



HAL
open science

Etude des atteintes cutanées et cérébrales induites par l'ypérite, un agent chimique de guerre vésicant : pertinence et intérêt de son analogue CEES

Fanny Gros-Desormeaux

► To cite this version:

Fanny Gros-Desormeaux. Etude des atteintes cutanées et cérébrales induites par l'ypérite, un agent chimique de guerre vésicant : pertinence et intérêt de son analogue CEES. Toxicologie et chaîne alimentaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ025 . tel-03727155

HAL Id: tel-03727155

<https://theses.hal.science/tel-03727155>

Submitted on 19 Jul 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.

Etude des atteintes cutanées et cérébrales
induites par l'ypérite, un agent chimique
de guerre vésicant :

Pertinence et intérêt de son analogue CEES

*Cutaneous and cerebral effects of Sulfur Mustard, a chemical vesicant
warfare agent: relevance and interest of its analog CEES*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Toxicologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Vésicants, Département de Toxicologie et
Risques Chimiques, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA)**, sous la
direction de **Christophe PIÉRARD**, Professeur, chef de l'unité Vésicants

Thèse soutenue à Paris, le 24 juin 2022, par

Fanny GROS-DÉSORMEAUX

Composition du Jury

François COUDORÉ Professeur des Universités - praticien hospitalier - Université Paris-Saclay	Président
Sylvie CRAUSTE-MANCIET Professeure des Universités - praticienne hospitalière – CNRS, Université de Bordeaux	Rapporteur & Examinatrice
Jean-Jacques RISSO Docteur, HDR, Equipe Résidente de Recherche Subaquatique Opérationnelle, Toulon – Université Lyon I	Rapporteur & Examineur
Laurent TAYSSE Docteur - DGA maîtrise NRBC, Vert-le-Petit	Examineur
Christophe PIÉRARD Professeur des Universités - Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge	Directeur de thèse

Titre : Etudes des atteintes cutanées et cérébrales induites par l'ypérite, un agent chimique de guerre vésicant : Pertinence et intérêt de son analogue CEES

Mots clés : ypérite, CEES, peau, connexine-43, cerveau, effets comportementaux

Résumé : L'ypérite, ou gaz moutarde (HD), est un agent chimique de guerre vésicant utilisé pour la première fois en 1917. L'ypérite affecte de nombreux organes dont les yeux, les poumons et la peau sur laquelle elle induit des phlyctènes caractéristiques de son intoxication. De plus, plusieurs publications décrivent des effets psychiques chez des victimes ayant été exposées à l'ypérite. Son utilisation est prohibée par la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC). Elle est uniquement possible à des fins de recherche, dans des laboratoires habilités, dont l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA). De ce fait, de nombreux laboratoires sont contraints de substituer l'ypérite par des analogues tels que le 2-chloroéthyl-éthylsulfide (CEES), très proche structurellement. Cette thèse comporte deux parties en lien avec l'ypérite : une partie cutanée et une partie cérébrale.

Dans le cadre de la partie cutanée, nous avons tout d'abord mis au point un protocole d'exposition aux vapeurs de CEES sur des souris SKH-1 afin d'induire des lésions semblables à celles provoquées par l'ypérite. Nous avons ensuite comparé plusieurs paramètres physiologiques et cutanés (taille des lésions, perte insensible en eau, hydratation, couleur) et effectué des analyses d'histologie et de biologie moléculaire à partir de biopsies de peau. Les résultats ont montré que le CEES et l'ypérite induisent tous deux des nécroses profondes. Cependant, le stade nécrotique a été atteint plus rapidement avec l'ypérite qu'avec le CEES (J1 vs J3 post-exposition). De plus, l'intensité des lésions induites par l'ypérite était plus forte notamment en termes d'inflammation. Malgré cela, les lésions induites avec les deux agents ont abouti à un état lésionnel similaire en fin de procédure (J14 post-exposition). Par ailleurs, la Cx-43, protéine ubiquitaire impliquée dans la cicatrisation cutanée, était dérégulée avec les deux agents. Cette dérégulation de la Cx-43 pourrait

