of mice exposed to sulfur mustard. *Toxicology Letters* 233:1–7 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.001>
121. Yue L, Zhang Y, Chen J, Zhao Z, Liu Q, Wu R, Guo L, He J, Zhao J, Xie J, Peng S (2015) Distribution of DNA Adducts and Corresponding Tissue Damage of Sprague-Dawley Rats with Percutaneous Exposure to Sulfur Mustard. *Chemical Research in Toxicology* 28:532–540 . <https://doi.org/10.1021/tx5004886>
122. Benschop HP, van der Schans GP, Noort D, Fidder A, Mars-Groenendijk RH, de Jong LPA (1997) Verification of Exposure to Sulfur Mustard in Two Casualties of the Iran-Iraq Conflict. *Journal of Analytical Toxicology* 21:249–251
123. Zhang Y, Yue L, Nie Z, Chen J, Guo L, Wu B, Feng J, Liu Q, Xie J (2014) Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 961:29–35 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.050>
124. Turell L, Radi R, Alvarez B (2013) The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radical Biology and Medicine* 65:244–253 . <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050>
125. Waidyanatha S, Yeowell-O'Connell K, Rappaport SM (1998) A new assay for albumin and hemoglobin adducts of 1,2- and 1,4-benzoquinones. *Chemico-Biological Interactions* 115:117–139 . [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00067-2)
126. Bechtold WE, Willis JK, Sun JD, Griffith WC, Reddy TV (1992) Biological markers of exposure to benzene: 5-phenylcysteine in albumin. *Carcinogenesis* 13:1217–1220 . <https://doi.org/10.1093/carcin/13.7.1217>
127. Noort D, Hulst AG, de Jong LPA, Benschop HP (1999) Alkylation of Human Serum Albumin by Sulfur Mustard in Vitro and in Vivo: Mass Spectrometric Analysis of a Cysteine Adduct as a Sensitive Biomarker of Exposure. *Chem Res Toxicol* 12:715–721 . <https://doi.org/10.1021/tx9900369>
128. Pantazides BG, Quiñones-González J, Rivera Nazario DM, Crow BS, Perez JW, Blake TA, Johnson RC (2019) A quantitative method to detect human exposure to sulfur and nitrogen mustards via protein adducts. *Journal of Chromatography B* 1121:9–17 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.005>
129. Noort D, Verheij ER, Hulst AG, de Jong LPA, Benschop HP (1996) Characterization of Sulfur Mustard Induced Structural Modifications in Human Hemoglobin by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol* 9:781–787 . <https://doi.org/10.1021/tx9502148>

130. Noort D, Fidder A, Degenhardt-Langelaan C, Hulst AG (2008) Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study. *Journal of analytical toxicology* 32:25–30
131. Xu H, Nie Z, Zhang Y, Li C, Yue L, Yang W, Chen J, Dong Y, Liu Q, Lin Y, Wu B, Feng J, Li H, Guo L, Xie J (2014) Four sulfur mustard exposure cases: Overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring. *Toxicology Reports* 1:533–543 . <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.017>
132. John H, Koller M, Worek F, Thiermann H, Siegert M (2019) Forensic evidence of sulfur mustard exposure in real cases of human poisoning by detection of diverse albumin-derived protein adducts. *Arch Toxicol* 93:1881–1891 . <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02461-2>
133. Chen B, Yu H-L, Liu S-L, Liu C-C, Liang L-H, Li X-H, Li X-S, Wu J-N, Yang Y (2019) A sensitive quantification approach for detection of HETE-CP adduct after benzyl chloroformate derivatization using ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 411:3405–3415 . <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01820-3>
134. Nie Z, Liu Q, Xie J (2011) Improvements in monitoring the N-terminal valine adduct in human globin after exposure to sulfur mustard and synthesis of reference chemicals. *Talanta* 85:1154–1159 . <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.041>
135. Young SA, Capacio BR (2020) Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Verification of Sulfur Mustard Exposure in Humans through the Conversion of Protein Adducts to Free Sulfur Mustard. *Chem Res Toxicol* 33:1941–1949 . <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00134>
136. Blair I (2006) Endogenous Glutathione Adducts. *CDM* 7:853–872 . <https://doi.org/10.2174/138920006779010601>
137. Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30:42–59 . <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
138. Siegert M, Kranawetvogl A, Thiermann H, John H (2018) Glutathione as an antidote for sulfur mustard poisoning: Mass spectrometric investigations of its potency as a chemical scavenger. *Toxicology Letters* 293:31–37 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.013>
139. Townsend DM, Tew KD (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22:7369–7375 . <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
140. Koob M, Dekant W (1991) Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates. *Chemico-Biological Interactions* 77:107–136 . [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(91\)90068-I](https://doi.org/10.1016/0009-2797(91)90068-I)
141. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC (2006) Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. *Physiological Reviews* 86:849–899 . <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2005>
142. Marchand DH, Reed DJ (1989) Identification of the reactive glutathione conjugate S-(2-chloroethyl)glutathione in the bile of 1-bromo-2-chloroethane-treated rats by high-pressure liquid chromatography and precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Chem Res Toxicol* 2:449–454 . <https://doi.org/10.1021/tx00012a015>
143. Hanigan MH (2014) Gamma-Glutamyl Transpeptidase. In: *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp 103–141

144. Lee D-H, Jacobs DR (2009) Serum -glutamyltransferase: new insights about an old enzyme. *Journal of Epidemiology & Community Health* 63:884–886 .
<https://doi.org/10.1136/jech.2008.083592>
145. Hanigan MH, Frierson HF (1996) Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem* 44:1101–1108 .
<https://doi.org/10.1177/44.10.8813074>
146. Duffel M, Jakoby W (1985) Cysteine S-Conjugate N-Acetyltransferase. *Methods in enzymology* 113:516–520
147. Heuner A, Dekant W, Schwegler JS, Silbernagl S (1991) Localization and capacity of the last step of mercapturic acid biosynthesis and the reabsorption and acetylation of cysteine S-conjugates in the rat kidney. *Pflugers Arch* 417:523–527 . <https://doi.org/10.1007/BF00370949>
148. Okajima K, Inoue M, Morino Y, Itoh K (1984) Topological aspects of microsomal N-acetyltransferase, an enzyme responsible for the acetylation of cysteine S-conjugates of xenobiotics. *Eur J Biochem* 142:281–286 . <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08282.x>
149. Cooper AJL, Hanigan MH (2018) Metabolism of Glutathione S-Conjugates: Multiple Pathways. In: *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp 363–406
150. Ramsay EE, Dilda PJ (2014) Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front Pharmacol* 5: . <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00181>
151. Mathias PI, B'Hymer C (2014) A survey of liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of mercapturic acid biomarkers in occupational and environmental exposure monitoring. *Journal of Chromatography B* 964:136–145 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.057>
152. Alwis KU, Bailey TL, Patel D, Wang L, Blount BC (2016) Measuring urinary N-acetyl-S-(4-hydroxy-2-methyl-2-buten-1-yl)-L-cysteine (IPMA3) as a potential biomarker of isoprene exposure. *Analytica Chimica Acta* 941:61–66 . <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.023>
153. Chen M, Carmella SG, Li Y, Zhao Y, Hecht SS (2020) Resolution and Quantitation of Mercapturic Acids Derived from Crotonaldehyde, Methacrolein, and Methyl Vinyl Ketone in the Urine of Smokers and Nonsmokers. *Chem Res Toxicol* 33:669–677 .
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00491>
154. Schettgen T, Bertram J, Kraus T (2012) Accurate quantification of the mercapturic acids of acrylonitrile and its genotoxic metabolite cyanoethylene-epoxide in human urine by isotope-dilution LC-ESI/MS/MS. *Talanta* 98:211–219 . <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.074>
155. Reska M, Ochsmann E, Kraus T, Schettgen T (2010) Accurate quantification of mercapturic acids of styrene (PHEMAs) in human urine with direct sample injection using automated column-switching high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 397:3563–3574 . <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3893-3>
156. Halme M, Pesonen M, Hakala U, Pasanen M, Vähäkangas K, Vanninen P (2015) Applying human and pig hepatic *in vitro* experiments for sulfur mustard study: Screening and identification of metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Studying the *in vitro* metabolism of sulfur mustard by LC/MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29:1279–1287 . <https://doi.org/10.1002/rcm.7218>
157. Qi M, Xu B, Wu J, Zhang Y, Zong C, Chen J, Guo L, Xie J (2016) Simultaneous determination of sulfur mustard and related oxidation products by isotope-dilution LC–MS/MS method

- coupled with a chemical conversion. *Journal of Chromatography B* 1028:42–50 .
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.003>
158. Liu C, Liang L, Xiang Y, Yu H, Zhou S, Xi H, Liu S, Liu J (2015) An improved method for retrospective quantification of sulfur mustard exposure by detection of its albumin adduct using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:7037–7046 . <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8842-8>
 159. Liu C-C, Liu S-L, Xi H-L, Yu H-L, Zhou S-K, Huang G-L, Liang L-H, Liu J-Q (2017) Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction. *Journal of Chromatography A* 1492:41–48 .
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.056>
 160. Li C, Chen J, Liu Q, Xie J, Li H (2013) Simultaneous quantification of seven plasma metabolites of sulfur mustard by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 917–918:100–107 .
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.035>
 161. Koryagina NL, Savel'eva EI, Khlebnikova NS, Radilov AS (2018) Determination of Thiodiglycol and Its Oxide in Biomedical Samples by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 73:1209–1216 . <https://doi.org/10.1134/S1061934818130075>
 162. Riches J, Read RW, Black RM (2007) Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 7
 163. Zubel T, Hochgesand S, John H, Steinritz D, Schmidt A, Bürkle A, Mangerich A (2019) A mass spectrometric platform for the quantitation of sulfur mustard-induced nucleic acid adducts as mechanistically relevant biomarkers of exposure. *Archives of Toxicology* 93:61–79 .
<https://doi.org/10.1007/s00204-018-2324-7>
 164. Orlova OI, Karakashev GV, Savel'eva EI (2020) Simultaneous Determination of Sulfur Mustard Adducts with Guanine and Acetylcysteine in Urine by High-Resolution High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Chem* 75:1011–1017 .
<https://doi.org/10.1134/S1061934820060155>
 165. Rodin I, Braun A, Stavrianidi A, Baygildiev T, Shpigun O, Oreshkin D, Rybalchenko I (2015) 'Dilute-and-Shoot' RSLC–MS–MS Method for Fast Detection of Nerve and Vesicant Chemical Warfare Agent Metabolites in Urine. *Journal of Analytical Toxicology* 39:69–74 .
<https://doi.org/10.1093/jat/bku119>
 166. Liu C-C, Liu S-L, Xi H-L, Yu H-L, Zhou S-K, Huang G-L, Liang L-H, Liu J-Q (2017) Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction. *Journal of Chromatography A* 1492:41–48 .
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.056>
 167. Jõul P, Vaher M, Kuhtinskaja M (2018) Evaluation of carbon aerogel-based solid-phase extraction sorbent for the analysis of sulfur mustard degradation products in environmental water samples. *Chemosphere* 198:460–468 .
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.157>
 168. Lee JY, Lee YH (2016) Solid-Phase Extraction of Sulfur Mustard Metabolites Using an Activated Carbon Fiber Sorbent. *Journal of Analytical Toxicology* 40:64–71 .
<https://doi.org/10.1093/jat/bkv112>

169. Nicolas O, Robert D, Kelly MT, Bressolle F (2004) Traitements de l'échantillon biologique avant l'analyse chromatographique. Applications à la pharmacocinétique et à la toxicologie. *Ann Toxicol Anal* 16:199–213 . <https://doi.org/10.1051/ata/2004012>
170. Gru Y, Colin R, Le Cloirec P (2009) Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale. *Spectra Analyse* 38:22
171. Pichon V (2006) Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. Ed. Techniques Ingénieur
172. Voelkel W, Kronbach T (1982) A simple high-performance liquid chromatographic precolumn technique for investigation of drug metabolism in biological fluids. *Journal of Chromatography* 239:475–482
173. Kuklenyik Z, Calafat AM, Barr JR, Pirkle JL (2011) Design of online solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) hyphenated systems for quantitative analysis of small organic compounds in biological matrices: Liquid Chromatography. *J Sep Science* 34:3606–3618 . <https://doi.org/10.1002/jssc.201100562>
174. Fan Y, Shen G, Li P, Xi X, Wu H, Tian H, Lu Y, Yin Z (2015) A simple and automated online SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of olanzapine, fluoxetine and norfluoxetine in human plasma and its application in therapeutic drug monitoring. *RSC Adv* 5:34342–34352 . <https://doi.org/10.1039/C5RA02489G>
175. Giddings JC, Myers MN, King JW (1969) Dense Gas Chromatography at Pressures to 2000 Atmospheres. *Journal of Chromatographic Science* 7:276–283 . <https://doi.org/10.1093/chromsci/7.5.276>
176. Trufelli H, Palma P, Famiglioni G, Cappiello A (2011) An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry: an overview of matrix effects in LC-MS. *Mass Spectrom Rev* 30:491–509 . <https://doi.org/10.1002/mas.20298>
177. Commission des communautés européennes (2002) Décision de la commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats
178. (2018) Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. 44
179. Batal M, Boudry I, Cléry-Barraud C, Mouret S, Douki T (2013) Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry. *Toxicological & Environmental Chemistry* 95:260–276 . <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.758729>
180. Murphy CM, Fenselau C, Gutierrez PL (1992) Fragmentation characteristic of glutathione conjugates activated by high-energy collisions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 3:815–822
181. Xie C, Zhong D, Chen X (2013) A fragmentation-based method for the differentiation of glutathione conjugates by high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization. *Analytica Chimica Acta* 788:89–98 . <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.022>
182. (2013) Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* 37:452–474 . <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>

183. Shrivastava A, Gupta V (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci* 2:21 . <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
184. Manevski N, Swart P, Balavenkatraman KK, Bertschi B, Camenisch G, Kretz O, Schiller H, Walles M, Ling B, Wettstein R (2015) Phase II metabolism in human skin: skin explants show full coverage for glucuronidation, sulfation, N-acetylation, catechol methylation, and glutathione conjugation. *Drug Metabolism and Disposition* 43:126-139
185. Payne OJ, Graham SJ, Dalton CH, Spencer PM, Mansson R, Jenner J, Azeke J, Braue E (2013) The effects of sulfur mustard exposure and freezing on transdermal penetration of tritiated water through ex vivo pig skin. *Toxicology in Vitro* 27:79-83 . <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.09.015>
186. Anderson NL, Anderson NG (2002) The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 1:845-867 . <https://doi.org/10.1074/mcp.R200007-MCP200>
187. Chambers JC, Zhang W, Lord GM, van der Harst P, Lawlor DA, Sehmi JS, Gale DP, Wass MN, Ahmadi KR, Bakker SJL, Beckmann J, Bilo HJG, Bochud M, Brown MJ, Caulfield MJ, Connell JMC, Cook HT, Cotlarciuc I, Smith GD, de Silva R, Deng G, Devuyst O, Dikkeschei LD, Dimkovic N, Dockrell M, Dominiczak A, Ebrahim S, Eggermann T, Farrall M, Ferrucci L, Floege J, Forouhi NG, Gansevoort RT, Han X, Hedblad B, van der Heide JJH, Hepkema BG, Hernandez-Fuentes M, Hypponen E, Johnson T, de Jong PE, Kleefstra N, Lagou V, Lapsley M, Li Y, Loos RJJ, Luan J, Luttrupp K, Maréchal C, Melander O, Munroe PB, Nordfors L, Parsa A, Peltonen L, Penninx BW, Perucha E, Pouta A, Prokopenko I, Roderick PJ, Ruukonen A, Samani NJ, Sanna S, Schalling M, Schlessinger D, Schlieper G, Seelen MAJ, Shuldiner AR, Sjögren M, Smit JH, Snieder H, Soranzo N, Spector TD, Stenvinkel P, Sternberg MJE, Swaminathan R, Tanaka T, Ubink-Veltmaat LJ, Uda M, Vollenweider P, Wallace C, Waterworth D, Zerres K, Waeber G, Wareham NJ, Maxwell PH, McCarthy MI, Jarvelin M-R, Mooser V, Abecasis GR, Lightstone L, Scott J, Navis G, Elliott P, Kooner JS (2010) Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* 42:373-375 . <https://doi.org/10.1038/ng.566>
188. Hanna PE, Anders MW (2019) The mercapturic acid pathway. *Critical Reviews in Toxicology* 49:819-929 . <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1692191>
189. Hinchman CA, Rebbeor JF, Ballatori N (1998) Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 275:G612-G619 . <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.4.G612>
190. Gros-Désormeaux F, Béracochéa D, Dorandeu F, Piérard C (2018) Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice. *Toxicology Letters* 293:73-76 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.889>
191. Johnson AR, Johnson CM, Stoll DR, Vitha MF (2012) Identifying orthogonal and similar reversed phase liquid chromatography stationary phases using the system selectivity cube and the hydrophobic subtraction model. *Journal of Chromatography A* 1249:62-82 . <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.049>
192. Sawyer TW, McNeely K, Louis K, Lecavalier P, Song Y, Villanueva M, Clewley R (2017) Comparative toxicity of mono- and bifunctional alkylating homologues of sulphur mustard in human skin keratinocytes. *Toxicology* 382:36-46 . <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.03.005>
193. Vijayaraghavan R, Kulkarni A, Pant SC, Kumar P, Lakshmana Rao PV, Gupta N, Gautam A, Ganesan K (2005) Differential toxicity of sulfur mustard administered through percutaneous, subcutaneous, and oral routes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202:180-188 . <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.020>

194. Gautam A, Vijayaraghavan R, Sharma M, Ganesan K (2006) Comparative Toxicity Studies Of Sulfur Mustard (2,2'-Dichloro Diethyl Sulfide) And Monofunctional Sulfur Mustard (2-Chloroethyl Ethyl Sulfide), Administered Through Various Routes In Mice. *Journal of Medical Chemical, Biological and Radiological Defense* 4:
195. Anslow W, Karnofsky D, Jager B, Smith H (1948) The intravenous, subcutaneous and cutaneous toxicity of bis(beta-chloroethyl) sulfide (mustard gas) and of various derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 93:1-9
196. Acharya M, Lau-Cam CA (2012) Simple Reversed-Phase HPLC Method with Spectrophotometric Detection for Measuring Acetaminophen-Protein Adducts in Rat Liver Samples. *The Scientific World Journal* 2012:1-6 . <https://doi.org/10.1100/2012/145651>
197. Zhang J, Chan C-K, Ham Y-H, Chan W (2020) Identifying Cysteine, N -Acetylcysteine, and Glutathione Conjugates as Novel Metabolites of Aristolochic Acid I: Emergence of a New Detoxification Pathway. *Chem Res Toxicol* 33:1374-1381 . <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00488>
198. Panuwet P, Nguyen JV, Kuklenyik P, Udunka SO, Needham LL, Barr DB (2008) Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 391:1931-1939 . <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2102-0>
199. Chiang W-C, Chen C-Y, Lee T-C, Lee H-L, Lin Y-W (2015) Fast and simple screening for the simultaneous analysis of seven metabolites derived from five volatile organic compounds in human urine using on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 132:469-478 . <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.029>
200. Sasabe T, Maeda S, Kishida K, Yamano M, Miwa Y, Sugiyama T (2017) The Metabolism of Methazolamide in Immortalized Human Keratinocytes, HaCaT Cells. *DML* 10:295-305 . <https://doi.org/10.2174/1872312811666170127160931>
201. Janobi AAA, Mithen RF, Gasper AV, Shaw PN, Middleton RJ, Ortori CA, Barrett DA (2006) Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 844:223-234 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.007>
202. Verbraecken J, Van de Heyning P, De Backer W, Van Gaal L (2006) Body surface area in normal-weight, overweight, and obese adults. A comparison study. *Metabolism* 55:515-524 . <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.11.004>
203. van Eijl S, Zhu Z, Cupitt J, Gierula M, Götz C, Fritsche E, Edwards RJ (2012) Elucidation of Xenobiotic Metabolism Pathways in Human Skin and Human Skin Models by Proteomic Profiling. *PLoS ONE* 7:e41721 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041721>
204. Chilcott RP, Jenner J, Carrick W, Hotchkiss SAM, Rice P (2000) Human skin absorption of bis-2-(chloroethyl)sulphide (sulphur mustard) in vitro. *Journal of Applied Toxicology* 20:349-355
205. Blacker K, Olson E, Vessey D, Boyer T (1991) Characterization of glutathione S-transferase in cultured human keratinocytes. *The journal of investigative dermatology* 97:
206. Raza H, Awasthi YC, Zaim MT, Eckert RL, Mukhtar H (1990) Glutathione S-Transferases in human and rodent skin: multiple forms and species-specific expression. *Journal of Investigative Dermatology*

207. Götz C, Pfeiffer R, Tigges J, Ruwiedel K, Hübenthal U, Merk HF, Krutmann J, Edwards RJ, Abel J, Pease C, Goebel C, Hewitt N, Fritsche E (2012) Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D-epidermis model and keratinocyte-based cell culture as in vitro alternatives for chemical testing: phase II enzymes: Phase II xenobiotic metabolism in human skin and in vitro skin models. *Experimental Dermatology* 21:364–369 .
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01478.x>
208. Hanigan MH (1998) k-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 111–112:333–342
209. Spencer JPE, Kuhnle GGC, Williams RJ, Rice-Evans C (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochemical Journal* 372:173–181 .
<https://doi.org/10.1042/bj20021972>
210. Li C, Zhang W-J, Choi J, Frei B (2016) Quercetin affects glutathione levels and redox ratio in human aortic endothelial cells not through oxidation but formation and cellular export of quercetin-glutathione conjugates and upregulation of glutamate-cysteine ligase. *Redox Biology* 9:220–228 .
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.012>
211. Falletti O, Cadet J, Favier A, Douki T (2007) Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells. *Free Radical Biology and Medicine* 42:1258–1269 .
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.024>
212. Boots AW, Balk JM, Bast A, Haenen GRMM (2005) The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spreads oxidized quercetin-induced toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338:923–929 .
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.031>
213. Kassahun K, Davis M, Hu P, Martin B, Baillie T (1997) Biotransformation of the Naturally Occurring Isothiocyanate Sulforaphane in the Rat: Identification of Phase I Metabolites and Glutathione Conjugates. *Chem Res Toxicol* 10:1228–1233 .
<https://doi.org/10.1021/tx970080t>
214. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry* 390: .
<https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>
215. Gonçalves-Dias, Morello, Semedo, Correia, Coelho, Monteiro, Antunes, Pereira (2019) The mercapturomic profile of health and non-communicable diseases. *High-Throughput* 8:10 .
<https://doi.org/10.3390/ht8020010>
216. Temellini A, Castiglioni M, Giuliani L, Mussi A, Giulianotti P, Pietrabissa A, Angeletti C, Mosca F, Pacifici G (1995) Glutathione conjugation with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) - Interindividual variability in human liver, lung, kidney and intestine. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 33:498–503
217. Manandhar E, Pay A, Veress LA, Logue BA (2018) Rapid analysis of sulfur mustard oxide in plasma using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry for diagnosis of sulfur mustard exposure. *Journal of Chromatography A* 1572:106–111 .
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.035>
218. Banerjee R (2012) Redox outside the Box: Linking Extracellular Redox Remodeling with Intracellular Redox Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 287:4397–4402 .
<https://doi.org/10.1074/jbc.R111.287995>
219. Lee SK, Lee DJ, Yoo HH, Kim JH, Seo YM, Shin S, Choi JH, Jeon TW, Kang MJ, Jeong TC (2008) Identification of glutathione conjugates of 1-bromopentane and its hepatotoxicity in female BALB/c mice. *Arch Pharm Res* 31:1317–1323 .
<https://doi.org/10.1007/s12272-001-2112-3>

220. David A, Chaker J, Léger T, Al-Salhi R, Dalgaard MD, Styrisshave B, Bury D, Koch HM, Jégou B, Kristensen DM (2021) Acetaminophen metabolism revisited using non-targeted analyses: Implications for human biomonitoring. *Environment International* 149:106388 . <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106388>
221. Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Inase JL, Dahlberg ET, Wheeler CR, Korte DW (1989) Response of mouse brain to a single subcutaneous injection of the monofunctional sulfur mustard, butyl 2-chloroethyl sulfide (BCS). *Toxicology* 58:11–20 . [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(89\)90100-5](https://doi.org/10.1016/0300-483X(89)90100-5)
222. Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1995) Metabolism of 5-(Glutathion-S-yl)-.alpha.-methyldopamine following Intracerebroventricular Administration to Male Sprague-Dawley Rats. *Chem Res Toxicol* 8:634–641 . <https://doi.org/10.1021/tx00047a002>
223. Weissbach H, Redfield B, Axelrod J (1961) The enzymic acetylation of serotonin and other naturally occurring amines. *Biochimica Biophysica Acta* 190–192
224. Yang H-YT, Neff NH (1976) Brain N-acetyltransferase: Substrate specificity, distribution and comparison with enzyme activity from other tissues. *Neuropharmacology* 15:561–564 . [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(76\)90108-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(76)90108-8)
225. Sidell KR, Montine KS, Picklo MJ, Olsen SJ, Amarnath V, Montine TJ (2003) Mercapturate Metabolism of 4-Hydroxy-2-Nonenal in Rat and Human Cerebrum. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:146–153 . <https://doi.org/10.1093/jnen/62.2.146>
226. Batal M, Boudry I, Mouret S, Cléry-Barraud C, Wartelle J, Bérard I, Douki T (2014) DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicology and Applied Pharmacology* 278:39–44 . <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.003>
227. Yishai Aviram L, Magen M, Chapman S, Neufeld Cohen A, Lazar S, Dagan S (2018) Dry Blood Spot sample collection for post-exposure monitoring of chemical warfare agents – In vivo determination of phosphonic acids using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 1093–1094:60–65 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.035>
228. Yishai Aviram L, Loewenthal D, Weissberg A, Marder D, Gura S, Chapman S, Gez R, Lazar S, Dagan S (2020) Determination of free G-type nerve agents in blood: in situ derivatization on a dried blood spot (DBS) paper followed by LC-MS/MS analysis. *Forensic Toxicol* 38:327–339 . <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00516-8>
229. Ravanat J-L, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, Lasserre L, Saint-Pierre C, Favier A, Cadet J (2002) Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 23:1911–1918 . <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1911>
230. Malik D, Rhoades S, Weljie AM (2018) Extraction and Analysis of Pan-metabolome Polar Metabolites by Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *BIO-PROTOCOL* 8: . <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2715>

Annexes

Annexe 1 : Publication acceptée sur les résultats des traitements des HaCaT et des explants de peau humaine.



Glutathione conjugates of the mercapturic acid pathway and guanine adduct as biomarkers of exposure to CEES, a sulfur mustard analog

Marie Roser¹ · David Béal¹ · Camille Eldin¹ · Leslie Gudimard¹ · Fanny Caffin² · Fanny Gros-Désormeaux² · Daniel Léonço³ · François Fenaille³ · Christophe Junot³ · Christophe Piérard² · Thierry Douki¹

Received: 13 July 2020 / Revised: 23 October 2020 / Accepted: 25 November 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Sulfur mustard (SM), a chemical warfare agent, is a strong alkylating compound that readily reacts with numerous biomolecules. The goal of the present work was to define and validate new biomarkers of exposure to SM that could be easily accessible in urine or plasma. Because investigations using SM are prohibited by the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, we worked with 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES), a monofunctional analog of SM. We developed an ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) approach to the conjugate of CEES to glutathione and two of its metabolites: the cysteine and the *N*-acetylcysteine conjugates. The N7-guanine adduct of CEES (N7Gua-CEES) was also targeted. After synthesizing the specific biomarkers, a solid-phase extraction protocol and a UHPLC-MS/MS method with isotopic dilution were optimized. We were able to quantify N7Gua-CEES in the DNA of HaCaT keratinocytes and of explants of human skin exposed to CEES. N7Gua-CEES was also detected in the culture medium of these two models, together with the glutathione and the cysteine conjugates. In contrast, the *N*-acetylcysteine conjugate was not detected. The method was then applied to plasma from mice cutaneously exposed to CEES. All four markers could be detected. Our present results thus validate both the analytical technique and the biological relevance of new, easily quantifiable biomarkers of exposure to CEES. Because CEES behaves very similar to SM, the results are promising for application to this toxic of interest.

Keywords 2-Chloroethyl ethyl sulfide · DNA adducts · Glutathione adducts · Skin models · Plasma · Biomarkers

Introduction

Sulfur mustard (SM) was first used as a chemical warfare agent during World War I [1] and on other battlefields since then. SM was even used in recent conflicts in the Middle East, although the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) prohibits the synthesis of chemical warfare agents and restricts their use for protection and peaceful

research. In addition to these military concerns, SM is also a threat for civilians. Many SM-containing ammunition may be found buried or abandoned at former defense sites. Large amounts of SM have also been disposed at the bottom of the sea. More importantly, SM is thought to be a persistent threat by non-state actors, such as terrorist groups, because of its easy synthesis and handling, and the risk of theft from stockpiles [2].

The severity of SM-induced complications mainly depends on dose, duration, and body part of the exposure [3, 4]. SM contamination may cause adverse health effects in many organs especially the skin, eyes, and respiratory system [3, 4]. The first symptoms, including ocular, dermal, and respiratory damage, usually become evident only approximately 12 h after exposure [5]. SM is classified as a vesicant because it causes blistering of the skin as a major feature of its toxic effects observed shortly after exposure. SM also exhibits long-term effects. Local effects of SM exposure may include scarring of the skin and bronchial stenosis [6]. Other long-

✉ Thierry Douki
thierry.douki@cea.fr

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, 38000 Grenoble, France

² Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), 91223 Brétigny-sur-Orge, France

³ Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), MetaboHUB, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France

term effects may appear some months or years after the exposure and have a serious impact on the life quality of the exposed individuals [7]. SM is also a known carcinogen [8, 9]. Unfortunately, there is no antidote available for preventing the effects of SM and no specific therapy for the treatment of SM-induced lesions. The aim of current therapeutic strategies is to relieve symptoms, prevent infections, and promote healing.

Some cellular and molecular processes have been identified that partially explain the toxicological effects of SM, but the overall exact mechanism remains unclear [10]. It should be stressed that because synthesis, use, and storage of SM are strongly regulated by the OPCW, a large fraction of the available data have been obtained with the analog of SM, 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES), a monofunctional molecule bearing one chlorine atom instead of two. SM and CEES induce similar severe burns on skin in animals. They are both strong alkylating agents, mostly because they undergo intramolecular cyclization into episulfonium ions. These electrophilic species can readily react with water and nucleophilic sites present in cellular macromolecules such as glutathione, DNA, and proteins (Fig. 1). Most products of these reactions are stable adducts or conjugates which can affect the normal functions of macromolecules, such as the enzymes involved in cell energetic metabolism. Some metabolites are excreted in urine, feces, and blood [11, 12]. These SM-specific derivatives can be easily accessible targets in biological fluids and used as specific biomarkers. Actually, detection of such analytes in urine or blood is necessary for many reasons such as in forensic science for providing evidence of contamination or in therapeutics for diagnostic and prognostic purposes.

A first proposed approach for biomonitoring of exposure to SM involved quantification of the direct oxidation product of

SM, bis-chloroethyl sulfoxide (SMO). Rapid, simple, and quantitative analytical methods were developed for this early SM biomarker present in blood for a rapid diagnostic during the asymptomatic latency period (less than 12 h) [13, 14]. The directly hydrolyzed metabolite thiodiglycol (TDG) was detected in urine from SM-treated rats for 48 h [15]. Under its bound and its oxidized forms, it was present up to 7 day in the blood and urine of the animals. In another study, TDG and thiodiglycol sulfoxide (TDGO) were detected in the plasma of SM-exposed rats, and the time windows for quantitative detection were 4 h and 12 h, respectively [16]. Interestingly, similar results have been obtained in human patients [17]. Much debate has concerned the validity of TDG and TDGO as biomarkers because both can be detected at trace levels in unexposed human populations [11].

The second type of SM biomarkers involved products of its reaction with various amino acid residues present in proteins, including the 2-(2-hydroxyethyl)-thioethyl-valine adduct of hemoglobin and 2-(2-hydroxyethyl)-thioethyl-cysteine adduct of albumin. They can be detected in appropriate samples such as blood, serum, plasma, or urine [17, 18]. In recent years, studies were more focused on albumin adducts [18–20]. The time-course studies in rats showed that the hemoglobin adduct is far more persistent than the albumin adduct. A study showed that the adduct to the N-terminal valine in hemoglobin was still present 28 days after exposure [21]. This long persistence makes this conjugate relevant for a retrospective detection. However, the sample preparation requires a time-consuming digestion step for the selective cleavage of the adduct from the protein.

Another major pathway in the toxicity of SM is its reaction on the critical nucleophilic sites of DNA to produce SM-DNA

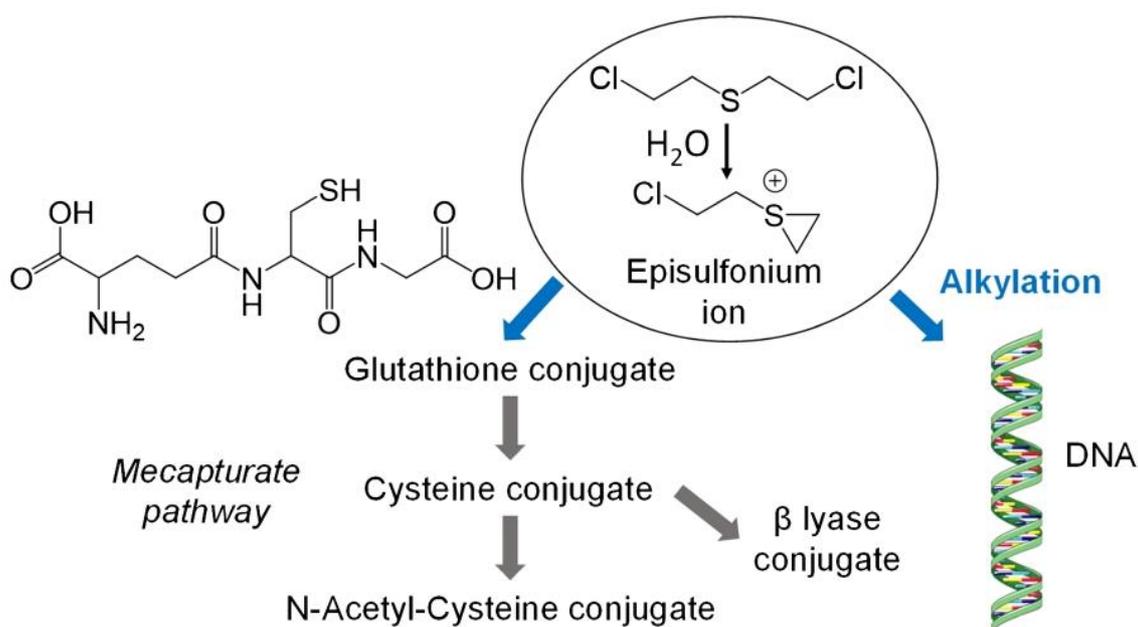


Fig. 1 Reactivity of sulfur mustard with biomolecules

adducts (Fig. 1). To date, four major types of DNA adducts have been reported. These include the mono-alkylated base adducts 2-(2-hydroxyethyl)-thioethyl-N7-guanine (N7Gua-HETE), 2-(2-hydroxyethyl)-thioethyl-N3-adenine (N3Ade-HETE), the SM-guanine-guanine biadduct, and an adduct involving both glutathione and guanine [22–25]. Formation of these adducts was extensively studied within DNA extracted from skin and internal organs after exposure [26–30]. DNA adducts appear to be valuable biomarkers since they are persistent, especially the N7Gua derivative which is the most abundant and still detected 3 weeks after exposure of hairless mice [27]. This was confirmed by the unambiguous detection of adducts in the DNA extracted from blood cells from exposed patients [17]. DNA adducts were also detected for several days in urine under the form of modified bases following spontaneous depurination or release by DNA repair systems [17, 31].

A last class of reaction products of biomolecules with SM that can be used as biomarkers results from the conjugation of SM to glutathione (GSH), an abundant cellular tripeptide. GSH plays a major role in the chemical inactivation of reactive electrophilic toxicants or metabolites either spontaneously or by catalysis by glutathione *S*-transferases in the liver and in other organs such as the skin [32, 33]. The product is a glutathione-*S*-SM-conjugate (GSH-SM). In the complex pathway of glutathione metabolism [34], GSH-SM is consecutively converted into the cysteinyl-glycine-*S*-conjugate, the cysteine-*S*-conjugate, and *N*-acetylcysteine-*S*-conjugate (NAC-SM) (Fig. 1). This last metabolite, also known as mercapturate derivative, is generally more polar and water soluble than the unconjugated electrophiles. It is thus readily excreted and eliminated in urine and/or bile [35, 36]. In terms of GSH-derived biomarkers, available data mostly involved the detection of glutathione-SM metabolites arising from β -lyase cleavage, leading to the formation of SBSNAE, SBMTE, and SBMSE [16, 17, 37]. These metabolites are only detected for a few days in patients, and not in all of them [17, 38]. Surprisingly, other metabolites of the mercapturic acid pathway such as NAC-SM have not been used as biomarkers while they are commonly detected in biological fluids following exposure to other toxic compounds [39–42]. Data have been reported that show a larger amount of L-cysteine (Cys) conjugates in the bile than derivatives of the β -lyase pathway [43], strongly suggesting the formation of other GSH-SM metabolites such as the *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) conjugate.

This brief overview of the available biomarkers of exposure to SM shows that none is perfect, in terms of either specificity, persistence, or analytical throughput. Moreover, proof of exposure is more reliable with a combination of information based on different biomarkers. There is thus room for additional biomarkers. To this end, we decided to explore the possibility of using the conjugates of the mercapturate pathway with CEES as a SM analog. As explained above,

CEES was chosen because the use of SM is strictly limited. We felt necessary to first develop our approach with an analog and then, based on this first work, rapidly extend the method to SM. Our aim was to quantify conjugates between CEES and GSH, cysteine, and *N*-acetylcysteine (GSH-CEES, Cys-CEES, and NAC-CEES, respectively) (Fig. 2). The chemical structure of these compounds have been established for SM in previous works [44, 45]. We also included the DNA adduct (2-ethyl)-thioethyl-N7Gua (N7Gua-CEES) to our selected biomarkers since promising results have been obtained with the similar SM-derivative. We first synthesized the standards and their isotopically labeled analogs and developed an ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) approach with isotopic dilution. Then, the cleanup step of the samples was optimized. Finally, we evaluated the biological relevance of these biomarkers in cultured cells, human skin explants, and blood plasma from mice.

Materials and methods

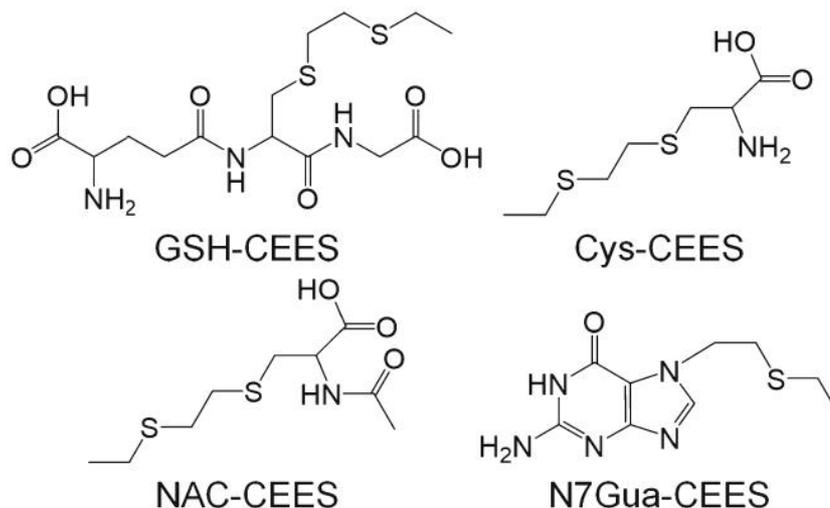
Chemicals and enzymes

Reduced L-glutathione (GSH), CEES, and Cys were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). NAC was purchased from Roche (Boehringer Mannheim) (Mannheim, Germany). 2'-Deoxyguanosine (dGuo) was purchased from Pharma Waldhof (Düsseldorf, Germany). Formic acid (LC-MS grade) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), acetonitrile (HPLC-MS grade) from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), methanol (HPLC grade) and ammonium formate from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Ribonuclease T1, ribonuclease A, phosphodiesterase II, deoxyribonuclease II, alkaline phosphatase, and nuclease P1 were obtained from Sigma. Protease was purchased from Qiagen and phosphodiesterase I from Worthington (Lakewood, NJ, USA). Isotopically labeled molecules Cys* ($^{13}\text{C}_3$ 99%, ^{15}N 99%), NAC* ($^{13}\text{C}_3$ 97–99%, ^{15}N 97–99%), GSH* ($^{13}\text{C}_2$ 98%, ^{15}N 96–99%), and dGuo* ($^{15}\text{N}_5$ 98%) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA).