ainsi participer à la chronicité des lésions. Le CEES semble donc être un analogue pertinent de l'ypérite pour évaluer de nouveaux traitements. Afin d'accélérer la cicatrisation des lésions induites par le CEES, nous avons choisi de réguler négativement la Cx-43 à l'aide d'un ARN antisens anti Cx-43 et du peptide ACT1. Ces deux molécules candidates ont été appliquées quotidiennement par voie topique, jusqu'à J3. Cependant, les résultats ont montré que les molécules étudiées n'ont pas permis d'accélérer la cicatrisation cutanée. Un changement de mode d'administration pourrait permettre d'améliorer la biodisponibilité de ces molécules.

Dans le cadre de la partie cérébrale, nous avons exposé par voie cutanée des souris C57/Bl6J au CEES pur ou dilué ainsi qu'à de l'acide chlorhydrique (témoin brûlure). Les performances cognitives et le statut émotionnel des souris ont ensuite été évalués grâce à des tests comportementaux standardisés réalisés jusqu'à J5. Les résultats ont montré que contrairement aux autres groupes, les souris exposées au CEES pur présentaient un état anxieux dans les tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'open-field. De plus, un déficit en mémoire de travail a été observé dans le test du labyrinthe en T. Parallèlement, une étude analytique a mis en évidence la présence d'adduits du CEES dans les cerveaux de souris SKH-1 exposées par voie cutanée. La présence d'adduits cérébraux pourrait être liée aux effets comportementaux observés. Une étude de corrélation entre le taux d'adduits cérébraux et les performances des souris serait nécessaire pour explorer cette hypothèse.

Nos travaux de thèse ont donc permis de mettre au point un modèle d'exposition aux vapeurs de CEES et d'évaluer la pertinence et l'intérêt du CEES en tant qu'analogue de l'ypérite. En conclusion, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherches sur les effets physiopathologiques de l'ypérite et de ses contremesures médicales.

Title: Cutaneous and cerebral effects of Sulfur Mustard, a chemical vesicant warfare agent: relevance and interest of its analog CEES

Keywords: sulfur mustard, CEES, skin, connexin-43, brain, behavioral effects

Abstract: Sulfur mustard (SM), also called mustard gas, is a chemical warfare vesicant agent, used for the first time in 1917. SM affects many organs such as lungs, eyes and skin. Skin blisters are characteristic of vesicant intoxication. Moreover, many publications describe psychic disorders in exposed victims. SM use is prohibited by the Chemical Weapons Convention (CWC). Its use is only allowed for research purposes, in authorized laboratories, such as Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA). Consequently, many laboratories need to substitute SM by analogs such as the 2-chloroethyl-ethylsulfide (CEES), structurally close to SM. This thesis is divided into two topics: cutaneous and cerebral effects of SM.

Regarding the cutaneous topic, we firstly developed a skin exposure protocol with CEES vapors in SKH-1 mice in order to induce lesions similar to those of SM. Secondly, we compared several physiological and cutaneous parameters (size of lesions, transepidermal water loss, hydration, color) and performed histology and molecular biology analysis from skin biopsies. Results showed that CEES and SM both induce deep necrosis. However, necrosis is reached earlier with SM than CEES (D1 vs D3 post-exposure). In addition, the intensity of the SM-induced skin lesions was higher, mainly in term of inflammation. However, the healing status was similar for both agents at the end of the experiment (D14 post-exposure). Furthermore, Cx-43, a ubiquitous protein implied in skin healing, was dysregulated with both agents. This dysregulation could participate in the chronicity of the lesions. According to these results, CEES

seems to be a relevant analog of SM to assess new therapeutics. In order to accelerate the healing of CEES-induced skin lesions, we chose to downregulate the Cx-43 with a Cx-43 asODN and the ACT1 peptide. These two molecules were daily topically applied, until D3 post-exposure. However, results showed that they did not accelerate healing. A modification of the administration mode could enhance the bioavailability of these molecules.