Synthesis of biomarkers

Aqueous solutions of either 10.8 mg of Cys, 10.9 mg of NAC, 10 mg of dGuo, or 10.4 mg of GSH were prepared in 5 mL of phosphate buffer (10 mM, pH = 7). Five microliters of CEES (2.9 mM) was added to each tube. The reaction lasted overnight. Several washing steps with dichloromethane were carried out to eliminate possible traces of CEES. Depurination of N7Gua-CEES adducts was completed by thermal hydrolysis

Fig. 2 The structures of the targeted CEES biomarkers



(90 °C for 20 min in a heating block) at neutral pH as previously reported [46]. All biomarkers were isolated by using a preparative HPLC system consisting of a L7100 pump from Merck Hitachi, a 7125 injector valve from Rheodyne (San Jose, USA), a C18 reverse phase column (4.0 mm × 250 mm, 5 μm particle size, Uptisphere, Interchim, Montluçon, France), and a L4200 UV-vis detector from Merck (Darmstadt, Germany). A gradient of ammonium formate (AmF, 5 mM) and acetonitrile (0 min, 0% ACN; 10 min, 5% ACN; 30 min, 20% ACN; 45 min, 30% ACN) at a flow rate of 1 mL/min was used. Fractions of 2 mL were collected from which 20 μL was analyzed by UHPLC-MS/MS. The fractions of interest were pooled and further purified on the HPLC system until a pure product, as inferred from HPLC profiles recorded at 220 nm, was obtained. The final solutions were freeze-dried and suspended in Milli-Q water. N7Gua-CEES adduct was identified by comparison with a previously synthesized product [46]. GSH, NAC, and Cys conjugates were also characterized by ¹H-NMR in D₂O. The concentration of each standard was determined by UHPLC-MS¹ used in the single ion monitoring mode. For each conjugate, the reference compound was the parent molecule expected to exhibit the same ionization efficiency. Results were confirmed by analysis in UHPLC with diode array detector. For N7Gua, calibration was also performed by UV absorption of the standard solution using the molar absorption coefficient of N7-methyl guanine for the calculation.

Synthesis of internal standards

Solutions of 10 mM of each labeled biomolecules (either Cys*, NAC*, GSH*, or dGuo*) were prepared in 1/10 PBS. CEES (20 μL) was added to 5 mg of the labeled compounds, namely either 4 mL of Cys*, 1.61 mL of GSH*, 1.72 mL of dGuo*, or 3 mL of NAC*. The reaction lasted overnight.

Several washing steps with dichloromethane were carried out to eliminate possible traces of CEES. All biomarkers were isolated by using solid-phase extraction (SPE) (see “Sample preparation: SPE of biomarkers from culture medium and plasma”). One-milliliter fractions containing an increasing proportion of methanol were collected, and 20 μL of each fraction was analyzed by UHPLC-MS/MS. The fractions of interest were pooled. The final solutions were freeze-dried and suspended in Milli-Q water. The concentration of each internal standard was determined by UHPLC-MS/MS calibrated with unlabeled compounds.

Sample preparation: SPE of biomarkers from culture medium and plasma

Prior to SPE purification, all samples were centrifuged at 5000×g and the liquid phase was collected. Sample preparation, i.e., cleanup and concentration, was performed on Chromabond®HR-X 100 (45 μm particle size, 100 mg polymeric phase) SPE columns using a vacuum manifold. Columns were conditioned with 1 mL of methanol containing 0.1% formic acid (FAc), followed by elution of 0.1% FAc in water (1 mL). The samples to be analyzed (500 μL of culture medium or 100 μL of plasma) were spiked with internal standards (10 μL, 0.2 mM) and loaded onto the SPE column. The sample was washed with 0.1% FAc in water (1 mL) followed by 5% methanol containing 0.1% FAc (1 mL). All traces of washing solution was removed from the column by suction for 10 min under vacuum. In the final step, the analytes of interest were eluted into a hemolysis tube with 1 mL of a buffer prepared by dilution of 200 μL of a 10 M AmF into 200 mL pure methanol. The eluent was dried in a SpeedVac at 35 °C. The samples were reconstituted in water (200 μL) and stored at –20 °C until UHPLC-MS/MS analysis.

UHPLC separations

Chromatographic separations were carried out on a Sciex ExionLC UHPLC system (Framingham, MA, USA) equipped with an autosampler, a binary pump, and a heated column compartment. Analytical separation was performed using a Macherey-Nagel Nucleodur[®] C18 column (100 mm × 2.0 mm ID, 1.8 μm particle size). Mobile phase A consisted of 2 mM AmF and 0.2% FAc in Milli-Q water, and mobile phase B was LC/MS grade acetonitrile.

For analysis of N7Gua-CEES in DNA, the initial conditions of the gradient were 2% B for 5 min with the flow rate was set to 350 μL/min. The column temperature was maintained at 40 °C, and the sample storage compartment was set to 15 °C. The proportion of acetonitrile increased to 8% between 5 and 8 min, followed by a deeper linear increase to 40% between 8 and 11.5 min and an immediate ramp to 95% for 1 min followed by a return back to initial conditions at 12.6 min. An equilibration phase was maintained until 15 min. The amount of normal DNA nucleosides was quantified by a UV detector. Quantification of DNA lesions and normal nucleosides were performed by external calibration using calibrated solutions of authentic standards. Results were expressed as the number of adduct per million normal bases.

For the quantification of biomarkers in the culture medium, the initial conditions of the gradient were 5% B for 1.2 min. The flow rate was set to 400 μL/min, the column temperature was maintained at 50 °C, and the temperature of the sample storage compartment was set to 15 °C. A linear increase of the solvent to 35% was applied between 1.2 and 7.2 min, followed by a ramp to 70% B for 1 min and then by a return back to initial conditions at 8.4 until 11 min. Quantitative results were obtained using internal standards. Indeed, the response of the analyte is normalized to the response of the internal standards (IS). The ratio of the peak area of the analyte in the sample to the peak area of the IS in the sample is compared to a similar ratio derived for each calibration standard.

Mass spectrometry detection

The UHPLC system was coupled to a SCIEX QTRAP[®] 6500+ triple quadrupole mass spectrometer (Framingham, MA, USA) equipped with an IonDrive[™] Turbo V source operated in positive ionization mode. Data were collected in multiple reaction monitoring (MRM) scan mode. Transitions corresponding to the three most intense fragments were used as confirmation ions, and the most sensitive one among those was used for quantification. Three MRM transitions were recorded for each of the isotopically labeled compounds corresponding to the transitions of their native analogs (Electronic Supplementary Material, Table S1). The following optimized ionization parameters were applied for all analytes: curtain gas (45 psi), collision gas (70 psi), IonSpray voltage (5300 V), temperature (550 °C), Ion Source

Gas 1 (60 psi), and Ion Source Gas 2 (60 psi). Other compound-dependent parameters are listed in Table S1. Data acquisition and quantitative analyses were performed using the Analyst and MultiQuant software programs, respectively.

Treatment of HaCaT human keratinocyte cell line

HaCaT human keratinocytes (Thermo Fisher Scientific) were grown in DMEM-GlutaMAX[™] (Gibco) medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Gibco) and 1% (v/v) of a mixture of antibiotics (50 U/mL of penicillin and 50 mg/mL of streptomycin). Cells, seeded at 14,300/cm² in 60-mm diameter petri dishes, were grown in a Hera Cell incubator (Heraeus) in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Treatments were performed in triplicate for each CEES concentration (0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, and 10 mM). Before treatment, the medium was discarded. Then, cells were suspended for 30 min at room temperature in 3 mL DPBS (Gibco) containing the different CEES concentrations. Subsequently, they were washed twice with PBS to remove traces of CEES. Cells were thereafter incubated for 6 h at 37 °C with *fresh* medium. Last, the medium was collected and stored at −20 °C before purification by solid-phase extraction. The cells were collected by trypsinization. After deactivation of trypsin by the addition of medium, the cells were centrifuged (1500 rpm, 5 min) in a Megafuge 1.0R centrifuge (Heraeus) and the supernatant was discarded. The pellet was suspended in 1 mL PBS and placed in a 2-mL Eppendorf tube. Samples were centrifuged (400×g, 5 min), and the supernatant was discarded. The HaCaT pellets were stored at −20 °C before DNA extraction.

DNA extraction from CEES-treated HaCaT was carried out following the NaI/propan-2-ol chaotropic method [47]. Briefly, plasmic membranes were lysed by adding a buffer (sucrose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, deferoxamine 0.1 mM) containing 1% (v/v) Triton X-100. The nuclei were collected by centrifugation in a Megafuge 40R centrifuge (Heraeus) (5 min at 1500×g). Then, the nuclear membranes were lysed by adding a second buffer (EDTA-Na₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, deferoxamine 0.15 mM) containing 0.5% (v/v) SDS. RNA was hydrolyzed using RNases A (1.5 μL, 100 mg/mL) and T1 (3.5 μL, 1 U/μL) at 37 °C for 15 min. Samples were then incubated at 37 °C for 1 h after the addition of protease. DNA was precipitated with 2 volumes of buffered NaI solution (EDTA-Na₂ 20 mM, NaI 7.6 M, Tris-HCl 40 mM, deferoxamine 0.3 mM) and 3.3 volumes of absolute propan-2-ol. The DNA pellet was then washed by successive centrifugation and resuspension, using first aqueous propan-2-ol (40%, v/v) and then aqueous ethanol (70%, v/v).

DNA was hydrolyzed as previously described by Douki et al. [48] in two steps. Each involved a specific enzymatic cocktail: nuclease P1, phosphodiesterase II, and DNase II at pH 6 (50 mM succinic acid, 25 mM CaCl₂, 75 mM ammonium acetate) for the first step and phosphodiesterase I and alkaline phosphatase at

pH 8 (50 mM tris) for the second step. Each step was carried out at 37 °C for 2 h. The samples were then left at 90 °C for 20 min in a heating block in order to depurinate DNA adducts. The final samples thus contain normal DNA bases under the form of nucleosides, which are quantified by a UV detector placed before the inlet of the mass spectrometer, and adducts as modified bases quantified by mass spectrometry.

Treatment of skin explants

Human skins were obtained immediately after breast plastic surgery from healthy donors with their informed consent (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France), in agreement with article L1245 2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes. Declaration of collection and storage of human skin was recorded in the CODECOH DC-2019-3391 document, which was validated by the French Ministry of Research (June 17, 2019). All donors were Caucasian (16–62 year old), and their skin phototype was either II or III according to the Fitzpatrick classification. After surgery, the skin was immediately transported to the laboratory at ambient temperature in 50-mL falcon tubes (Becton Dickinson Labware, USA). Skin was disinfected with PBS supplemented with 0.4% Betadine for 15 min and rinsed twice with PBS containing 10% Pen/Strep. The skin, from which the fat layer was removed but that still contained both the dermis and the epidermis, was cut into 12-mm-diameter discs with sterile punches (Help Medical, France). Skin biopsies were placed with the dermal side down into ThinCert™ inserts (14-mm-inner diameter, 1- μ m-pore size filter; Greiner Bio-One, Austria) maintained in 12-well cell culture plates (sterile, with lid) (Greiner Bio-One, Austria). Medium (600 μ L) was added into the wells, under the inserts. The culture medium used was DMEM-F12 supplement with 1% Pen/Strep. Four doses of CEES (0 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 10 mg/mL) in solution in 5 μ L of dichloromethane were applied to the epidermal surface, corresponding to 0 μ mol, 0.08 μ mol, 0.16 μ mol, and 0.40 μ mol, respectively. Dichloromethane evaporation was permitted by waiting 30 s, and then the lid was replaced. Afterwards, skin biopsies were placed at 37 °C in 5% CO₂ air in the incubator for three different time points (1 h, 6 h, and 24 h). Collected medium from samples was directly stored at –20 °C until SPE. Biopsies were also frozen at –20 °C until DNA extraction. Experiments were performed in triplicates and were repeated on skins from two different donors.

DNA was extracted by using the DNeasy Tissue Kit obtained from Qiagen (Courtaboeuf, France). Briefly, the first step was the grinding of the biopsy in buffer ATL (350 μ L) by using a TissueLyser (15 min, 25 Hz). After adding proteinase K, samples were incubated 3 h at 55 °C. An RNase A treatment and a second lysis step involving buffer AL were performed (10 min at 70 °C) for a complete lysis of the tissue.

Lysate samples were then loaded onto DNeasy mini spin columns. After two washing steps, DNA was eluted with 2 \times 100 μ L of deionized water. The sample was freeze-dried overnight, and the resulting DNA residue was dissolved in 50 μ L of water. DNA was hydrolyzed as described for DNA extracted from HaCaT cells.

Animal experiment

The protocol was validated by the ethic committee of health services of French Armed Forces, according to the French 2013-118 decree that follows the 2010/63 directive from the EU on animal research. SKH-1 hairless mice ($n = 5$) were purchased from Charles River and used at 7 weeks. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Under a fume hood, mice were then locally exposed through the skin to the vapors emitted by 10 μ L of neat CEES using cap method (screw cap for HPLC vial, PTFE septum, and polypropylene cap). Four sites on the mice back were exposed to CEES vapors (Electronic Supplementary Material, Fig. S1). The caps containing CEES were removed after 30 min. After 4 h, the skin was decontaminated by soap and water. To relieve pain induced by CEES, buprenorphine (0.05 mg/kg) was subcutaneously injected after skin decontamination and codeine was daily administrated in drinking water (4 mg/100 mL). One day after the exposure, the animals were sacrificed by an injection of pentobarbital (150 mg/kg, i.p. route) and the blood was collected by heart puncture. Plasma was separated by centrifugation (2000 g, 10 min, 4 °C), and samples were kept frozen until quantification of biomarkers. For this purpose, an aliquot fraction of 100 μ L was collected from each sample. The SPE and UHPLC-MS/MS conditions were the same as those applied to cell culture and explant medium.

Results and discussion

Method optimization

Characterization of the standard molecules

The standards used for the method optimization and the quantitative analysis of the samples were synthesized by incubation of the parent compound with CEES followed by HPLC purification. The material present in the collected fractions was then characterized. ¹H-NMR spectra were recorded for the GSH, Cys, and NAC conjugates. They exhibited all the expected signals for the analytes (Electronic Supplementary Material, Table S2), thereby providing evidence that all expected compounds had been successfully synthesized. Signals corresponding to traces of impurities were detected for Cys-

CEES and NAC-CEES. However, the purity of these standards was satisfactory, reaching 95% and 83%, respectively. ¹H-NMR analysis showed that GSH-CEES was the major product in the standard solution but that other minor compounds were present. The solution was thus analyzed in HPLC-MS with recording of the full MS1 spectrum over the 200–450 m/z range. Compounds exhibiting a pseudo-molecular ion at m/z = 371, 415, 245, and 261 were observed in addition to GSH-CEES (m/z 396). The latter compound was the most concentrated, in agreement with the NMR data. The concentration of the second next product was half of that of GSH-CEES, while the proportion of the other impurities was below 10%. Since the molecular weight of the contaminants was different from that of GSH-CEES, no interference was possible in the MS¹ single ion monitoring used for the calibration of the solutions. No impact was expected either in the MRM detection mode used for the samples, as confirmed by the observation that GSH-CEES was the only compound detected in the product ion scan mode (MS² fragmentation). We did not attempt to purify further the standard of GSH-CEES in order to prevent loss of material. The amount of N7Gua-CEES was too low to allow recording of a NMR spectrum. We are yet confident in the identity of the analyte since all chromatographic, mass spectrometry, and UV absorption features are identical to those for a previous synthesis validated in reference [46]. In particular, the UV absorption spectrum exhibited the typical blue-shifted maximum of N7-alkylated derivative of guanine. This absorption was used to calibrate the obtained solution.

UHPLC-MS/MS quantification

Availability of authentic pure standard in solution allowed us to optimize the parameter of the liquid chromatography-mass spectrometry detection. Standard liquid chromatography conditions were chosen to insure a proper elution of the analytes. UHPLC was favored over HPLC in order to reduce the analysis time and increase the throughput of the method. Standard chromatographic parameters were used, in terms of both column type and gradient. Detection was afforded by a triple quadrupole mass spectrometer used with positive ionization and in the *reaction monitoring mode*. This approach relies on the monitoring of specific fragmentation reactions of the pseudo-molecular ion of targeted analytes. The observed fragmentations (Electronic Supplementary Material, Fig. S2) were mostly observed on the CEES moiety of the analytes with formation of fragments both at m/z = 61 (C₂H₅S) and 89 (C₄H₉S) for all compounds. One exception was GSH-CEES for which the former fragment was replaced for by a more intense one at m/z = 121 (C₄H₉S₂). Fragments at m/z = 321 (loss of CO₂H-CH-NH₂) was observed for GSH-CEES and at m/z = 120 (loss of C₄H₉S) for Cys-CEES. Detection in the

MRM mode is very specific and, because it leads to a low background noise, very sensitive.

Sample preparation

SPE is routinely used in sample preparation for quantifying analytes in biofluids such as plasma and urine. This technique allows both removal of interfering biological matrix components and increase of the concentrations of the analytes in the final samples. Application of this method to organic compounds in solution in water or biofluids requires adsorption on proper solid material followed by desorption with a small quantity of an organic solvent. We tried different sorbents, namely C18 and polymeric phases. The polymeric phase afforded the best recovery with less variability. We also optimized the composition of the liquid phases, mostly the impact of FAC on the different steps of the sample preparation. This acid improves the retention of the analytes on the sorbent. The optimized protocol is described in the “**Materials and methods**” part. For validation purposes, 5 samples of matrix blank (HaCaT culture medium) were spiked with IS and standards (5 pmol) to obtain a concentration in the middle of the calibration curve typically used for the biological experiments (from 0.1 to 50 pmol). The yields of the complete sample preparation, i.e., from the collection to the analysis including SPE, drying step, and sample reconstitution, were 65 ± 5%, 84 ± 3%, 112 ± 4%, and 106 ± 5% for GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES, and N7Gua-CEES, respectively.

It should be emphasized that the stability of the targeted analytes was a major concern during the method’s optimization. For example, formic acid was removed from the SPE elution solvent because it induced some degradation during the evaporation. We also checked the long-term stability of the analytes in the matrices. They were found to be stable in culture medium at –20 °C for at least 6 months, with the exception of Gua-CEES that underwent 50% degradation over this period (data not shown). Last, we investigated whether oxidized derivatives of the analytes could be produced. Previous reports of the detection of oxidation products of SM [13, 14] suggested that it could also take place for CEES biomarkers. Therefore, we analyzed cultured medium from CEES-treated skin explants (vide infra) in the product ion scan mode. This approach provides fragmentation mass spectra and thereby structural information on components of a mixture. Emphasis was placed on the cysteine conjugate, which was the biomarker detected in the largest concentration in this experiment. An intense peak was detected for the fragmentation of the pseudo-molecular ion of Cys-CEES. In contrast, none was observed for masses with one (M + 16) or two (M + 32) oxygen atoms that would correspond to sulfoxides (–SO–) and sulfones (–SO₂–), respectively (Electronic Supplementary Material, Fig. S3).

Method validation

Validation of the method was performed by following the FDA recommendations for bioanalytical method validation [49] and the standard practices for method validation in forensic toxicology [50]. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for each biomarker were established by using the method called “blank determination” according to Shrivastava and Gupta [51]. The blank determination is applied when the blank analysis gives results with a nonzero standard deviation. LOD is expressed as the analyte concentration corresponding to the sample blank value plus 3 standard deviations, and LOQ is the analyte concentration corresponding to the sample blank value spiked with IS plus 10 standard deviations. The values were determined with 18 matrix blank samples (cell culture medium). The calculated LOD for each analyte was 9 fmol, 48 fmol, 46 fmol, and 37 fmol for GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES, and N7Gua-CEES, respectively. The corresponding calculated LOQs were 22 fmol, 111 fmol, 120 fmol, and 88 fmol. This calculation method was found to be reliable since the determined LOD matches with the lowest concentration, leading to an observable peak on the chromatogram. In order to define a proper calibration curve, the lowest concentration we used for the standards was 100 fmol, namely in the range of mean LOQ.

Accuracy and precision were evaluated by analyzing intraday and interday variations for blank, zero calibrator, and six calibrators covering the quantitation range including LOQ (Electronic Supplementary Material, Table S3). The matrix was culture medium from unexposed HaCaT cells. The concentration-response relationship for each analyte was fitted by a simple linear regression forced through zero. Our results are in accordance with the FDA criteria because non-zero calibrators are $\pm 15\%$ of the nominal (theoretical) concentrations and, for the lowest concentration, $\pm 20\%$ of the nominal concentrations in each validation run. The selectivity was also studied. Blank and zero calibrators were free of interference at the retention times of the analytes and the IS. The method was thus found to be highly specific, mostly as the result of the different determination criteria by MRM (ion quantitation and ion ratio). No carryover between samples was observed, even with the highest calibrator. Limited amount of sample from untreated mice prevented us from performing a complete validation in plasma. Yet, we were able to show the good intraday reproducibility (with $n = 4$) on a mixture of several samples from exposed animals (Electronic Supplementary Material, Table S4).

CEES biomarkers in cultured HaCaT cells

Skin is a direct target organ of SM. Therefore, we performed a first *in vitro* biological experiment with a human keratinocyte cell line (HaCaT). Indeed, keratinocyte represents the major

cell type in the epidermis, the upper layer of skin. Both adduct in nuclear DNA and conjugates in the medium were targeted. It was not possible to treat cells under growing conditions because the medium contains amino acids that would lead to false positive detection. Therefore, rather than treating cells for a long time in their culture medium with micromolar concentrations of CEES, we applied millimolar range concentrations in PBS for a very short time. Then, cells were incubated 6 h in fresh culture medium. We studied the toxicity of the treatment by a MTT assay (Fig. 3). The survival at 24 h was approximately $81.5\% \pm 4.6$ for 5 mM. A much larger lethality was observed at 10 mM with $4.3\% \pm 1.0$ of viability at 24 h.

CEES adducts in DNA

During the treatment, CEES enters the cells where it alkylates many biomolecules including DNA. Different DNA adducts can be formed because CEES reacts on the N7-positions of guanine and the N3-position of adenine. We only quantified N7Gua-CEES, which is the most frequent in CEES-treated cells [46]. Another reason for this choice was the fact that the N7Gua adduct is also the most frequent for SM. This was first indirectly shown by Lawley and Brookes [52] in cell-free systems. More recently, Batal et al. [27] determined the kinetics of the formation of SM adducts in skin from mice exposed to SM. The most abundant and persistent adduct was also the HETE-N7Gua, which was produced in a dose-dependent manner [27]. In addition, Zubel et al. [53] investigated the stability of DNA adducts in HaCaT and A549 cells; N7Gua was still detectable 6 days after treatments with SM. In our work on HaCaT cells, the corresponding N7Gua-CEES was detected in DNA under all the investigated conditions,

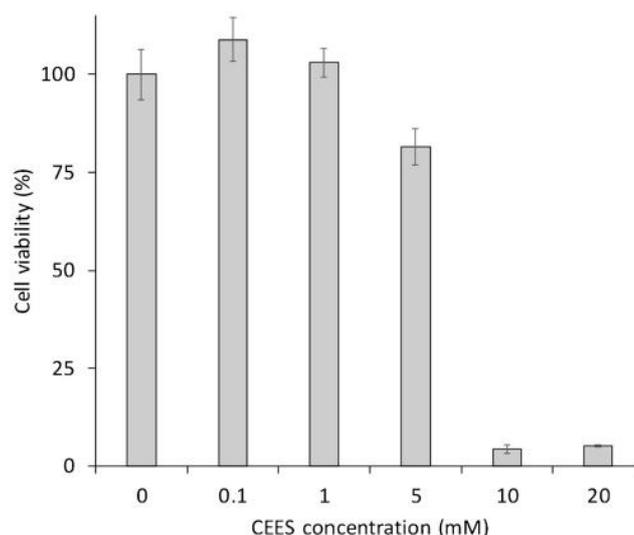


Fig. 3 Survival of HaCaT cells exposed for 30 min to increasing concentrations of CEES, ranging between 0 and 100 mM. Survival was measured by a MTT assay performed 24 h after treatment. Result are mean \pm SEM ($n = 6$)

even at the lowest CEES concentration. Formation of N7Gua-CEES adducts was dose-dependent with a linear increase of the quantity of N7Gua-CEES with respect to the CEES concentration (Fig. 4).

Biomarkers in the medium of HaCaT cells exposed to CEES

The medium collected from the same experiments was analyzed by UHPLC-MS/MS after SPE cleanup. The Cys-CEES and GSH-CEES biomarkers were detectable and quantifiable (Electronic Supplementary Material, Fig. S4). In contrast, NAC-CEES was not detected in this *in vitro* study. The amounts of GSH-CEES and Cys-CEES detected in the medium were dose-dependent (Fig. 5a). At all time points, the concentration in Cys-CEES was larger than that of GSH-CEES. Interestingly, the ratio between the concentrations of Cys-CEES and GSH-CEES varied from one experimental condition to the other. The value is 4.5 at the lowest CEES concentration and decreases to 2 at the largest one. This is reflected in the dose-concentration curves that are roughly linear for Cys-CEES and more quadratic for GSH-CEES. This trend most likely reflects a saturation of the enzymes involved in the metabolism of GSH conjugates when the CEES concentration increased.

N7Gua-CEES was also detectable in the medium, although in approximately 20 times lower amounts than Cys-CEES and GSH-CEES (Fig. 5b). The presence of this nucleic acid derivative can be explained by different mechanisms. First, it is well known that such N7 DNA adducts are chemically unstable and spontaneously undergo depurination, namely the cleavage of the *N*-glycosidic bond [54]. This process leads

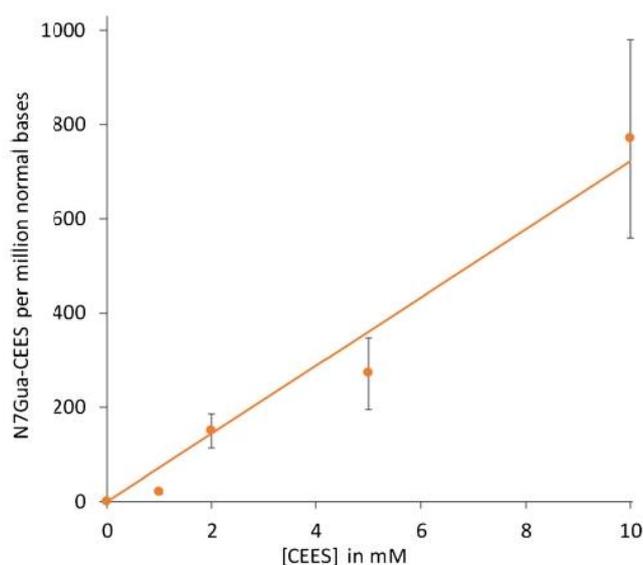


Fig. 4 Formation of N7Gua-CEES in HaCaT cells exposed to CEES concentration ranging between 0 and 10 mM. DNA adducts were quantified by UHPLC-MS/MS ($n = 9$) after DNA extraction and hydrolysis. Results were normalized with respect to the amount of normal bases

to the release of the free alkylated base N7Gua-CEES and the formation of an abasic site in DNA [54, 55]. A similar process takes place in CEES-treated RNA [46] and most likely in dGTP from the nucleotide pool. Other sources of DNA adducts in medium could involve DNA repair. The base excision repair pathway leads the release of damaged bases by cleavage of the *N*-glycosidic linkage. Bulky adducts like N7Gua-CEES are also handled by the nucleotide excision repair system which removes a single-stranded DNA fragment bearing the damage [56], from which N7Gua adducts may depurinate.

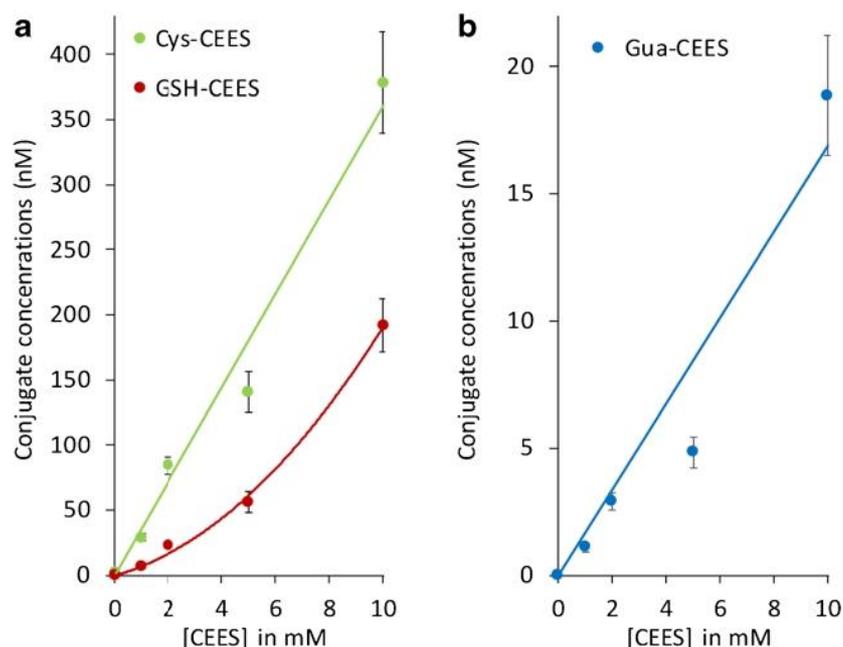
Biomarker of exposure to CEES in human skin explants

The HaCaT cell experiments showed that the biomarkers were actually excreted from cultured cells. In order to better understand the response of cutaneous cells to vesicants, we then used whole skin explants that contained both the epidermis and the dermis. We investigated whether the chosen biomarkers were detected after exposure to different amounts of CEES.

DNA adducts from skin exposed to CEES

Like for HaCaT cells, we quantified N7Gua-CEES in nuclear DNA and all biomarkers in the culture medium. Even the lowest concentration applied induced quantifiable amounts of N7Gua-CEES within DNA after 1 h of incubation (Table 1). It is well documented that, because of its hydrophobic nature, SM easily penetrates within skin and accumulates in the lipid component of exposed tissues [57]. By analogy, it is expected that, in our experiments, CEES rapidly penetrates the explants. Since our experiments involved isolated skin without blood flow, the diffusion of CEES out of the tissue is limited and the concentration in CEES is likely to be rapidly stable. This behavior could explain why the amount of N7Gua-CEES does not linearly increase with increasing applied dose during the 24 h of the experiment (Table 1). As illustrated in Fig. 6a for the lowest applied amount (80 nmol), the level of DNA adduct actually decreases after 6 h. This decrease is certainly explained by the spontaneous depurination and the different DNA repair mechanisms (BER and NER). Interestingly, N7Gua-CEES is detected in the medium 6 h after the treatment, but not after 1 h, and its concentration is larger at 24 h. This observation validates the idea that N7Gua-CEES formed in DNA, as well as in RNA and nucleotides, is excreted from cells. It can then be detected as a modified base in the extracellular medium. This confirms the results obtained with cultured HaCaT cells and shows the interest of this adduct as a biomarker in biological fluids, in line with the detection of SM-DNA adducts in urine of exposed patients [17, 31].

Fig. 5 Detection and quantification of biomarkers in the culture medium of HaCaT cells **a** GSH and Cys conjugates and **b** N7Gua adduct. Cells were exposed for 30 min to 0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, and 10 mM of CEES. After 6 h of incubation, the medium was collected, purified by SPE, and analyzed by UHPLC-MS/MS ($n = 9$). Results are expressed in the concentration of analyte in the culture medium and represent mean \pm standard deviation



Glutathione conjugates from skin exposed to CEES

Following topical exposure of skin to CEES, the culture medium placed under the insert was collected after different incubation times (1 h, 6 h, 24 h). The samples were cleaned up by SPE and analyzed by UHPLC-MS/MS. Cys-CEES and GSH-CEES were detectable and quantifiable, but not NAC-CEES. A first observation is that, for each post-treatment time, the amounts of GSH-CEES and Cys-CEES seemed to saturate when the dose increased (Table 1). This may reflect either a limitation in the intracellular GSH concentration or a saturation of the glutathione *S*-transferase activity. Temporal profiles of the evolution of the two former compounds were

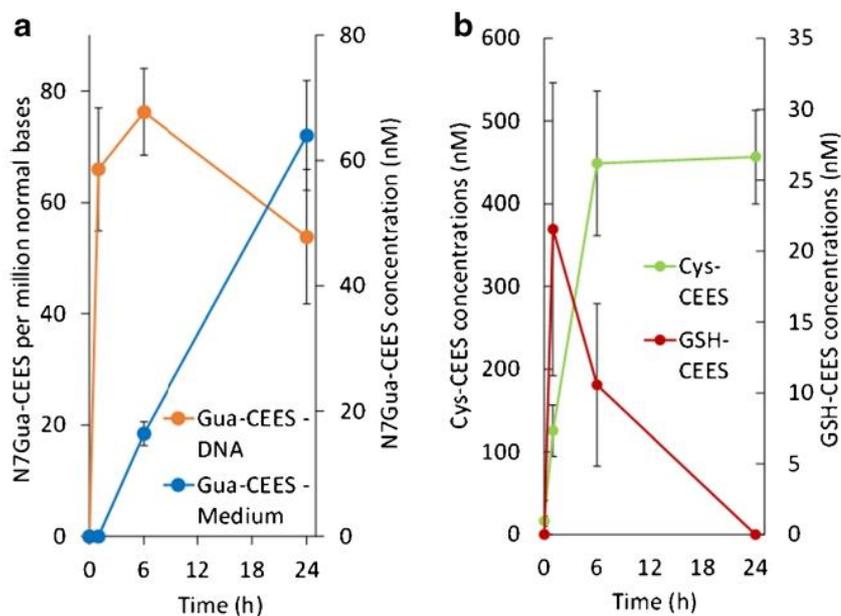
different (Fig. 6b). The concentration in GSH-CEES was maximal at 1 h and then decreased while an opposite trend was observed for Cys-CEES. Following exposure, CEES enters into skin cells and, as seen for DNA adducts, rapidly reacts with the thiol function of glutathione to form the GSH-CEES conjugate [58]. GSH-CEES is rapidly excreted, which explained why we detected it in the medium (21.5 ± 10.3 nM) already after 1 h. This early time is the maximum of concentration of GSH-CEES since this conjugate is not persistent. It is detectable at 24 h only in a few samples for the largest amount of applied CEES. In contrast to GSH-CEES, we observed that the concentration in Cys-CEES in the medium, which is dose-dependent, rose between 1 and 6 h and then

Table 1 Dose-dependent formation of the biomarkers at different exposure times for skin explants

Dose (μmol)	Time (h)	GSH-CEES (medium)	Cys-CEES (medium)	N7Gua-CEES (medium)	N7Gua-CEES (DNA)
0	1	0.0 ± 2.4	16 ± 6	0 ± 0	0 ± 0
	6	0.5 ± 0.5	33 ± 7	0 ± 0	0 ± 0
	24	0.0 ± 0.0	30 ± 8	0 ± 0	0 ± 0
0.08	1	21.5 ± 10.3	126 ± 31	0 ± 0	66 ± 11
	6	10.6 ± 5.7	449 ± 87	16 ± 2	76 ± 8
	24	0.0 ± 0.0	457 ± 57	64 ± 9	54 ± 12
0.16	1	16.3 ± 7.9	155 ± 20	0 ± 0	98 ± 13
	6	12.7 ± 6.3	465 ± 54	23 ± 8	93 ± 18
	24	1.9 ± 1.7	607 ± 73	137 ± 39	102 ± 12
0.4	1	27.6 ± 8.1	221 ± 23	0 ± 0	150 ± 19
	6	12.4 ± 4.3	773 ± 154	37 ± 10	155 ± 40
	24	2.6 ± 1.4	774 ± 64	233 ± 72	161 ± 28

Results determined in culture medium are expressed in nM while levels of N7Gua-CEES in DNA is in the number of adducts per million base. Reported values are mean \pm standard error ($n = 6$)

Fig. 6 Time-course evolution of the level of biomarkers following exposure of human skin to 80 nmol of CEES. **a** N7Gua-CEES in the DNA and culture medium. DNA adducts were quantified by UHPLC-MS/MS after DNA extraction and digestions ($n = 6$). For DNA, results were normalized with the respect to the amount of normal bases. The media were collected, purified by SPE, and analyzed by UHPLC-MS/MS ($n = 6$). **b** Glutathione conjugates induced by the mercapturate pathway in culture medium. The media were collected, purified by SPE, and analyzed by UHPLC-MS/MS ($n = 6$)



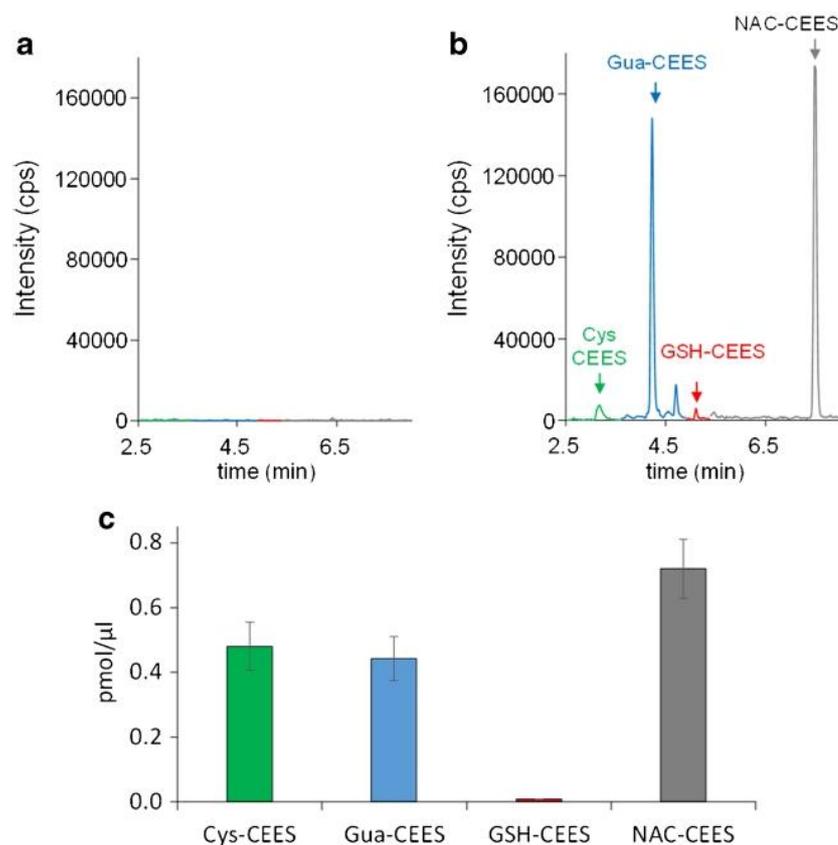
reached a plateau until 24 h. These observations are in agreement with known characteristics of the mercapturate pathway involved in the detoxification of electrophilic species such as CEES or SM [35, 39]. In the mercapturate pathway, enzymatic activities sequentially convert GSH-CEES into CysGly-CEES and Cys-CEES. These two consecutive reactions are catalyzed by the membrane-bound enzymes γ -glutamyl transferase (GGT) and dipeptidase or aminopeptidase M, respectively. Our results strongly suggest that the mercapturate pathway seems effective in the skin during the first hours after exposure. However, Cys-CEES may not be produced only by the mercapturate pathway. At the earliest time, its level (125.7 ± 30.8 nM) is already higher than that of GSH-CEES. The largest concentration of Cys-CEES in the medium is approximately 1 order of magnitude larger than that of GSH-CEES. These results suggest that a part of Cys-CEES detected comes from other processes or biological mechanisms. A direct reaction between the thiol groups of intracellular free cysteine is another possible source.

CEES exposure biomarkers in plasma

We then applied our approach to samples from an *in vivo* study. Blood plasma samples from mice cutaneously exposed to vapors of CEES were analyzed by SPE-UHPLC-MS/MS 1 day after exposure. While no peak was observed on the chromatograms corresponding to untreated animals (Fig. 7a), the four biomarkers were readily detected in the plasma from treated mice (Fig. 7b). After correction of the peak intensity by the calibration curve, the decreasing concentration of the four analytes was found to be NAC-CEES > Cys-CEES \approx Gua-CEES \gg GSH-CEES (Fig. 7c). The trend observed *in vitro* of a lower amount of GSH-CEES

was even more obvious *in vivo*. Gua-CEES was also found to be an interesting biomarker easily accessible from blood, as previously shown in urine or in nuclear DNA extracted from organs and blood cells [17, 31]. The major difference between plasma and cultured cells and skin explants is that NAC-CEES was the most frequent biomarker. NAC-CEES was detected neither in the HaCaT cells, skin explant experiments reported above, nor in previous works with primary cultures of normal human keratinocytes (Batal and Douki, unpublished results). The difference between these cellular cutaneous models and the mice situation regarding the formation of this final product of the mercapturate pathway documented for numerous chemicals [40, 41] is that acetylation of cysteine conjugates is not an ubiquitous activity in the organism. This last step of the mercapturate pathway takes place when Cys-S-conjugates enter the renal tubular cells and hepatocytes via various transporters including organic anion transport polypeptides and cystine/cysteine transporters [59–61]. Acetylation of the Cys-S-conjugates is carried out by the *N*-acetyltransferase NAT8, expressed almost exclusively in the kidney proximal tubular cells and, to a lower extent, in the liver [62]. NAC-CEES conjugates synthesized in the kidney are directly released into urine, whereas those synthesized in the liver are excreted into the bile. Mercapturate conjugates are also produced in very low amounts in other tissues and then enter the bloodstream [39, 63]. These observations explain why Cys-CEES was not converted into NAC-CEES in cultured cutaneous cells and skin explants while NAC-CEES was abundant in plasma. They also may explain why Cys-CEES accumulates in *in vitro* systems without being further metabolized and becomes the most frequent of the four studied biomarkers. In addition, the difference between our *in vitro* and *in vivo* data are likely explained by a rapid

Fig. 7 Detection of the biomarkers in the blood plasma from mice. Chromatogram of the analysis of plasma from the **a** unexposed mice and **b** mice 1 day after cutaneous exposure to vapors of CEES. **c** Concentration of the four biomarkers in the plasma of exposed mice. Results are expressed in pmol/ μ L. They are means \pm SEM ($n = 4$)



penetration of CEES through the cutaneous barrier in mice followed by a diffusion towards internal organs where NAC-CEES formation is more efficiently produced than in skin.