Regarding the cerebral topic, we exposed C57/Bl6J mice skin to neat or diluted CEES, and to hydrochloric acid (burn control). Cognitive performance and emotional status were then assessed thanks to standardized behavioral tests up to D5 post-exposure. Results showed that unlikely to other groups, neat CEES mice exhibited anxiety in the elevated plus-maze and in the open-field test. Moreover, a working memory impairment was observed in the T-maze test. Furthermore, analytical study evidenced the presence of CEES adducts in mice brain after skin exposure. Thus, the presence of brain adducts could be linked to the observed cognitive and emotional effects. A correlation study between adducts levels and mice performance evaluated in behavioral tests would be necessary to explore this hypothesis.

Our works allowed to develop a model of CEES vapors exposure and to evaluate the relevance and interest of CEES as an SM-analog. In conclusion, our results offer new perspectives in pathophysiological researches on SM and its medical countermeasures.

Remerciements

En premier lieu je souhaite remercier avec beaucoup de respect les membres de mon jury de thèse. Je remercie le Professeur François Coudoré, d'accepter de présider le jury. Je remercie le Professeur Sylvie Crauste-Manciet et le Docteur Jean-Jacques Risso, qui me font l'honneur d'être rapporteurs. Je remercie également le Docteur Laurent Taysse pour le temps consacré à l'examen de ma thèse.

J'adresse toute ma gratitude et mon profond respect au Pharmacien Général Haude Tymen, directrice de l'IRBA, et au Pharmacien chef des services Frédéric Dorandeu, directeur adjoint, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le Pharmacien en Chef Christophe Piérard, chef de l'Unité Vésicants et Directeur de cette thèse. Mon Colonel, ces années sous votre direction ont été très enrichissantes, scientifiquement mais également humainement. Vous avez partagé avec moi vos connaissances et passions dans de nombreux domaines : scientifiques, militaire, historique. C'est grâce à votre passion pour les sciences cognitives et comportementales ainsi qu'à vos précédentes collaborations scientifiques que l'unité aura pu être relancée. Vous avez été en permanence disponible, que ce soit pour échanger ou effectuer vos « corrections millimétriques ». Je tiens sincèrement à vous remercier de m'avoir offert cette possibilité de faire cette thèse, qui plus est dans les meilleures conditions possibles.

Je souhaite remercier également le Dr Fanny Caffin, pour sa gentillesse, son aide, sa disponibilité, ses conseils et nos nombreuses discussions sur tous les sujets (sciences, travaux, photos, mariage... !). L'unité Vésicants a encore de nombreux projets devant elle !

Je remercie l'ensemble de la cellule technique du Département TRC (Virginia, Alexandre, Julie, Méliati, Anne-Julie, Charlotte, Gwladys, Clara, Fabien, Thomas) qui soutient nos recherches, que ce soit de façon directe ou indirecte, et en particulier Alexandre Igert, pour m'avoir aidée dans les expérimentations et apporté son soutien.

Je remercie le Dr Florian Nachon, chef du Département TRC, pour tous ses conseils avisés et sa grande expertise dans le domaine NRBC.

Je remercie tous les membres des unités Neurotoxiques et Recherche en réanimation toxicologique (Xavier, José, Janek, Milica, Guilhem, Anne-Sophie, Marilène, Karine, Greg, Julie, Nina, Aurélie, Chloé, Florent, Nicolas, Moussa) pour m'avoir distillé leurs conseils et soutiens et apporté de l'humour, notamment au café du matin. Je remercie en particulier la Pharmacienne Principale Aurélie Nervo, arrivée en même temps que moi à l'IRBA (je nous revois faire notre circuit d'arrivée avec le PhC Piérard, puis à la FMI... !). Merci de ta gentillesse au quotidien, de nos discussions et defriefings des mardis, n'en déplaise à José ! Merci à Esther, notre secrétaire qui veille affectueusement sur chacun de nous.