Conclusion

The present work allowed us to develop a method for the simultaneous quantification of four biomarkers of exposure to CEES, namely the N7 guanine adduct and the conjugates to glutathione, cysteine, and *N*-acetylcysteine (mercapturic acid). The assay involves sample preparation by SPE and quantification by UHPLC-MS/MS. Isotopic dilution is used to compensate for possible loss of material during the sample work-up and for matrix effects in the MS/MS detection. The accuracy of the method for culture medium samples was validated using reference statistical procedures. Using this technique, we quantified GSH-CEES, Cys-CEES, and N7Gua-CEES in the culture medium of exposed HaCaT cells and human skin explants. The same compounds and NAC-CEES were detected in plasma from exposed mice. These products of the reaction of CEES with biomolecules are thus unambiguously formed in cells and further excreted. These observations provide a biological validation to the use of GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES, and N7Gua-CEES as biomarkers of

exposure to CEES. They can be thus targeted in biological fluids.

However, not all four compounds are equally interesting as exposure biomarkers. For example, GSH-CEES was found to be rapidly metabolized and is present only in very low amounts in plasma. Cys-CEES could be an interesting marker, but the sensitivity of its detection is lower than that for the other compounds. NAC-CEES is a more attractive GSH metabolite since it is present in the largest concentration in plasma and exhibits remarkable analytical properties, like Gua-CEES. These conclusions will be used for the next step of our work involving the development of biomarkers of exposure to SM that will focus on NAC, Gua, and to lesser extent, Cys derivatives. Another necessary improvement of our approach for real-life applications will be the increase of the throughput of the SPE sample preparation step. Although the use of SPE cartridges can be automatized, we will rather develop in the future an approach using “on-line SPE.” In this system, the SPE column is part of the LC system placed ahead of the mass spectrometer. The sample preparation is thus easier, less time-consuming, and more reproducible.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03096-4>.

Funding This work was supported by the “Agence de l’Innovation de Défense” (French Defence Ministry) and the “NRBC” program of CEA.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Romano JA, Lukey BJ, Salem H. Chemical warfare agents: chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics. 2nd ed. Boca Raton: CRC; 2008.
- Wattana M, Bey T. Mustard gas or sulfur mustard: an old chemical agent as a new terrorist threat. *Prehospital Disaster Med.* 2009;24:19–29. <https://doi.org/10.1017/S1049023X0000649X>.
- Ahmad S, Ahmad A. Emerging targets for treating sulfur mustard-induced injuries: coagulation and inflammation by sulfur mustard. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1374:123–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.13095>.
- Panahi Y, Ghanei M, Zarch MV, Poursaleh Z, Parvin S, Rezaee R, et al. Evaluation of the pharmacoeconomics of drugs used for the treatment of long-term complications of sulfur mustard. *Ital J Med.* 2016;10. <https://doi.org/10.4081/ijtm.2016.743>.
- Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Panahi Y, Shoja MM. Sulfur mustard toxicity: history, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Crit Rev Toxicol.* 2011;41:384–403. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.541224>.
- Kehe K, Thiemann H, Balszuweit F, Eyer F, Steinritz D, Zilker T. Acute effects of sulfur mustard injury—Munich experiences. *Toxicology.* 2009;263:3–8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.060>.
- Brooks SM, Weiss MA, Bernstein IL. Reactive airways dysfunction syndrome (RADS). *Chest.* 1985;88:376–84. <https://doi.org/10.1378/chest.88.3.376>.
- Wada S, Miyanishi M, Nishimoto Y, Kambe S, Miller RW. Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man. *Lancet.* 1968;1:1161–3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)91863-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)91863-1).
- Yamakido M, Ishioka S, Hiyama K, Maeda A. Former poison gas workers and cancer: incidence and inhibition of tumor formation by treatment with biological response modifier N-CWS. *Environ Health Perspect.* 1996;104:485–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s3485>.
- Varmazyar M, Kianmehr Z, Faghihzadeh S, Ghazanfari T, Ardestani SK. Time course study of oxidative stress in sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced toxicity. *Int Immunopharmacol.* 2019;73:81–93. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.055>.
- Black RM. An overview of biological markers of exposure to chemical warfare agents. *J Anal Toxicol.* 2008;32:2–9. <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.2>.
- Thavaselvam D, Flora SS. Chemical and biological warfare agents. In: *Biomarkers in Toxicology*; Elsevier; 2014. p. 521–38.
- Manandhar E, Pay A, Veress LA, Logue BA. Rapid analysis of sulfur mustard oxide in plasma using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry for diagnosis of sulfur mustard exposure. *J Chromatogr A.* 2018;1572:106–11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.035>.
- Qi M, Xu B, Wu J, Zhang Y, Zong C, Chen J, et al. Simultaneous determination of sulfur mustard and related oxidation products by isotope-dilution LC–MS/MS method coupled with a chemical conversion. *J Chromatogr B.* 2016;1028:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.003>.
- Koryagina NL, Savel’eva EI, Khlebnikova NS, Radilov AS. Determination of thiodiglycol and its oxide in biomedical samples by gas chromatography–mass spectrometry. *J Anal Chem.* 2018;73:1209–16. <https://doi.org/10.1134/S1061934818130075>.
- Li C, Chen J, Liu Q, Xie J, Li H. Simultaneous quantification of seven plasma metabolites of sulfur mustard by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2013;917–918:100–7. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.035>.
- Xu H, Nie Z, Zhang Y, Li C, Yue L, Yang W, et al. Four sulfur mustard exposure cases: overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring. *Toxicol Rep.* 2014;1:533–43. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.017>.
- John H, Koller M, Worek F, Thiemann H, Siegert M. Forensic evidence of sulfur mustard exposure in real cases of human poisoning by detection of diverse albumin-derived protein adducts. *Arch Toxicol.* 2019;93:1881–91. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02461-2>.
- Liu C, Liang L, Xiang Y, Yu H, Zhou S, Xi H, et al. An improved method for retrospective quantification of sulfur mustard exposure by detection of its albumin adduct using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:7037–46. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8842-8>.
- Chen B, Yu H-L, Liu S-L, Liu C-C, Liang L-H, Li X-H, et al. A sensitive quantification approach for detection of HETE-CP adduct after benzyl chloroformate derivatization using ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411:3405–15. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01820-3>.
- Noort D, Fidder A, Degenhardt-Langelaan C, Hulst AG. Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study. *J Anal Toxicol.* 2008;32:25–30.
- Fidder A, Moes GWH, Scheffer AG, van der Schans GP, Baan RA, de Jong LPA, et al. Synthesis, characterization, and quantitation of the major adducts formed between sulfur mustard and DNA of calf thymus and human blood. *Chem Res Toxicol.* 1994;7:199–204. <https://doi.org/10.1021/tx00038a013>.
- Ludlum DB, Austin-Ritchie P, Hagopian M, Niu T-Q, Yu D. Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. *Chem Biol Interact.* 1994;91:39–49.
- Batal M, Rebelo-Moreira S, Hamon N, Bayle P-A, Mouret S, Cléry-Barraud C, et al. A guanine-ethylthioethyl-glutathione adduct as a major DNA lesion in the skin and in organs of mice exposed to sulfur mustard. *Toxicol Lett.* 2015;233:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.001>.
- Zubel T, Bürkle A, Mangerich A. Mass spectrometric analysis of sulfur mustard-induced biomolecular adducts: are DNA adducts suitable biomarkers of exposure? *Toxicol Lett.* 2018;293:21–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.014>.
- van der Schans GP, Mars-Groenendijk R, de Jong LPA, Benschop HP, Noort D. Standard operating procedure for immunoblot assay for analysis of DNA/sulfur mustard adducts in human blood and skin. *J Anal Toxicol.* 2004;28:316–9. <https://doi.org/10.1093/jat/28.5.316>.
- Batal M, Boudry I, Mouret S, Wartelle J, Emorine S, Bertoni M, et al. Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;273:644–50. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.010>.
- Yue L, Zhang Y, Chen J, Zhao Z, Liu Q, Wu R, et al. Distribution of DNA adducts and corresponding tissue damage of Sprague–Dawley rats with percutaneous exposure to sulfur mustard. *Chem Res Toxicol.* 2015;28:532–40. <https://doi.org/10.1021/tx5004886>.
- Wang P, Zhang Y, Chen J, Guo L, Xu B, Wang L, et al. Analysis of different fates of DNA adducts in adipocytes post-sulfur mustard

- exposure *in vitro* and *in vivo* using a simultaneous UPLC-MS/MS quantification method. *Chem Res Toxicol.* 2015;28:1224–33. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00055>.
30. Batal M, Boudry I, Mouret S, Cléry-Barraud C, Wartelle J, Bérard I, et al. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278:39–44. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.003>.
 31. Zhang Y, Yue L, Nie Z, Chen J, Guo L, Wu B, et al. Simultaneous determination of four sulfur mustard–DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2014;961:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.050>.
 32. Tewari-Singh N, Agarwal C, Huang J, Day BJ, White CW, Agarwal R. Efficacy of glutathione in ameliorating sulfur mustard analog-induced toxicity in cultured skin epidermal cells and in SKH-1 mouse skin *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336:450–9. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173708>.
 33. Inturi S, Tewari-Singh N, Gu M, Shrotriya S, Gomez J, Agarwal C, et al. Mechanisms of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced DNA damage in skin epidermal cells and fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:2272–80. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.020>.
 34. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Tumer ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134:489–92. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>.
 35. Gonçalves-Dias C, Morello J, Correia MJ, Coelho NR, Antunes AMM, Macedo MP, et al. Mercapturate pathway in the tubulocentric perspective of diabetic kidney disease. *Nephron.* 2019;143:17–23. <https://doi.org/10.1159/000494390>.
 36. Cooper AJL, Krasnikov BF, Niatetskaya ZV, Pinto JT, Callery PS, Villar MT, et al. Cysteine S-conjugate β -lyases: important roles in the metabolism of naturally occurring sulfur and selenium-containing compounds, xenobiotics and anticancer agents. *Amino Acids.* 2011;41:7–27. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0552-0>.
 37. Lee JY, Lee YH. Solid-phase extraction of sulfur mustard metabolites using an activated carbon fiber sorbent. *J Anal Toxicol.* 2015; bkvi112. <https://doi.org/10.1093/jat/bkvi112>.
 38. Sezigen S, Kenar L. Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. *Toxicol Lett.* 2020;320:52–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.001>.
 39. Hanna PE, Anders MW. The mercapturic acid pathway. *Crit Rev Toxicol.* 2019;49:819–929. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1692191>.
 40. Mathias PI, B'hymer C. Mercapturic acids: recent advances in their determination by liquid chromatography/mass spectrometry and their use in toxicant metabolism studies and in occupational and environmental exposure studies. *Biomarkers.* 2016;21:293–315. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2016.1141988>.
 41. Blair IA. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. *Biomed Chromatogr.* 2010;24:29–38. <https://doi.org/10.1002/bmc.1374>.
 42. Watson W, Mutti A. Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers.* 2004;9:211–42.
 43. Teichert J, Sohr R, Hennig L, Baumann F, Schoppmeyer K, Patzak U, et al. Identification and quantitation of the *N*-acetyl-L-cysteine-S-conjugates of bendamustine and its sulfoxides in human bile after administration of bendamustine hydrochloride. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:292–301. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.022855>.
 44. Black RM, Brewster K, Clarke RJ, Harrison JM. The chemistry of 1,1'-thiobis(2-chloroethane) (sulphur mustard). Part II.1 the synthesis of some conjugates with cysteine, *n*-acetylcysteine and *n*-acetylcysteine methyl ester. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 1992;71:49–58. <https://doi.org/10.1080/10426509208034495>.
 45. Biemann A, Sambaglio N, Wehr N, Gerber-Lemaire S, Bochet CG, Curty C. Synthesis of different glutathione–sulfur mustard adducts of verified and potential biomarkers. *RSC Adv.* 2018;8:23881–90. <https://doi.org/10.1039/C8RA03360A>.
 46. Batal M, Boudry I, Cléry-Barraud C, Mouret S, Douki T. Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry. *Toxicol Environ Chem.* 2013;95:260–76. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.758729>.
 47. Ravanat J-L, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, et al. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis.* 2002;23:1911–8. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1911>.
 48. Douki T, Odin F, Caillat S, Favier A, Cadet J. Predominance of the 1,N2-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:62–70. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.013>.
 49. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2018) Bioanalytical method validation guidance for industry. 44.
 50. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol.* 2013;37:452–74. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>.
 51. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci.* 2011;2:21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
 52. Lawley P, Brookes P. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem J.* 1963;89:127–38. <https://doi.org/10.1042/bj0890127>.
 53. Zübel T, Hochgesand S, John H, Steinritz D, Schmidt A, Bürkle A, et al. A mass spectrometric platform for the quantitation of sulfur mustard-induced nucleic acid adducts as mechanistically relevant biomarkers of exposure. *Arch Toxicol.* 2019;93:61–79. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2324-7>.
 54. Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J, Swenberg JA. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2009;678:76–94. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.006>.
 55. Gates KS, Nooner T, Dutta S. Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chem Res Toxicol.* 2004;17:839–56. <https://doi.org/10.1021/tx049965c>.
 56. Matijasevic Z, Precopio ML, Snyder JE, Ludlum DB. Repair of sulfur mustard-induced DNA damage in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. *Carcinogenesis.* 2001;22:661–4. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.4.661>.
 57. Nagy SM, Golumbic C, Stein WH, Fruton JS, Bergmann M. The penetration of vesicant vapors into human skin. *J Gen Physiol.* 1946;29:441–69. <https://doi.org/10.1085/jgp.29.6.441>.
 58. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009;390. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>.
 59. Hughey RP, Rankin BB, Elce JS, Curthoys NP. Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 1978;186:211–7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90430-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90430-7).
 60. Hanigan MH. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathione: its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 1998;111–112:333–42. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00170-1).
 61. Griffith OW. The role of glutathione turnover in the apparent renal secretion of cystine. *J Biol Chem.* 1981;256:12263–8.
 62. Chambers JC, Zhang W, Lord GM, van der Harst P, Lawlor DA, Sehmi JS, et al. Genetic loci influencing kidney function and

- chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2010;42:373–5. <https://doi.org/10.1038/ng.566>.
63. Hinchman CA, Rebbeor JF, Ballatori N. Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998;275:G612–9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.4.G612>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Annexe 2 : Publication acceptée sur les résultats des traitements des souris par du CEES.



Evidence for the systemic diffusion of (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide, a sulfur mustard analog, and its deleterious effects in brain

Marie Gilardoni^a, Daniel Léonço^b, Fanny Caffin^c, Fanny Gros-Désormeaux^c, Camille Eldin^a, David Béal^a, Sadia Ouzia^b, Christophe Junot^b, François Fenaille^b, Christophe Piérard^c, Thierry Douki^{a,*}

^a Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SYMMES, F-38000, Grenoble, France

^b Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), MetaboHUB, F-91191, Gif sur Yvette, France

^c Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Place Général Valérie André, BP 73, 91223, Brétigny-sur-Orge Cedex, France

ARTICLE INFO

Handling Editor: K. Wallace

Keywords:
2-Chloroethyl ethyl sulfide
Biomarkers
Plasma
Brain

ABSTRACT

Sulfur mustard, a chemical warfare agent known to be a vesicant of skin, readily diffuses in the blood stream and reaches internal organs. In the present study, we used the analog (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide (CEES) to provide novel data on the systemic diffusion of vesicants and on their ability to induce brain damage, which result in neurological disorders. SKH-1 hairless mice were topically exposed to CEES and sacrificed at different time until 14 days after exposure. A plasma metabolomics study showed a strong systemic impact following a self-protection mechanism to alleviate the injury of CEES exposure. This result was confirmed by the quantification of specific biomarkers in plasma. Those were the conjugates of CEES with glutathione (GSH-CEES), cysteine (Cys-CEES) and N-acetyl-cysteine (NAC-CEES), as well as the guanine adduct (N7Gua-CEES). In brain, N7Gua-CEES could be detected both in DNA and in organ extracts. Similarly, GSH-CEES, Cys-CEES and NAC-CEES were present in the extracts until day14. Altogether, these results, based on novel exposure markers, confirm the ability of vesicants to induce internal damage following dermal exposure. The observation of alkylation damage to glutathione and DNA in brain provides an additional mechanism to the neurological insult of SM.

1. Introduction

Sulfur mustard (SM), or bis(2-chloroethyl) sulfide, is a chemical warfare agent used on a large scale during World War I (Romano et al., 2006), and on other battlefields until very recently (Senigen and Kenar, 2020). In addition to these military concerns, SM is a threat for civilians that can be exposed to old ammunitions (Minnisen et al., 2010; Vanninen et al., 2020). More importantly, SM is thought to be a persistent threat by non-state actors, such as terrorist groups, because of its easy synthesis (Wattana and Bey, 2009). Neurological and psychological impacts have also been observed in exposed patients (Balali-Mood et al., 2005; Darchini-Maragheh et al., 2012; Rowell et al., 2009; Talabani et al., 2018; Thomsen et al., 1998), suggesting the occurrence of SM-mediated damage to the brain. *In vitro* experiments have confirmed that neurons were highly sensitive to SM (Lanka et al., 1975; Sawyer, 1999; Turnbull et al., 1973). Because handling of SM is strictly regulated and banned from most toxicology laboratories by the Organization for the

Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), other experimental works involved the analog 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES). Neurological effects of CEES confirmed those found for SM *in vivo* (Gadaden-Gray et al., 2012; Gros-Désormeaux et al., 2018; Sharma et al., 2009).

One specific feature of SM and CEES is their ability to induce neuropathological disorders and brain damage after dermal exposure on small skin areas. This is partly explained by the fact that vesicant agents readily diffuse through skin, reach the blood stream and then diffuse to internal organs. Presence of SM in blood has been shown by using labeled compounds and quantifying the parent molecule as well as its degradation products (Chilcott et al., 2000; Callumbine, 1947; Meng et al., 2019). Evidence was also provided by the detection of adducts to circulating proteins (Chen et al., 2019; Nie et al., 2011; Noort et al., 2008; Pantazides et al., 2019). The fact that SM then reaches internal organs, and in particular the brain, has been documented in human by post-mortem quantification of the toxic (Draach et al., 1987). Evidence was also provided by the quantification of SM adducts in nuclear DNA

* Corresponding author.

E-mail address: thierry.douki@cea.fr (T. Douki).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152950>

Received 19 July 2021; Received in revised form 3 September 2021; Accepted 9 September 2021

Available online 14 September 2021

0300-483X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Batal et al., 2014, 2013; Brookes and Lawley, 1960; Fiddler et al., 1994; Yue et al., 2015). Using the latter biomarker, brain was found to be a major target, possibly because of its large fat content. The present work, performed in a hairless mice model, aimed at further understanding the chain of events leading from dermal exposure by vesicant agents to brain damage. We wished to use CEES for which numerous other toxicological data are available. In particular, we reported that acute dermal exposure to CEES induced a significant increase in anxiety-like reactivity and an alteration of working memory (Groc-Desormeaux et al., 2018). We thus wanted to gather novel information on the diffusion step in blood and on the final damage to brain.

These two goals first relied on the quantification of novel biomarkers. SM and CEES are both strong alkylating agents reacting with the nucleophilic sites present in biomolecules. This leads, as already mentioned, to the formation of DNA adducts. Another important target of SM is glutathione (GSH), the most abundant intracellular non-protein thiol that plays major roles in antioxidant defense and detoxification. SM and CEES are electrophilic agents, which under their episulfonium form, exhibit strong alkylating properties. Like numerous electrophilic compounds, detoxification of SM and CEES occurs via conjugation to GSH. A widely proposed explanation to the toxicity of SM and CEES is their ability to deplete the GSH pool (Abel et al., 2011; Black et al., 1992a, b; Davison et al., 1961; Kinsey and Grant, 1947) and thereby inducing oxidative stress by reducing cellular antioxidant capacities. This effect is reflected by the modulation of a wide variety of markers of oxidative stress (Husain et al., 1996; Jafari, 2007; Mukhopadhyay et al., 2006; Paromov et al., 2007; Pohanka et al., 2011, 2013; Varmazyar et al., 2019). Evidence of the role of oxidative stress is confirmed by the ability of antioxidants at counteracting the toxic effects of SM (Mukherjee et al., 2009; Paromov et al., 2011, 2008; Rappeneau et al., 2000; Shohrati et al., 2008; Tewari-Singh et al., 2011). These toxic effects impact glutathione content and are likely to affect the function of many organs exposed to vesicant agents and participate to their systemic effects. The conjugate of CEES to GSH (GSH-CEES) appears thus as an attractive effect biomarker that we quantified in plasma and brain. We also quantified two of its metabolites: the cysteine conjugate (Cys-CEES) and the final product of the mercapturate pathway *N*-acetyl-cysteine conjugate (NAC-CEES). Data were also gathered on the DNA adduct 2-ethyl-thioethyl-N7-guanine (N7Gua-CEES), both in nuclei and in plasma.

As mentioned above, although previous studies have shown that toxicity of SM and CEES are associated with inflammation, oxidative stress, and DNA damages, the underlying biochemical mechanisms remain largely ignored. Therefore, we intended to reinforce current hypotheses and shed new light on CEES action mechanisms and effects through novel biomarkers that strongly. First, we targeted molecular biomarkers that like NAC-CEES had never been quantified nor investigated in brain. Second, we applied an extensive and state-of-the-art untargeted metabolomics approach for getting deeper insight into underlying biochemical mechanisms. It should be stressed that few metabolomics studies have been published and involved NMR and/or GC-MS analysis of plasma samples from humans or rats exposed to SM (Liu et al., 2020; Nobakht et al., 2016, 2017). Although relevant, those studies provided partially overlapping results in terms of SM-altered metabolic pathways, probably because of the low number of metabolites monitored (less than 50). In the present work, we used an untargeted metabolomics approach based on liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry that routinely enables the detection of about 200 metabolites in plasma samples (Boudah et al., 2014; Moreau et al., 2020; Tabone et al., 2021) for getting a more precise view of CEES-associated systemic damages. In addition to support the ability of vesicant at diffusing in blood and reaching brain, which is at the origin of neurological and psychological disorders, an aim of our study was also to validate in animals biomarkers of interest to develop for human exposure.

2. Materials and methods

2.1. Animal experiment

The protocol was validated by the ethic committee of Health Services of French Armed Forces. SKH-1 hairless mice were purchased from Charles River and used at 7 weeks. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Under a fume hood, mice were then locally exposed through the skin to the vapors emitted by 10 μ L of neat CEES using cap method (screw cap for HPLC vial, PTFE septum and polypropylene cap, total volume 300 μ L). Based on the known vapor pressure of 3.4 mm Hg for CEES, it can be calculated that this exposure corresponds at the most to 0.4 mg/kg if the totality of the vapors is absorbed by the skin. Four sites on the mice back were exposed to CEES vapors during 30 min. After 4 h, the skin was decontaminated by soap and water. To relieve pain induced by CEES, buprenorphine (0.05 mg/kg) was subcutaneously injected after skin decontamination and codeine was daily administered in drinking water (4 mg/100 mL). One, 3, 7 and 14 days after exposure, the animals ($n = 16$ –20) were sacrificed by an injection of pentobarbital (150 mg/kg, ip route). The blood was collected by heart puncture. Plasma was separated by centrifugation (2000 g, 10 min, 4 °C) and samples were kept frozen until quantification of biomarkers. For this purpose, an aliquot fraction of 100 μ L was collected from each sample. The brain of the sacrificed animals was removed by surgery and kept frozen at -80 °C until use.

2.2. Chemicals and enzymes

Reduced L-glutathione (GSH), (2-chloroethyl)-ethyl sulfide (CEES) and L-cysteine (Cys) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from Roche (Boehringer Mannheim) (Mannheim, Germany). 2-Deoxyguanosine (dGuo) was purchased from Pharma Waldhof (Düsseldorf, Germany). Formic acid (LC-MS grade) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), acetonitrile (HPLC-MS grade) from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), methanol (HPLC grade) and ammonium formate from Sigma Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). Ribonuclease T1, ribonuclease A, phosphodiesterase II, deoxyribonuclease II, alkaline phosphatase and nuclease P1 were obtained from Sigma. Protease was purchased from Qiagen and phosphodiesterase I from Worthington (Lakewood, NJ, USA). Isotopically labelled molecules Cys* (13 C₃ 99 %, 15 N 99 %), NAC* (13 C₃ 97–99 % 15 N 97–99 %), GSH* (13 C₂ 98 % 15 N 96–99 %) and dGuo* (15 N₅ 98 %) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA).

2.3. Untargeted metabolomics experiments by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS)

The metabolomic study was performed according to a protocol previously developed and routinely used in our team, which relies on reverse phase chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography and high resolution mass spectrometry (Boudah et al., 2014; Moreau et al., 2020; Tabone et al., 2021). Two 50- μ L aliquots were withdrawn from each plasma sample. Each aliquot was then mixed with 200 μ L of methanol and incubated on ice for 90 min to allow complete protein precipitation. After centrifugation, the supernatants were withdrawn and evaporated to dryness under a nitrogen stream. Finally, the extracts were resuspended in 100 μ L of starting mobile phases of the two chromatographic conditions. Quality control samples were obtained by pooling aliquots of each sample and these were injected every 10 samples throughout the analysis for further data normalization/standardization. Metabolic extracts were analyzed by LC-HRMS using an Ultimate 3000 chromatographic system (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) coupled to an Exactive mass spectrometer from Thermo Fisher Scientific fitted with an electrospray (ESI) source

and operating in the positive and negative ion modes for metabolite separations on C18 and ZIC-pHILIC columns, respectively. LC-HRMS conditions were exactly those previously described by our group (Boudah et al., 2014). Data processing and statistical analysis were achieved using the Workflow4Metabolomics (W4M) platform (Giacomoni et al., 2015). Annotation of metabolite features was performed by using our spectral database first according to accurate measured masses and chromatographic retention times (Boudah et al., 2014). Metabolite identification was further confirmed for discriminant metabolites by running additional LC-MS/MS experiments using a Dionex Ultimate chromatographic system combined with a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) under non-resonant collision-induced dissociation conditions using higher-energy C-trap dissociation (HCD). To be identified, metabolites had to match at least two orthogonal criteria (among accurate measured mass, retention time, and MS/MS spectrum) to those of an authentic chemical standard analyzed under the same analytical conditions, as proposed by the Metabolomics Standards Initiative (Sumner et al., 2007).

2.4. Brain sample preparation

2.4.1. DNA extraction from brain

DNA extraction from the brain was achieved as previously described (Ravanat et al., 2002). Then, DNA was hydrolyzed in two steps as previously developed in the group (Douki et al., 2004). Each step involved a specific enzymatic cocktail: nuclease P1, phosphodiesterase II and DNase II at pH 6 for the first; phosphodiesterase I and alkaline phosphatase at pH 8 for the second. Each step was carried out at 37 °C for 2 h. The samples were then left at 90 °C for 20 min in a heating block in order to depurinate DNA adducts. The final samples thus contain normal DNA bases under the form of nucleosides, which are quantified by a UV detector placed before the inlet of the mass spectrometer, and adducts as modified bases quantified by mass spectrometry. Samples were filtered prior to analysis at 0.2 µm on filtration column (VWR) centrifuged at 8000xg for 5 min.

2.4.2. Metabolites extraction from brain

The used protocol is based on the work of Malik et al. (2018). In brief, samples were thawed in an ice bath and spiked with isotopically labelled internal standards. A stainless steel bead and 300 µL of a cold methanol:chloroform solution were added to each brain sample. Samples were then homogenized by shaking at 25 Hz for 4 min in a TissueLyser (Qiagen). Then, samples are placed back on ice. Then, 100 µL of cold water was added before vortexing. Samples were then centrifuged at 10,787xg for 7 min at 4 °C. The upper layer, which contains the polar metabolites of interest, was carefully collected and placed in a new tube to be dried in a SPD111V speed vac (Thermo Scientific). The resulting residue was dissolved in 50 µL of water and filtered at 0.2 µm on filtration column (VWR) centrifuged at 8000xg for 5 min.

2.5. On-line solid phase extraction of plasma

An improved version of the previously reported assay for plasma samples (Roser et al., 2021) was used. Classical solid phase extraction (SPE) was replaced by on line SPE. Prior to analysis, the samples (90 µL of plasma) were spiked with internal standards (10 µL, 0.2 µM) and loaded onto a 0.2 µm filtration column (VWR). Then, they were centrifuged at 8000 x g for 5 min. The filtrate was collected and loaded onto a 30 kDa Nanocep® tube. This second filtration step involved a centrifugation for 30 min at 8000 x g. Additional sample clean-up was performed directly on-line within the UHPLC system. The samples were injected (50 µL) first in a Macherey-Nagel Nucleodur® PFP column (50 mm × 2.0 mm ID, 5 µm particle size) used as an on-line SPE column. Mobile phase A consisted of 5 mM ammonium formate (AmF) in MilliQ water and mobile phase B was HPLC-LC/MS grade methanol with 5 mM AmF. Samples were cleaned by a gradient from 0 to 50 % of B in 1 min.

The flow rate was set to 350 µL/min, the column temperature maintained at 50 °C and the sample storage compartment set to 15 °C. After that, samples are injected by backflush into the analytical column.

2.6. UHPLC-MS/MS quantification of the biomarkers

Quantification by ultra high performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) of GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES and N7Gua-CEES was carried out using a recently described approach (Roser et al., 2021). Chromatographic separations were carried out on an ExionLC system (SCIEX, Framingham, MA). The on-line SPE part consisted in an autosampler, two pumps and a 2 × 50 mm ID pentafluorophenyl column (5 µm particle size, Nucleodur PFP, Macherey-Nagel). The analytical part involved two pumps, a heated column compartment and the detector. Analytical separation was performed using a Macherey-Nagel Nucleodur® C18 column (100 mm × 2.0 mm ID, 1.8 µm particle size). Connection between the on-line SPE and the analytical sub-units was controlled by a 6-ways valve. The mobile phase consisted in a gradient of 2 mM AmF and LC/MS grade acetonitrile. Detection was afforded by a SCIEX QTRAP® 6500+ triple quadrupole mass spectrometer (Framingham, MA) equipped with an Ion Drive™ Turbo V source operated in positive ionisation mode. Data were collected in multiple reaction monitoring (MRM) scan mode using previously reported transitions (Roser et al., 2021). Quantification of N7Gua-CEES in DNA also involved on-line UV quantification on unmodified nucleosides in order to determine the amount of analyzed DNA.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis were performed on pools of replicates originating from different animals. Data were statistically analyzed in GraphPad PRISM using one-way ANOVA followed by the non-parametric Kruskal-Wallis test for multiple comparisons. Univariate and multivariate analyses of metabolomics data were also performed using the W4M platform (Giacomoni et al., 2015), while the online MetaboAnalyst platform was used for heatmap generation and metabolic pathway enrichment (Chong et al., 2018).

3. Results

3.1. Untargeted metabolomics analysis of plasma samples from mice exposed to CEES

Metabolomics analyses of mouse plasma samples were performed using two complementary LC-HRMS platforms involving reversed-phase chromatography [C18(+)] and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography [HILIC(-)], for the analysis of hydrophobic and polar metabolites in the positive and the negative ionization modes, respectively. Under these conditions, 57 metabolite features from the C18(+) and 165 from the HILIC(-) analysis matched the accurate masses and retention times of the metabolites included in our chemical database, thus yielding 199 unique annotated metabolites in total. Although principal component analysis (PCA) did not reveal any obvious differences between the 4 post-exposure times (data not shown), a clustered analysis heatmap was generated to group the related metabolites (top 50 ones by ANOVA p-values), and highlighted a time-dependent evolution of metabolite patterns through the 14 days of exposure (Fig. 1). A small portion of the top 50 metabolites was more abundant at day 1 while most of them accumulated at day 3 and plateauing afterwards, before returning to “baseline” levels at day 14 (i.e. similar profile than non-exposed mice). The metabolic profile at day 1 post-exposure proved significantly different from those at days 3 and 7 (Fig. 1). Tables S1, S2 and S3 present the metabolites with p-values < 0.05 and fold changes > 1.5 when comparing non-exposed mice to day 1, day 1 to day 3, and day 3 to day 7 post-exposure, respectively. Differences between day 1 and

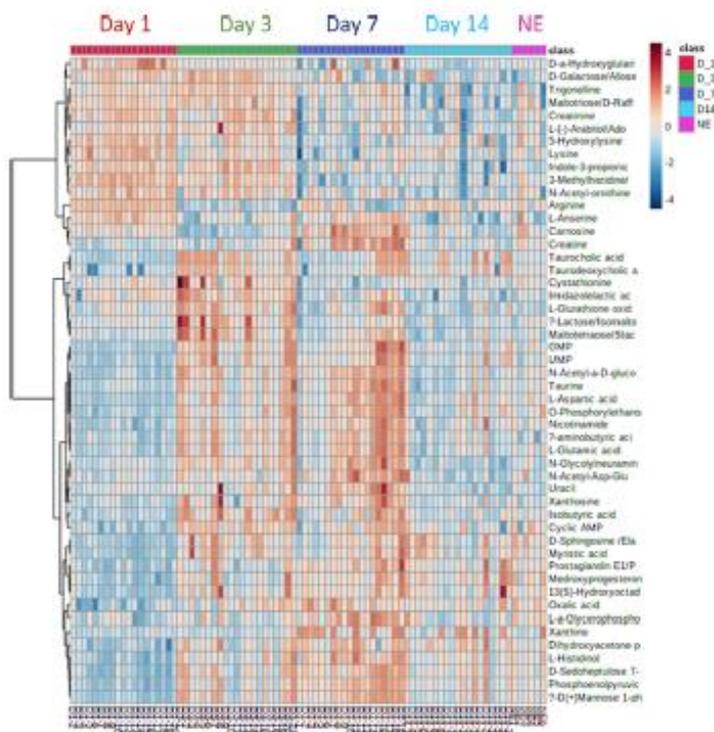


Fig. 1. Heatmap showing the modulation of the plasma levels of the top 50 impacted metabolites (according to ANOVA p-values) upon dermal exposure of hairless mice to CEES. The heatmap depicts high (red) and low (blue) relative abundances (log transformed) of metabolites from the most informative HILIC(-) dataset. NE: non exposed mice (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

day 3 were the more striking and thus the more precisely studied (Table S2). Under these conditions, 65 and 26 statistically different metabolites were retrieved from HILIC(-) and C18(+) datasets, respectively (Table S1). Metabolic pathway analysis showed that arginine and proline metabolism, arginine biosynthesis, histidine metabolism, purine metabolism and primary bile acid synthesis were among the most affected metabolic pathways (Fig. S1). Fig. 2 presents the post-exposure evolution of some key metabolites showing markedly increased or decreased concentration levels between day 1 and day 3, also by comparison to other time points post-exposure and non-exposed animals.

3.2. Targeted CEES biomarkers in blood plasma

Analysis of plasma samples benefited from an efficient and reproducible on-line SPE approach (Kuklenyik et al., 2011) that was used to improve our UHPLC-MS/MS method for CEES biomarkers (Roser et al., 2021). None of the analytes could be detected in the plasma of untreated animals. The time-course variation of the level of N7Gua-CEES in plasma exhibited a fast decrease following a maximal concentration found at the first investigated time of 1 day post exposure (Table 1). At day 14, the level of adduct was low but still above the limit of detection (LOD). GSH-CEES was detected in most samples but its level was always closed to the LOD and hardly varied with time. In contrast, Cys-CEES and NAC-CEES were found to be present in large concentrations. Their amounts were maximal at day 1 and then readily decreased. The rate of this second phase was slightly lower for Cys-CEES than NAC-CEES. Detection of NAC-CEES was yet more sensitive and its concentration after 14 days was still 12 times higher than its limit of detection (LOD).

3.3. Quantification of CEES biomarkers in brain

The molecular biomarkers were then quantified in the brain of exposed mice sacrificed just before the exposure or 1, 3, 7, and 14 days after topical application of CEES. A first analyte of interest was N7Gua-CEES. Its occurrence was first measured in the nuclear DNA extracted from the whole brain (Fig. 3a). No trace of adduct was found before exposure. Over time, the amount of N7Gua-CEES was maximal at day 1 and day 3. The difference between the two values was not statistically significant. After this peak, the value decreases. N7Gua-CEES is though still detectable after 14 days (18.0 ± 6.7 adducts per 10^6 bases) with a sensitivity corresponding to 28 times the value of its LOD. N7Gua-CEES was also detected in the organ's extracts prepared by homogenization and solvents extraction (Fig. 3a). The N7Gua-CEES concentration was highest at day 1 and then decreased to 10 % of this value at day 14.

The concentrations of the three CEES conjugates GSH-CEES, Cys-CEES and NAC-CEES arising from the mercapturate pathway were also determined in the brain extracts (Fig. 3b). They were found to be in the same range at day 1. This value was the highest of the four investigated days for GSH-CEES and NAC-CEES. A higher concentration was found for Cys-CEES at day 3 but the difference was not statistically different from day 1. A concentration decrease was then observed for the three biomarkers. It was faster for GSH-CEES. Because this analyte exhibited the lowest sensitivity in the analytical method, it was below the limit of quantification in all samples at day 3 and in a large fraction of those at day 7 and 14. In contrast to GSH-CEES, the concentrations of Cys-CEES and NAC-CEES decreased slowly over the 2 weeks of follow-up. They were still detectable at day 14, with a good sensitivity for NAC-CEES corresponding to a factor of 9 with respect to the LOD. The quantification of Cys-CEES at day 14 was hampered by the presence of traces of

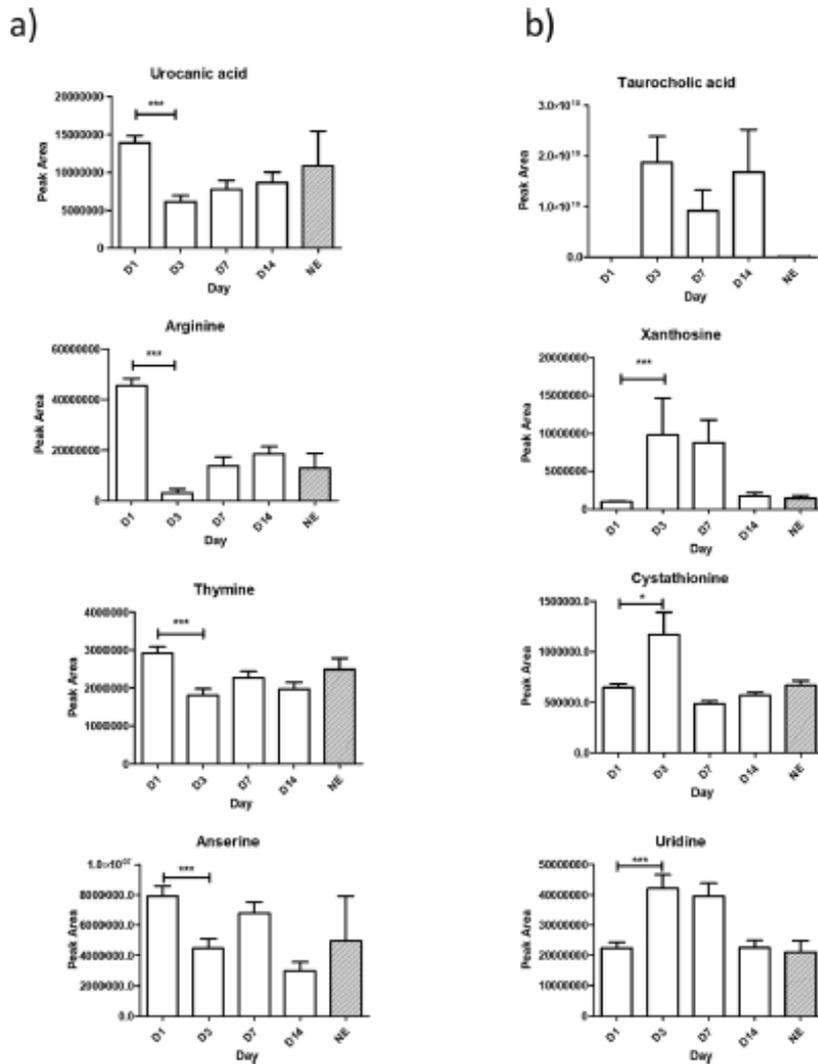


Fig. 2. Variation of the concentration of a series of plasma metabolites following exposure to CEES. The metabolites underwent either a) decrease or b) increase in their concentration levels. NE: non exposed mice.

Table 1

Concentration (in nM) of four biomarkers of exposure to CEES determined in the plasma of mice topically exposed to CEES. Plasma was collected after sacrifice after different periods and analysed by UHPLC-MS/MS with on-line SPE. The number on animals varied from 16 to 20 per group. The reported values are the means \pm SEM. The symbols for statistical significance of the differences at $p < 0.05$ or $p < 0.01$ are: * and ** for comparison with day 1; † and †† for comparison with day 3; ‡ and †† for comparison with day 7; and § and §§ for comparison with day 14.

day	1	3	7	14
GSH-CEES	0.8 \pm 0.1 §	1.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.5	0.5 \pm 0.3 *
Cys-CEES	42.9 \pm 3.3 ††§§	37.6 \pm 3.2 †§§	14.8 \pm 4.3 ***	3.9 \pm 2.0 ***††
NAC-CEES	41.0 \pm 2.9 †,††,§§	17.3 \pm 1.1 ***,††,§§	3.8 \pm 0.5 ***††	5.7 \pm 2.0 ***††
N7Qua-CEES	34.7 \pm 2.9 †††,§§	4.2 \pm 0.4 *†§§	0.8 \pm 0.1 ***†	0.3 \pm 0.1 ***††

interfering peaks.