Merci au Dr Laure Barbier cheffe de l'unité Biologie Moléculaire, et au Dr Krizstina Nikovics, de l'unité Imagerie, pour avoir pris le temps de me former et de répondre à mes questions. Merci pour votre aide et votre gentillesse. Merci également à la Pharmacienne en Cheffe Anne-Laure Favier, cheffe de l'unité Imagerie, aux techniciennes Nathalie Guatto et Catherine Rousseau, aux techniciens Cédric Castellarin et Xavier Butigieg pour votre aide en histologie, imagerie et biologie moléculaire.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Béracochea de l'INICIA qui nous a permis de réaliser nos études comportementales dans ses laboratoires. Ces études nous ont permis de mettre réellement en route notre unité et cette thèse. Je vous remercie chaleureusement pour le temps que vous m'avez accordé ainsi que pour tous les précieux conseils que vous m'avez apportés.

Merci aux Dr Douki du CEA Grenoble, Dr Gilardoni, Dr Junot et Dr Fenaille du CEA Saclay, d'avoir collaboré avec nous et de continuer à le faire sur d'autres projets. Vos travaux et votre expertise nous ont été précieux.

Je remercie les membres de l'unité Animalerie, et en particulier Hervé Chaussard, pour leur soutien logistique et soins apportés aux animaux.

Je souhaite également remercier la Direction Générale de l'Armement et le Service de Santé des Armées et l'IRBA pour avoir financé cette thèse et me permettre de poursuivre mes recherches au sein de l'IBRA.

Enfin, je souhaite remercier mes amis et ma famille qui m'ont toujours soutenu. J'adresse mes plus profonds sentiments à mon mari, Thomas, et à notre fille, notre trésor, Ava, née durant cette thèse.

Sommaire

I. INTRODUCTION	18
I.1. Les armes chimiques	18
Article n°1	18
I.1.1 Historique : les agents vésicants	26
I.1.2 Nomenclature des composés	30
I.1.3 L'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC)	31
I.2. L'ypérite	35
I.2.1 Physiopathologie	35
I.2.2 Mécanisme d'action	38
I.2.3 Biomarqueurs	41
I.2.4 Prise en charge d'une exposition cutanée à l'ypérite	45
Article n°2	45
I.3. Les effets cutanés de l'ypérite	60
I.3.1 La peau : rappels histologiques	60
I.3.2 Les étapes de la cicatrisation	62
I.3.3 Les différents types de brûlures	65
I.3.4 Caractéristiques des lésions cutanées induites par l'ypérite	69
I.3.5 Les connexines	71
Généralités	71
Localisation	75
Régulation	75
I.4. Les effets cérébraux induits par l'ypérite	80
I.4.1 Principaux effets comportementaux de l'ypérite décrits chez l'Homme	80
I.4.2 Anxiété et mémoire de travail : rappels bibliographiques	83
Principales structures impliquées dans le mécanisme de la peur et de l'anxiété	84
L'amygdale	84
Le thalamus	85
L'hippocampe	86
Le cortex préfrontal	86

Les circuits de la peur	87
Classification des systèmes de mémoire	91
La mémoire de travail	95
II. OBJECTIFS	97
II.1. Première partie : effets cutanés	97
Objectif 1 : mise au point des brûlures cutanées au CEES et à l'ypérite	97
Objectif 2 : comparaison des lésions induites par l'ypérite et le CEES, d'un point de macroscopique, histologique et moléculaire	97
Objectif 3 : évaluation de l'efficacité de molécules modulatrices des connexines 43 sur les lésions induites par le CEES	98
II.2. Seconde partie : effets cérébraux	98
Objectif 1 : évaluation de la réponse émotionnelle et cognitive suite à une exposition cutanée à un agent vésicant	98
Objectif 2 : recherche d'adduits cérébraux du CEES après une exposition cutanée	99
III. MATERIELS ET METHODES	100
III.1. Partie cutanée	100
Agents vésicants : l'ypérite et le CEES	100
Modèle animal : la souris SKH-1	103
Suivi des animaux	105
Suivi macroscopique	105
Surface des lésions	106
Perte insensible en eau (PIE)	107
Hydratation cutanée (HC)	108
Couleur de la peau	109
Score combiné lésionnel	111
Analyses histologiques	112
Prélèvement de biopsies	112
Préparation des lames et coloration	113
Immunomarquage de la connexine 43	113
Analyses en biologie moléculaire	114
Prélèvement des biopsies	114
Broyage et extraction	114
RT-qPCR	116
Molécules thérapeutiques	118

Oligonucléotide antisens de la connexine 43 _____	118
Peptide ACT1 _____	118
III.2. Partie cérébrale _____	120
Agent vésicant : le CEES _____	120
Modèle animal : souris C57/Bl6 et SKH-1 _____	120
Protocoles d'exposition _____	121
Prélèvements et analyses des échantillons cérébraux _____	122
Tests comportementaux _____	123
Labyrinthe en croix surélevé _____	123
Open-field _____	125
Labyrinthe en T _____	126
III.3. Statistiques _____	129
Paramètres cliniques _____	129
Biologie moléculaire _____	129
Tests cognitifs _____	130
IV. RESULTATS _____	131
IV.1. Première partie : effets cutanés _____	131
IV.1.1 Résultats objectif 1 : Mise au point des brûlures cutanées au CEES et à l'ypérite _____	131
Modèle d'exposition aux vapeurs de CEES _____	131
Modèle d'exposition aux vapeurs d'ypérite _____	138
Discussion objectif 1 : Mise au point des brûlures cutanées au CEES et à l'ypérite _____	140
IV.1.2 Résultats objectif 2 : comparaison ypérite vs CEES _____	142
Article n° 3 _____	142
Résultats complémentaires : immunomarquage de la connexine-43 _____	153
IV.1.3 Résultats objectif 3 : Evaluation de l'efficacité de molécules agissant sur la connexine 43 sur les lésions induites par le CEES _____	155
Suivi pondéral _____	156
Aspect des lésions _____	158
Suivi cutané _____	160
Surface des lésions _____	160
Teinte de la peau (ITA) _____	161
Perte insensible en eau (PIE) _____	163
Hydratation cutanée (HC) _____	164

Score combiné lésionnel	166
Discussion de l'objectif 3 : Evaluation de l'efficacité de molécules agissant sur la connexine 43 sur les lésions induites par le CEES	167
IV.1.4 Discussion et conclusion de la partie cutanée	171
IV.2. <i>Seconde partie : effets cérébraux</i>	175
IV.2.1 Résultats objectif 1 : évaluation des effets cognitifs et émotionnels d'une exposition à un agent vésicant	175
Article n°4	175
IV.2.2 Résultats objectif 2 : recherche d'adduits du CEES dans le cerveau après exposition cutanée	182
IV.2.3 Discussion et conclusion de la partie cérébrale	185
V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	192
VI. Annexes	198
Annexe I : Protocole d'immunomarquage de la connexine-43	198
Annexe II : Protocole de broyage et extraction	201
Annexe III : Protocole de reverse transcription	205
Annexe IV : Protocole PCR	208
Annexe V : Comparaison de l'évolution pondérale des souris exposées au CEES et à l'ypérite	210
Annexe VI : Comparaisons macroscopiques des lésions induites par le CEES et l'ypérite	211
Annexe VII : Comparaisons histologiques des lésions induites par le CEES et l'ypérite	212
Annexe VIII : Comparaisons des paramètres cutanés après exposition au CEES et traitement avec l'ASODN, ACT1, gel Pluronic® F-127	214
Annexe IX : Article de Gilardoni et al., 2021	219
Annexe X : Article de Roser et al., 2021	229

Annexe XI : Valorisation et formations	264
<i>Bibliographie</i>	267

Abréviations

ACT1 : Alpha-connexin carboxyl terminal

ACTH : Adrenocorticotropique hormone

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ANP : Appareil Normal de Protection