4. Discussion

In addition to directly observable effects on skin, eyes and lungs, SM exhibits neurological and psychological effects (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Isoono et al., 2018; Sharma et al., 2009). However, most of the related observational studies were performed on veterans of Iran-Irak war (1980–88), many years after their initial exposure. It is thus not possible to distinguish between the toxic effects of SM itself on the one hand, and war stress on the other hand. Similarly, two non-exclusive origins for the neurological and pathological effects of SM and vesicants can be proposed. The first is a response to the exposure stress while the second is a diffusion of SM and CEES through the exposed skin followed by direct and indirect diffusion to the brain with resulting local effects. Thus, our group carried out an *in vivo* study on hairless SKH-1 mice topically exposed to CEES, the SM analog used in the present

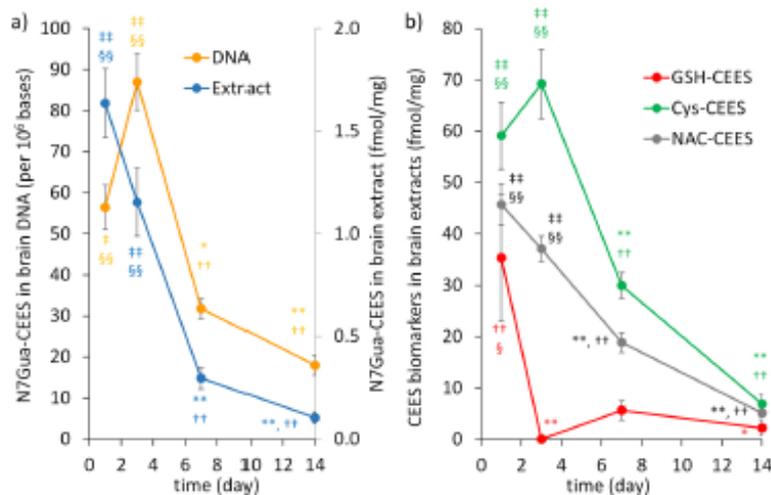


Fig. 3. Levels of biomarkers in brains of CEES exposed mice. Brains were collected after sacrifice after different periods. Half of the organ was used for DNA extraction and the other was homogenized in chloroform:methanol and extracted with water. Samples were then analysed by UHPLC-MS/MS with on-line SPE. A) Amount of N7Gua-CEES adducts measured either in the DNA of the organ (expressed in adduct per 10⁶ bases) or detected in extract of the whole organ (expressed in fmol/mg tissue) b) Concentration of GSH, Cys and NAC conjugates to CEES in brain extracts (expressed in fmol/mg). The number on animals varied from 16 to 20 per group. The reported values are the means \pm SEM. The symbols for statistical significance of the differences at $p < 0.05$ or $p < 0.01$ are: * and ** for comparison with day 1; ¹ and ¹¹ for comparison with day 3; ² and ²¹ for comparison with day 7; and ³ and ³¹ for comparison with day 14.

study, in order to clarify the origin of the behavioral effects observed in humans (Groc-Desormeaux et al., 2018). In this study, CEES-treated mice were compared with a control group burnt with hydrochloric acid. Our results evidenced that the anxiety and long-lasting working memory impairments observed in mice were due to the vesicant agent itself, and not to the burn effect or to the war stress. This conclusion is actually strongly supported by the observation that brain was one of the organs exhibiting the largest concentration of SM in a post-mortem study on an exposed Iranian soldier (Drasch et al., 1967).

Explanation to the effects of vesicants in brain can be found in a few studies showing the induction of apoptosis and oxidative stress in the brain of mice chronically exposed to SM by percutaneous route (Sharma et al., 2009). Histological and immunohistochemical analyses of brains of guinea pigs exposed to CEES by intratracheal injection showed a loss of neural cells in all brain regions, likely resulting from an activation of microglial cells by α -synuclein (Galsden-Gray et al., 2012). In spite of these biochemical modifications, no major tissue damage was reported in the brain of rats topically exposed to large doses of SM (up to 45 mg/kg) with the exception of haemorrhage (Yue et al., 2015). These results unambiguously show the presence of SM or CEES in brain of treated animals. However, they do not provide quantitative information on the kinetic of diffusion from the exposed site or on the distribution between internal organs. This is the reason why quantification of exposure and effect biomarkers represent an interesting complementary approach. Evidence that SM and its analogs diffuse in the blood stream is shown by the detection of its degradation products (Li et al., 2013; Manandhar et al., 2018; Qi et al., 2016) and of protein adducts in plasma (John et al., 2019; Liu et al., 2015; Noort et al., 2008; Xu et al., 2014). SM or CEES may also react in plasma with small molecules such as glutathione, which leads to the presence of conjugates in blood. The GSH conjugates may also be produced within cells by detoxification enzymes glutathione-S-transferases (Sheehan et al., 2001) and further excreted into biological fluids. Quantification of such biomarkers in plasma would thus reflect a systemic effect of vesicant agents because their presence in blood would originate from all organs.

Therefore, our result confirm both the diffusion of CEES from skin to blood and the subsequent exposure of internal organs. We obtained data not only on GSH-CEES, but also on Cys-CEES and NAC-CEES, two metabolites of GSH-CEES resulting from the action of several enzymes (Hanna and Anders, 2019; Wu et al., 2004). We recently developed a method for their quantification and validated their biological relevance (Roser et al., 2021). Using an improved version of this approach, we

detected large amounts of GSH-CEES metabolites in the plasma of the CEES-treated mice in the following decreasing order of concentration: Cys-CEES > NAC-CEES >> GSH-CEES. The observation of a very low concentration in GSH-CEES is in agreement with well identified features of the mercapturate pathway involved in the detoxification of electrophilic species such as CEES or SM. GSH-CEES is converted into CysGly-CEES and Cys-CEES through the consecutive actions of membrane-bound-enzymes γ glutamyl-transferase (GGT) and dipeptidase or aminopeptidase-M, respectively (Goncalves-Dias et al., 2019; Hanna and Anders, 2019). The last step of the mercapturate pathway involves the entrance of Cys-S-conjugates into the renal tubular cells and hepatocytes via various transporters including organic anion transport polypeptides and cystine/cysteine transporters (Griffith, 1981; Hanigan, 1990; Hughey et al., 1978). There, the Cys-S-conjugates are acetylated by the N-acetyl-transferase NAT3 (Chambers et al., 2010).

Another interesting observation was the confirmation of the presence of the DNA adduct N7Gua-CEES in plasma samples (Roser et al., 2021). This modified nucleic acid base may have several origins. The most likely is the depurination from DNA, which a characteristic of N7-alkylated guanine adducts (Boysen et al., 2009). Likewise, N7Gua-CEES could originate from RNA and the pool of nucleotides. These results on N7Gua-CEES are in line with those obtained with SM (Zhang et al., 2014) and further validate the use of CEES as a relevant analog of SM. In terms of time course, all the detected biomarkers were at their maximal plasma concentration at day 1 and then rapidly decreased. At day 14, the respective level of NAC-CEES and Cys-CEES was 9 and 20 % of that at day 1, while the corresponding value was 1 % for N7Gua-CEES. These data confirm results from the literature that SM readily diffuses into blood after dermal exposure (Nagy et al., 1946). These data also reflect the formation of CEES-mediated damage to biomolecules all-over the mouse organism.

To further study the latter point, we performed an untargeted metabolomics study that enabled the detection of almost 200 unique metabolites in the plasma of exposed mice. These results revealed a systemic alteration of metabolism, involving various metabolic pathways (arginine and proline metabolism, arginine biosynthesis, histidine metabolism, purine metabolism and primary bile acid synthesis,...), with the most striking differences occurring between days 1 and 3 post-exposure (Fig. 1, S1). Noteworthy is the fact that a few particular metabolites accumulate at day 1, which might reflect a self-protection effect to alleviate the injury of CEES exposure and/or inflammatory response. Among those metabolites, arginine and histidine-related

metabolites (e.g., urocanic acid, anserine, carnosine) are of special interest. Arginine analogues have been demonstrated to exhibit protective characteristics against SM poisoning (Rappeneau et al., 2000), while SM analogues were demonstrated to form covalent adducts with histidine and histidine-containing peptides (Hemme et al., 2021). Carnosine, a dipeptide composed of β -alanine and L-histidine, and its methylated analog anserine are major constituents within mammalian skeletal muscle that play key roles in muscle contraction/excitation as intracellular buffer and antioxidant (Boldyrev et al., 2013). The antioxidant activity of carnosine and related peptides has been demonstrated as well as their ability to prevent the formation of advanced lipoxidation end-products and advanced glycoxidation end-products, for instance by forming adducts with reactive lipid oxidation products (Boldyrev et al., 2013). Urocanic acid, existing as *trans* and *cis* isomers, is a breakdown (deamination) product of histidine produced by the catalytic action of histidine ammonia-lyase (Walterscheid et al., 2006). In the epidermis, it accumulates and may be both a UV protectant and an immunoregulator. *Trans*-urocanic acid upon UV light absorption is isomerized to the *cis*-isomer in the stratum corneum. *Cis*-urocanic acid can suppress cellular immunity in mice (Hug et al., 1998), and has been identified as a serotonin receptor ligand (Walterscheid et al., 2006). In addition to potential anti-inflammatory effects, recent data demonstrate that urocanic acid also promotes glutamate biosynthesis and release in various brain regions which can impact recognition memory and motor learning in mice (Zhu et al., 2018).

Beside, we also observed accumulation of hydroxyglutaric acid and glutaconic acid in the plasma of exposed mice at day 1. This is a feature commonly observed in glutaric aciduria type I caused by inherited deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase which is involved in the catabolic pathways of L-lysine, L-hydroxylysine and L-tryptophan (Kolkter et al., 2011). In this case, high levels of those organic acids can cause damage to the brain (and also other organs), but particularly the basal ganglia, which are regions that help regulate movement (Kolkter et al., 2011). Such organic acids can be detoxified by carnitine (Strauss et al., 2020). Thus, these observations might also be linked with the modulated levels of carnitine species observed upon CEES exposure (Table S1). Last, many other metabolites present at low levels at day 1 proved up-regulated at day 3. Among those are metabolites belonging to purine and pyrimidine metabolism, pentose phosphate pathway, beta-oxidation, etc., which underlines the broad systemic effect caused by CEES poisoning. Also the strong dysregulation of bile acids (taurocholic and taurodeoxycholic acid) can indicate liver dysfunction and/or an impact on gut microbiota (I. ucyzkowski et al., 2021). Of note, untargeted metabolomics does not detect CEES adducts due to insufficient detection sensitivity.

Overall, our metabolomics approach provided an unprecedented view on the impact of CEES on mouse metabolism. Metabolite profiling until 14 days post-exposure highlighted a two-wave organism response to CEES poisoning. An early phase response at day 1 that might reflect a self-protection effect through the accumulation of anti-inflammatory nucleophilic compounds precedes a more systematic effect from day 3 involving many different metabolic pathways.

Having confirmed the systemic diffusion of CEES in topically exposed SKH-1 mice, we then focused on the brain. First, in agreement with previous works on SM (Batal et al., 2014; Yue et al., 2015), we detected large amounts of N7Gua-CEES adducts in the nuclear DNA of this organ. Interestingly, the same adduct was detected in brain extracts aimed at isolating metabolites. Like in plasma, N7Gua-CEES found in these samples likely results from depurination of DNA, RNA or nucleotide pool. The formation DNA adducts is an interesting observation that could partly explain some of the neurological effects of vesicant agents. Indeed, the formation of large amounts of DNA damage has been proposed as one of the mechanisms leading to SM-mediated cell death (Debiak et al., 2009; Kehe et al., 2009; Papirmeister et al., 1985).

We also observed that brain extracts contained the three investigated metabolites resulting from the reaction of CEES with GSH. Like in

plasma, the parent molecule in this pathway, GSH-CEES, was present in the lowest amount after the first day of exposure. This observation is reminiscent of those made in *in vitro* experiment using CEES on human skin cells and skin explants (Roser et al., 2021). In contrast, Cys-CEES was the most frequent and most persistent. This clearly illustrates the efficiency of the metabolism of GSH conjugates that aims at maintaining a sufficient cellular content in this essential tripeptide (Forman et al., 2009; Griffith, 1999; Wu et al., 2004). NAC-CEES was also unambiguously detected, in amounts representing roughly 75 % of that of Cys-CEES. This is slightly unexpected since N-acetyltransferases are believed to be mostly renal and hepatic enzymes (Chambers et al., 2010; Hinchman et al., 1998). Evidence from the literature yet suggest that brain also expresses N-acetyltransferases (Hanna and Anders, 2019). Accordingly, Miller et al. (1995) observed the formation of a mercapturic acid derivative in all brain regions. More recently, the mercapturic pathway activity was also detected in the brain although with a lower efficiency than in liver (Sidell et al., 2003). An additional explanation to the observation of large amounts of NAC-CEES in brain is that this organ receives 15–20 % of the cardiac output, attesting to the high vascular demand of the brain. Thus, a part of the detected NAC-CEES could originate from the blood where it is present in large concentration as shown by the measurements in the plasma. A last observation regarding biomarkers in brain is that their concentration decreases more slowly than in plasma, with the exception of GSH-CEES. This may be explained by a longer persistence of CEES in brain than in the rest of the organism because of a larger fat content and the formation of a reservoir compartment.

5. Conclusion

The present work, based on novel experimental approaches involving untargeted metabolomics and quantification of recently validated specific molecular biomarkers, provides observations relevant to a better understanding of the occurrence of neurological and psychological disorders after exposure to vesicant agents like SM. Our work confirms that, following diffusion through skin, vesicant agents enter the blood stream and cross the hematoencephalic barrier. Then, the compounds enter the brain and induce a series of damaging processes. Our data reveals that the formation and clearance of the studied biomarkers spreads over two weeks, reflecting the persistence of the chemical in the brain. Our work also shed some light on the systemic effects of CEES, potential underlying biochemical mechanisms and especially the interest of some biomarkers. NAC-CEES and Gua-CEES were found to be those detected with the best LOD in our UHPLC-MS/MS and to persist for more than two weeks in brain and plasma. The last point is important for applications of the UHPLC-MS/MS assay to human.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the "Agence de l'Innovation de Défense" (French Defense Ministry) and the "NRBC" program of the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<http://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152950>.

References

- Abel, E.L., Babel, J.D., Simper, M.S., Powell, L., McClellan, S.A., Andreeff, M., MacLeod, M.C., DiGiovanni, J., 2011. Protection against 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) - induced cytotoxicity in human keratinocytes by an inducer of the glutathione detoxification pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 176–183.
- Balali-Mood, M., Hefazi, M., 2006. Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99, 273–282.
- Balali-Mood, M., Hefazi, M., Mahmoodi, M., Jalali, E., Attaran, D., Maleki, M., Razavi, M. E., Zare, G., Tabatabaee, A., Jafari, M.R., 2005. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 713–721.
- Batal, M., Boudry, L., Mouret, S., Wartelle, J., Emorine, S., Bertoni, M., Berard, I., Clery-Barraud, C., Douki, T., 2013. Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273, 644–650.
- Batal, M., Boudry, L., Mouret, S., Clery-Barraud, C., Wartelle, J., Berard, I., Douki, T., 2014. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278, 39–44.
- Black, R.M., Brewster, K., Clarke, R.J., Hambrook, J.L., Harrison, J.M., Howells, D.J., 1992a. Biological fate of sulphur mustard, 1,1'-dithiobis(2-chloroethane): isolation and identification of urinary metabolites following intraperitoneal administration to rat. *Xenobiotica* 22, 405–418.
- Black, R.M., Hambrook, J.L., Howells, D.J., Read, R.W., 1992b. Biological fate of sulfur mustard, 1,1'-dithiobis(2-chloroethane). Urinary excretion profiles of hydrolysis products and beta-lyase metabolites of sulfur mustard after cutaneous application in rats. *J. Anal. Toxicol.* 16, 79–84.
- Boldyrev, A.A., Al'Éni, G., Derave, W., 2013. Physiology and pathophysiology of carcinosis. *Physiol. Rev.* 93, 1803–1845.
- Boulah, S., Olivier, M.P., Aros-Gait, S., Oliveira, L., Fenaille, F., Tabet, J.C., Junot, C., 2014. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 966, 34–47.
- Boysen, G., Pachkowski, B.F., Nakamura, J., Swenberg, J.A., 2009. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat. Res.* 678, 76–94.
- Brookes, P., Lawley, P.D., 1960. The reaction of mustard gas with nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. J.* 77, 478–484.
- Chambers, J.C., Zhang, W., Lord, G.M., van der Harst, P., Lawlor, D.A., Seimi, J.S., Gale, D.P., Wms, M.N., Ahmad, K.R., Bakker, S.J.L., Beckmann, J., Bilo, H.J.G., Bochud, M., Brown, M.J., Caulfield, M.J., Connell, J.M.C., Cook, H.T., Colucci, L., Smith, G.D., de Silva, R., Deng, G., Devuyt, O., Dikkeschei, L.D., Dimkovic, N., Dockrell, M., Dominczak, A., Ebrahim, S., Eggermann, T., Farrell, M., Ferrucci, L., Floege, J., Foucni, N.G., Gansevoort, R.T., Han, X., Hedblad, B., van der Heide, J.J.H., Hejblum, B.G., Hernandez-Puentes, M., Hyppönen, E., Johnson, T., de Jong, P. E., Kleefstra, N., Lagou, V., Lapsley, M., Li, Y., Loo, R.J.F., Luani, J., Luttrupp, K., Marchal, C., Melander, O., Munroe, P.B., Nordfors, L., Parsa, A., Peltonen, L., Pentz, B.W., Perucha, E., Pouta, A., Prokopenko, I., Roderick, P.J., Ruokonen, A., Samani, N.J., Sanna, S., Schalling, M., Schlesinger, D., Schlieper, G., Seelen, M.A.J., Shuldiner, A.R., Sjogren, M., Smit, J.H., Snieder, H., Soranzo, N., Spector, T.D., Steinvik, P., Stenborg, M.J.E., Swaminathan, R., Tanaka, T., Ubiak-Velmaut, L.J., Uda, M., Volkenweider, P., Wallace, C., Waterworth, D., Zerres, K., Waechter, G., Wareham, N.J., Maxwell, P.H., McCarthy, M.L., Jarvelin, M.-R., Mooser, V., Abecasis, G.R., Lightstone, L., Scott, J., Navis, G., Elliott, P., Kooner, J.S., 2010. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 42, 373–375.
- Chen, B., Yu, H.-L., Liu, S.-L., Liu, C.-C., Liang, L.-H., Li, X.-H., Li, X.-S., Wu, J.-N., Yang, Y., 2019. A sensitive quantification approach for detection of HETE-CP adduct after benzyl chloroformate derivatization using ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 3405–3415.
- Chileot, R.P., Jenner, J., Carrick, W., Hotchkiss, S.A.M., Rice, P., 2000. Human skin absorption of bis-2-(chloroethyl)sulphide (sulphur mustard) *in vitro*. *J. Appl. Toxicol.* 20, 349–355.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I. Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S., Xia, J., 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 46, W486–W494.
- Callumbine, H., 1947. Medical aspects of mustard gas poisoning. *Nature* 159, 151–153.
- Darchini-Maragheh, E., Nemati-Karimoo, H., Hasanabadi, H., Balali-Mood, M., 2012. Delayed neurological complications of sulphur mustard and Tabun poisoning in 43 Iranian veterans. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 111, 426–432.
- Davison, C., Rozman, R.S., Smith, P.K., 1961. Metabolism of bis-beta-chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas). *Biochem. Pharmacol.* 7, 65–74.
- Debiak, M., Kehe, K., Burkle, A., 2009. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity. *Toxicology* 263, 20–25.
- Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A., Cadet, J., 2004. Predominance of the 1,N,2-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 62–70.
- Drasch, G., Kretschmer, E., Kauer, G., von Meyer, L., 1987. Concentrations of mustard gas [bis(2-chloroethyl)sulfide] in the tissues of a victim of a vesicant exposure. *J. Forensic Sci.* 32, 1788–1793.
- Fidder, A., Moes, G.W.H., Scheffer, A.G., Vanderschans, G.P., Baan, R.A., Dejong, L.P.A., Benschop, H.P., 1994. Synthesis, characterization and quantitation of the major adducts formed between sulfur mustard and DNA of calf thymus and human blood. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 199–204.
- Forman, H.J., Zhang, H.Q., Riina, A., 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Asp. Med.* 30, 1–12.
- Gadsden-Gray, J., Mukherjee, S., Ogunkua, O., Das, S.K., 2012. Induction of neuronal damage in guinea pig brain by intratracheal infusion of 2-chloroethyl ethyl sulfide, a mustard gas analog. *J. Biochem. Molec. Toxicol.* 26, 23–30.
- Giacomini, F., Le Corquille, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Peters, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.F., Jacob, D., Goulitquer, S., Thevenot, E.A., Caron, C., 2015. WorkflowMetabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31, 1493–1495.
- Gonçalves-Dias, C., Morello, J., Correia, M.-J., Coelho, Nuno R., Antunes, Alexandra M. M., Macedo, Maria P., Monteiro, Emília C., Soto, K., Pereira, Sofia A., 2019. Mercapturate pathway in the tubulocentric perspective of diabetic kidney disease. *Nephron* 143, 17–23.
- Griffith, O.W., 1981. The role of glutathione turnover in the apparent renal secretion of cystine. *J. Biol. Chem.* 256, 12263–12268.
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 922–935.
- Gros-Descormieux, F., Beracocha, D., Dorandeu, F., Pierard, C., 2018. Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice. *Toxicol. Lett.* 293, 73–76.
- Hanigan, M.H., 1998. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathione: Its expression and function in carcinogenesis. *Chem.-Biol. Interact.* 111–112, 333–342.
- Hanna, P.E., Anders, M.W., 2019. The mercapturate acid pathway. *Crit. Rev. Toxicol.* 49, 819–929.
- Hezme, M., Fidder, A., van der Riet-van Oeveren, D., van der Schans, M.J., Noort, D., 2021. Mass spectrometric analysis of adducts of sulfur mustard analogues to human plasma proteins: approach towards chemical provenancing in biomedical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 413, 4023–4036.
- Hinchman, C.A., Rebbecq, J.F., Ballatori, N., 1998. Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturate acid. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 275, G612–G619.
- Hug, D.H., Hunter, J.K., Dunkerson, D.D., 1998. The potential role for urocanic acid and sunlight in the immune suppression associated with protein malnutrition. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 44, 117–123.
- Hughey, R.P., Rankin, B.B., Eloc, J.S., Curthoys, N.P., 1978. Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturate acid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 211–217.
- Husain, K., Dube, S.N., Sugendran, K., Singh, R., DasGupta, S., Somani, S.M., 1996. Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats. *J. Appl. Toxicol.* 16, 245–248.
- Isono, O., Kitada, A., Fujii, M., Yoshinaka, T., Nakagawa, G., Suzuki, Y., 2018. Long-term neurological and neuropsychological complications of sulfur mustard and Lewisite mixture poisoning in Chinese victims exposed to chemical warfare agents abandoned at the end of WWII. *Toxicol. Lett.* 293, 9–15.
- Jafari, M., 2007. Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology* 231, 30–39.
- John, H., Koller, M., Worek, F., Thiermann, H., Siebert, M., 2019. Forensic evidence of sulfur mustard exposure in real cases of human poisoning by detection of diverse albumin-derived protein adducts. *Arch. Toxicol.* 93, 1881–1891.
- Kehe, K., Thiermann, H., Balszweil, F., Eyer, F., Steinritz, D., Ziller, T., 2009. Acute effects of sulfur mustard injury-Munich experiences. *Toxicology* 263, 3–8.
- Kinsey, V.E., Grant, W.M., 1947. Action of mustard gas and other poisons on yeast cells: study of the relationship between inhibition of carbohydrate metabolism and inhibition of growth by various poisons, and effects of other toxic agents on yeast. *J. Cell. Physiol.* 30, 31–42.
- Koller, S., Christensen, E., Leonard, J.V., Greenberg, C.R., Boneh, A., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Dixon, M., Duran, M., Garcia Cascela, A., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Kyllerman, M., Muhlhausen, C., Muller, E., Okun, J.G., Wilken, B., Hoffmann, G.F., Buegard, P., 2011. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I-revised recommendations. *J. Inher. Metab. Dis.* 34, 677–694.
- Kuklenski, Z., Calafat, A.M., Barr, J.R., Finkle, J.L., 2011. Design of online solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) hyphenated systems for quantitative analysis of small organic compounds in biological matrices. *J. Sep. Sci.* 34, 3606–3618.
- Lanks, K.W., Turnbull, J.D., Aloyo, V.J., Doewin, J., Papiremeister, B., 1975. Sulfur mustards induce neurite extension and acetylcholinesterase synthesis in cultured neuroblastoma-cells. *Exp. Cell Res.* 93, 355–362.
- Li, C., Chen, J., Liu, Q., Xie, J., Li, H., 2013. Simultaneous quantification of seven plasma metabolites of sulfur mustard by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B* 917–918, 100–107.
- Liu, C.C., Liang, L.H., Xiang, Y., Yu, H.L., Zhou, S.X., Xi, H.L., Liu, S.L., Liu, J.Q., 2015. An improved method for retrospective quantification of sulfur mustard exposure by detection of its albumin adduct using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 7037–7046.
- Liu, Y., Song, Z., Chen, X., Zhu, Z., Zhang, L., Hong, Z., Chai, Y., 2020. Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolomics revealed the protective effect of tea polyphenols on sulfur mustard-induced injury in rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 186, 113278.
- Luczyłowski, K., Warmuzińska, N., Bojko, B., 2021. Current approaches to the analysis of bile and the determination of bile acids in various biological matrices as supportive tools to traditional diagnostic testing for liver dysfunction and biliary diseases. *Trends Anal. Chem.* 142, 116307.
- Malik, D.M., Rhoades, S., Welje, A., 2018. Extraction and analysis of pan-metabolome polar metabolites by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Bio. Protoc.* 8.
- Manandhar, E., Pay, A., Veress, L.A., Logue, R.A., 2018. Rapid analysis of sulfur mustard oxide in plasma using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry for diagnosis of sulfur mustard exposure. *J. Chrom. A* 1572, 106–111.