AP4C : Appareil Portatif de Contrôle de Contamination à 4 Canaux

ARN : Acide ribonucléique

ASODN : oligonucleotide antisens

BAL : British Anti-Lewisite

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives

CEES : 2-chloroethyle ethyle sulfide

CIAC : Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques

CRH : Corticotropin releasing hormone

CT : Domaine C terminal

Ct : Cycle threshold

Cx : Connexine

Cys-CEES : Cysteine-CEES

DAM : Diacétyl mono-oxime

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DDGel : Dermal Decontamination Gel

DGA : Direction générale de l'Armement

DL50 : Dose Létale 50

DO : Densité Optique

DMSA : Acide meso-2,3-dimercaptosuccinique

DMPS : Acide 2,3-dimercapto-1-propanesulfonique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

EPI : Equipements de Protection Individuels

FAAH : Fatty acid amide hydrolase

FC : Fold change

GSH : Glutathion

GSH-CEES : Glutathion-CEES

HC : Hydratation Cutanée

HD : Ypérite

HETE-N3Ade : N3-hydroxyéthylthioéthyl-adénine

HETE-N7Gua : N7-hydroxyéthylthioéthylguanine

HETE-Val : adduit au N terminal de la valine de l'hémoglobine

HG : Housekeeping gene

HRP : Horseradish peroxidase

i.p. : Intrapéritonéale

IL : Interleukines

INCIA : Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine

INSUPE : Installation unique à petite échelle

IRBA : Institut de Recherche Biomédicale des Armées

ITA : Individual Topology Angle

ITI : Intervalle inter-essais

KBDO : 2,3 butanedione mono-oximate de potassium

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

LC-HRMS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution

MAGUK : Membrane-Associated Guanylate Kinases (Guanylates kinases associées à la membrane)

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MMP : métalloprotéases matricielles

MSMTESE : 1-methyl-sulfinyl-2-[(methylthio)ethyl-sulfonyl]ethane

NAC : N-acétylcystéine

NAC-CEES : N-acétylcystéine-CEES

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NFκB : Nuclear factor-kappa B

OIAC : Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PBS : Phosphate Buffer Saline

PIE : Perte Insensible en Eau

PFA : Paraformaldéhyde

PKA et **PKC** : Protéines kinases A et C

PP2A : Protéine phosphatase 2A

PTSD : Trouble de stress post-traumatique

RIN : RNA Integrity Number

RMN HR-MAS : Résonance Magnétique Nucléaire High Resolution-Magic Angle Spinning

RSDL : Reactive Skin Decontamination Lotion

RT-qPCR : Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase quantitative à partir d'un échantillon d'ARN)

s.c. : Sous-cutané

S : Surface

SBMSE : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane]

SBMTE : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane]

SEM : Erreur standard de la moyenne

SPE : Extraction sur phase solide

SPI : Modèle Sériel, Parallèle et Indépendant

TDG : Thiodiglycol

TE Buffer : Tris EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)