- Meng, W.Q., Zhang, H., Xiao, L., Chen, X.T., Sun, M.X., Xu, Q.Q., Cao, Y.R., Xiao, K., Li, Z.J., 2019. Visualization of sulfur mustard in living cells and whole animals with a selective and sensitive turn-on fluorescent probe. *Sens. Actuators B Chem.* 296.
- Miller, R.T., Lau, S.S., Mouka, T.J., 1995. Metabolism of 5-(Glutathione-S-Yl)-Alpha-Methylglutamine following intracerebroventricular administration to male sprague-dawley rats. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 634–641.
- Misliain, T., Soderstrom, M., Popescu, L., Vanninen, P., 2010. Evaluation of a chemical munition dumpsite in the Baltic Sea based on geophysical and chemical investigations. *Sci. Total Environ.* 408, 3536–3553.
- Moreau, R., Claria, J., Aguilar, F., Fenaile, F., Lozano, J.J., Junot, C., Colach, B., Caraceni, P., Treščićka, J., Pavasi, M., Alessandria, C., Neves, F., Saliba, F., Welzel, T.M., Albillos, A., Gustot, T., Fernandez, J., Moreno, C., Baldassarre, M., Zacherini, G., Piano, S., Montagnese, S., Vargas, V., Genesca, J., Sola, E., Bernal, W., Butin, N., Hautbergue, T., Cholet, S., Castelli, F., Jansen, C., Steib, C., Campion, D., Mookerjee, R., Rodriguez-Gandia, M., Soriano, G., Durand, F., Benzen, D., Banares, R., Stauber, R.E., Gronbaek, H., Coenraad, M.J., Gines, P., Gerbes, A., Jalan, R., Bernardi, M., Arroyo, V., Angeli, P., Consortium, C.S.Lo.L.E.C., Grifols, C., European Foundation for the Study of Chronic Liver, F., 2020. Blood metabolomics uncovers inflammation-associated mitochondrial dysfunction as a potential mechanism underlying ACLF. *J. Hepatol.* 72, 688–701.
- Mukherjee, S., Stone, W.L., Yang, H., Smith, M.G., Das, S.K., 2009. Protection of half sulfur mustard gas-induced lung injury in guinea pigs by antioxidant liposomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 23, 143–153.
- Mukhopadhyay, S., Rajaratnam, V., Mukherjee, S., Smith, M., Das, S.K., 2006. Modulation of the expression of superoxide dismutase gene in lung injury by 2-chloroethyl ethyl sulfide, a mustard analog. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20, 142–149.
- Nagy, S.M., Golumbic, C., Stein, W., Pruton, J.S., Bergmann, M., 1946. The penetration of vesicant vapors into human skin. *J. Gen. Physiol.* 29, 441–469.
- Nie, Z.Y., Liu, Q., Xie, J.W., 2011. Improvements in monitoring the N-terminal valine adduct in human globin after exposure to sulfur mustard and synthesis of reference chemicals. *Talanta* 55, 1154–1159.
- Nobakht, B.F., Alimnejad, R., Rezaei-Tavirani, M., Arefi Oskouie, A., Naseri, M.T., Parastar, H., Aliakbarzadeh, G., Fathi, F., Taheri, S., 2016. NMR- and GC/MS-based metabolomics of sulfur mustard exposed individuals: a pilot study. *Biomarkers* 21, 479–489.
- Nobakht, B.F.M.G., Arefi Oskouie, A., Rezaei-Tavirani, M., Alimnejad, R., Taheri, S., Fathi, F., Taghi Naseri, M., 2017. NMR spectroscopy-based metabolomic study of serum in sulfur mustard exposed patients with lung disease. *Biomarkers* 22, 413–419.
- Noort, D., Fiddler, A., Degenhardt-Langelan, C., Hulst, A.G., 2008. Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study. *J. Anal. Toxicol.* 32, 25–30.
- Pantazides, B.G., Quinones-Gonzalez, J., Nazario, D.M.R., Crow, B.S., Perez, J.W., Blake, T.A., Johnson, R.C., 2019. A quantitative method to detect human exposure to sulfur and nitrogen mustards via protein adducts. *J. Chrom. B* 1121, 9–17.
- Papirmeister, B., Gross, C.J., Meier, H.L., Petrali, J.P., Johnson, J.B., 1985. Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5, 134–149.
- Paromov, V., Suntes, Z., Smith, M., Stone, W.L., 2007. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *J. Burns Wounds* 7, 60–85.
- Paromov, V., Qai, M., Yang, H., Smith, M., Stone, W.L., 2008. The influence of N-acetyl-L-cysteine on oxidative stress and nitric oxide synthesis in stimulated macrophages treated with a mustard gas analogue. *BMC Cell Biol.* 9.
- Paromov, V., Kumari, S., Brannon, M., Kanaparthi, N.S., Yang, H., Smith, M.G., Stone, W.L., 2011. Protective effect of liposome-encapsulated glutathione in a human epidermal model exposed to a mustard gas analog. *J. Toxicol.* 2011, 1–11.
- Pohanka, M., Sobocka, J., Stetina, R., 2011. Sulfur mustard induced oxidative stress and its alteration by epigallocatechin gallate. *Toxicol. Lett.* 201, 105–109.
- Pohanka, M., Stetina, R., Svobodova, H., Ruttkay-Nedecy, B., Jilkova, M., Sochor, J., Sobocka, J., Adam, V., Kizek, R., 2013. Sulfur mustard causes oxidative stress and depletion of antioxidants in muscles, livers, and kidneys of Wistar rats. *Drug Chem. Toxicol.* 36, 270–276.
- Qi, M., Xu, B., Wu, J., Zhang, Y., Zong, C., Chen, J., Guo, L., Xie, J., 2016. Simultaneous determination of sulfur mustard and related oxidation products by isotope-dilution LC-MS/MS method coupled with a chemical conversion. *J. Chrom. B* 1028, 42–50.
- Rappeneau, S., Baeza-Squiban, A., Marano, F., Calvet, J., 2000. Efficient protection of human bronchial epithelial cells against sulfur and nitrogen mustard cytotoxicity using drug combinations. *Toxicol. Sci.* 58, 153–160.
- Ravanat, J.L., Douki, T., Duez, P., Grenaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, I., Saint-Pierre, C., Favier, A., Cadet, J., 2002. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 23, 1911–1918.
- Romano, J.A., Lukey, B.J., Salem, H., 2008. *Chemical Warfare Agents: Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics*, 2nd ed. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Roser, M., Beal, D., Eldia, C., Gudimard, L., Caffia, F., Gros-Desormieux, F., Leonco, D., Fenaile, F., Junot, C., Piersard, C., Douki, T., 2021. Glutathione conjugates of the mercapturic acid pathway and guanine adduct as biomarkers of exposure to CEES, a sulfur mustard analog. *Anal. Bioanal. Chem.* 413, 1337–1351.
- Rowell, M., Kehe, K., Balszuweit, F., Thiermann, H., 2009. The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology* 263, 9–11.
- Sawyer, T.W., 1999. Toxicity of sulfur mustard in primary neuron culture. *Toxicol. In Vitro* 13, 249–258.
- Sezgen, S., Kenar, I., 2020. Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. *Toxicol. Lett.* 320, 52–57.
- Sharma, D.R., Sunkaria, A., Bal, A., Bhutia, Y.D., Vijayaraghavan, R., Flora, S.J.S., Gill, K. D., 2009. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of proapoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 208–218.
- Sherhan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shohrati, M., Aslani, J., Eshraghi, M., Alandizi, F., Ghanei, M., 2008. Therapeutics effect of N-acetyl cysteine on mustard gas exposed patients: evaluating clinical aspect in patients with impaired pulmonary function test. *Respir. Med.* 102, 443–448.
- Siddell, K.R., Montine, K.S., Picklo, M.J., Olsen, S.J., Amarnath, V., Montine, T.J., 2003. Mercapturate metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in rat and human cerebrum. *J. Neurochem. Exp. Neurol.* 62, 146–153.
- Strauss, K.A., Williams, K.R., Carson, V.J., Poskitt, L., Bowser, L.E., Young, M., Robinson, D.L., Hendrickson, C., Beller, K., Taylor, C.M., Haas-Givler, B., Hailey, J., Chopko, S., Puffenberger, E.G., Brigatti, K.W., Miller, F., Morton, D.H., 2020. Glutaric acidemia type I: treatment and outcome of 168 patients over three decades. *Mol. Genet. Metab.* 131, 325–340.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholson, A.W., Reily, M. D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Chemical Analysis Working Group (CAWG) metabolomics standards initiative (MSI). Metabolomics* 3, 211–221.
- Talbot, M., Bressa, C., Garcia-Merino, J.A., Moreno-Perez, D., Van, E.C., Castell, F.A., Fenaile, F., Larrosa, M., 2021. The effect of acute moderate-intensity exercise on the serum and fecal metabolomes and the gut microbiota of cross-country endurance athletes. *Sci. Rep.* 11, 3558.
- Talabani, J.M., Ali, A.I., Kadir, A.M., Rashid, R., Samin, F., Greenwood, D., Hay, A.W.M., 2018. Long-term health effects of chemical warfare agents on children following a single heavy exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 37, 836–847.
- Tewari-Singh, N., Agarwal, C., Huang, J., Day, B.J., White, C.W., Agarwal, R., 2011. Efficacy of glutathione in ameliorating sulfur mustard analog-induced toxicity in cultured skin epidermal cells and in SKH-1 mouse skin in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 450–459.
- Thomsen, A.B., Eriksen, J., Smidt-Nielsen, K., 1998. Chronic neuropathic symptoms after exposure to mustard gas: a long-term investigation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 39, 187–190.
- Turnbull, J.D., Aloyo, V.J., Papirmeister, B., 1973. Induction of axon growth and increased acetylcholinesterase production in mouse neuroblastoma cell by sulfur mustard. *Proc. Feder. Amer. Soc. Exp. Biol.* 32, 573.
- Vanninen, P., Outin, A., Beldowski, J., Pedersen, E.A., Soderstrom, M., Szulbka, M., Grabowski, M., Siedlewicz, G., Crub, M., Popiel, S., Dziedzic, D., Jakacki, J., Paczek, B., Nawala, J., 2020. Exposure status of sea-dumped chemical warfare agents in the Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.* 161.
- Varmazyar, M., Kianmehr, Z., Faghizadeh, S., Ghazanfari, T., Ardestani, S.K., 2019. Time course study of oxidative stress in sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced toxicity. *Int. Immunopharmacol.* 73, 81–93.
- Walterscheid, J.P., Nghiem, D.X., Kazimi, N., Nutt, L.K., McCoskey, D.J., Norval, M., Ulleth, S.E., 2006. Cis-urocanic acid, a sunlight-induced immunosuppressive factor, activates immune suppression via the 5-HT2A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17420–17425.
- Wattana, M., Bey, T., 2009. Mustard gas or sulfur mustard: an old chemical agent as a new terrorist threat. *Prehosp. Disaster Med.* 24, 19–29.
- Wu, G.Y., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134, 489–492.
- Xu, H., Nie, Z., Zhang, Y., Li, C., Yue, L., Yang, W., Chen, J., Dong, Y., Liu, Q., Lin, Y., Wu, B., Feng, J., Li, H., Guo, L., Xie, J., 2014. Four sulfur mustard exposure cases: overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring. *Toxicol. Rep.* 1, 533–543.
- Yue, L.J., Zhang, Y.J., Chen, J., Zhao, Z.M., Liu, Q., Wu, R.Q., Guo, L., He, J., Zhao, J., Xie, J.W., Peng, S.Q., 2015. Distribution of DNA adducts and corresponding tissue damage of sprague-dawley rats with percutaneous exposure to sulfur mustard. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 532–540.
- Zhang, Y.J., Yue, L.J., Nie, Z.Y., Chen, J., Guo, L., Wu, B.D., Feng, J.L., Liu, Q., Xie, J.W., 2014. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B* 961, 29–35.
- Zhu, H., Wang, N., Yao, L., Chen, Q., Zhang, R., Qian, J., Hou, Y., Guo, W., Fan, S., Liu, S., Zhao, Q., Du, F., Zuo, X., Guo, Y., Xu, Y., Li, J., Xue, T., Zhong, K., Song, X., Huang, G., Xiong, W., 2018. Moderate UV exposure enhances learning and memory by promoting a novel glutamate biosynthetic pathway in the brain. *Cell* 173 (1716–1727), e1717.

Quantification de biomarqueurs d'exposition à des agents vésicants dans des matrices biologiques facilement accessibles.

Dans le domaine de la menace chimique l'un des principaux enjeux consiste à avoir accès à des méthodes de suivi biologique pour l'identification des toxiques et l'évaluation de l'exposition individuelle. L'ypérite (gaz moutarde), un toxique de guerre de la famille des vésicants, et son analogue le CEES seront au centre de cette thèse. Cette étude vise à mettre en place une méthode analytique spécifique à l'ypérite, sensible, capable de quantifier des biomarqueurs d'exposition persistants, présents dans les fluides biologiques et adaptés à une analyse par couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS). A travers diverses expérimentations biologiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*, nous avons obtenus des résultats cohérents permettant de conclure sur la pertinence de certains biomarqueurs. L'adduit de l'ADN, N7Guanine-CEES, a été détecté pour tous les modèles utilisés. Dans le plasma de souris, il est persistant jusqu'à 14 jours. Le conjugué au glutathion, GSH-CEES, est éphémère et proche des limites de détection puisqu'il est rapidement transformé en conjugué à la cystéine, Cys-CEES. La quantité de Cys-CEES est élevée par rapport aux autres biomarqueurs quel que soit le modèle biologique mais son analyse est complexe de par son caractère polaire et la présence d'interférents. Ce conjugué est transformé en conjugué à l'acide mercapturique. NAC-CEES a été détecté que lors d'une exposition *in vivo* mais pas *in vitro*. Il est persistant pendant deux semaines. Une simple adaptation de la méthode analytique pour les biomarqueurs du CEES a été faite pour les biomarqueurs de l'ypérite en intégrant la SPE en ligne. Cette méthode validée permet de détecter rapidement dans le plasma humain les biomarqueurs de l'ypérite Cys-Yp, NAC-Yp et N7Gua-Yp. Notre travail a donc permis de valider de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux vésicants et a apporté de informations sur le métabolisme de ces agents toxiques.

Quantification of biomarkers of exposure to vesicant agents in easy to collect biological matrices.

Use of chemical warfare agents is a current concern shown in several recent conflicts (Iraq and Syria) and associated to terrorist threat. Availability of biomonitoring assays for the identification of toxic compounds and assessment of individual exposure is an important challenge. Sulphur mustard, a chemical warfare agents belonging to the vesicants family, and its analog CEES will be the focus of this PhD work. In the present work, we developed a sensitive non-invasive ultra-high-pressure liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry approach (UHPLC-MS/MS) to quantify specific and persistent biomarkers. We also performed biological experiments, *in vivo* and *in vitro*, to validate their use as biomarkers. A DNA adduct, N7Guanine-CEES was detected, both in nuclear DNA and as depurinated base, in all biological experiments. In particular, in the plasma of mice, it is persistent until fourteen days. The glutathione conjugate, GSH-CEES, is short-lived and closed to the limit of detection because it is readily converted into the cysteine conjugate, Cys-CEES. The quantity of Cys-CEES is high compared to the other biomarkers but it could be tricky to analyse it because of its polar properties and the presence of interfering substances. Cys-CEES is converted into the mercapturate acid conjugate. NAC-CEES was detected *in vivo* in exposed mice but not in skin *in vitro* models. It is persistent at least for two weeks. The analytical method used for the CEES biomarkers was adapted for the sulphur mustard biomarkers and improved by an on-line Solid Phase Extraction (SPE). This validated method allows for detecting in human plasma biomarkers of sulphur mustard Cys-Yp, NAC-Yp and N7Gua-Yp in eleven minutes including the online SPE step. In summary, our work allowed us to validate new biomarkers of exposure to vesicants and provided information on the metabolism of these toxic agents.