TGF-β1 : Transforming Growth Factor-β1

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

UHPLC-MS/MS : Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

ZO- : Zonula Occludens

Liste des figures

Figure 1 : Formule chimique de l'ypérite (sulfure d'éthyle dichloré ou sulfure de 2,2'-dichlorodiéthyle) ...	26
Figure 2 : Synthèse de l'ypérite par Despretz en 1822	26
Figure 3 : Synthèse de l'ypérite par Meyer en 1886.....	27
Figure 4 : Synthèse de l'ypérite par Clarke en 1913	27
Figure 5 : Deux fioles contenant de l'ypérite à différent degrés de pureté	28
Figure 6 : Alkylation de l'ADN par l'ypérite.....	39
Figure 7 : Biomarqueurs de l'ypérite issus de ses principales voies métaboliques.....	42
Figure 8 : Hydrolyse de l'ypérite (HD) en thiodiglycol (TDG).....	43
Figure 9 : Eponge RSDL.....	46
Figure 10 : Schéma d'une peau normale.....	61
Figure 11 : Phases de la cicatrisation (homéostasie, inflammation, prolifération et remodelage).....	64
Figure 12 : Classification des brûlures selon leur profondeur.....	68
Figure 13 : Schéma d'une connexine.....	71
Figure 14 : Schéma de jonctions communicantes.....	72
Figure 15 : Types de jonctions communicantes selon leur composition en connexines.....	74
Figure 16 : Localisation des connexines dans l'épiderme.....	75
Figure 17 : Principales conséquences de la diminution de la Cx-43 dans le cas de la cicatrisation d'une plaie aiguë, d'après Wong et al., 2016.....	77
Figure 18 : Peptide ACT1.....	79
Figure 19 : Principales structures cérébrales impliquées dans le circuit de la peur et de l'anxiété.....	84
Figure 20 : Circuits de la peur.....	87
Figure 21 : Réponse de l'organisme face à un stress.....	90
Figure 22 : Classification dichotomique de la mémoire chez l'Homme.....	92
Figure 23 : Modèle de Tulving SPI (sériel, parallèle et indépendant).....	94
Figure 24 : Analogues de l'ypérite, dont le CEES (2-chloroéthylethylsulfide), structurellement très proche.....	101
Figure 25 : Souris SKH-1 (Charles River©).....	103
Figure 26 : Coupe histologique de peau de souris SKH-1.....	104
Figure 27 : Poste d'anesthésie gazeuse MiniHUB V3 de Temsega®.....	105
Figure 28 : Dispositif de prise de vue des lésions cutanées sur souris anesthésiées.....	106

Figure 29 : Vapometer (Delfin Technologies®).....	107
Figure 30 : MoistMeterD (Delfin technologies®) équipé de la sonde permettant de mesurer l'hydratation cutanée chez la souris.....	108
Figure 31 : Skin Color Catch (Delfin Technologies®).....	110
Figure 32 : Schéma de prélèvement de biopsies cutanées.	112
Figure 33 : Test du labyrinthe en croix surélevé constitué de 2 bras ouverts et de 2 bras fermés.	124
Figure 34 : Open-field. Le plancher de l'enceinte circulaire est divisé en sections.....	126
Figure 35 : Schéma du principe du test du labyrinthe en T.	128
Figure 36 : Protocole d'exposition aux vapeurs de CEES.....	132
Figure 37 : Comparaison des temps d'exposition et des délais de décontamination.	134
Figure 38 : Comparaisons de trois modes de fixation des bouchons de CEES.....	137
Figure 39 : Protocole d'exposition aux vapeurs d'ypérite.	139
Figure 40 : Comparaisons des temps d'exposition et du volume d'ypérite en fonction du délai post-exposition.....	140
Figure 41 : Immunomarquage de la Cx-43 sur des biopsies de peau de souris SKH-1, révélation au DAB, objectif x10.....	154
Figure 42 : Protocole d'exposition aux vapeurs de CEES et traitement des animaux à J0+4h, J1, J2 et J3.	156
Figure 43 : Variation de poids des souris (%) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours)	157
Figure 44 : Aspect cutané des souris témoins non exposées, traitées avec ASODN ou ACT1.....	158
Figure 45 : Aspect des lésions après exposition au CEES puis traitement des souris avec le véhicule Pluronic® F-127, ASODN ou ACT1.	159
Figure 46 : Surface des lésions (mm ²) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours).	161
Figure 47 : Individual Topology Angle (ITA, °) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours).....	162
Figure 48 : Perte insensible en eau (PIE, g/m ² h) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours). ..	163
Figure 49 : Hydratation cutanée (HC, u.a.) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours).	165
Figure 50 : Evolution du score combiné lésionnel (%) après exposition au CEES, et traitement avec le peptide ACT1, l'antisens (ASODN) ou le véhicule seul (Pluronic® F-127).	166
Figure 51 : Détection des adduits N7Gua-CEES dans l'ADN et les extraits cérébraux après exposition cutanée au CEES.....	183
Figure 52 : Détection des biomarqueurs spécifiques du CEES dans les extraits cérébraux après exposition cutanée au CEES.....	184
Figure 53 : Evolution pondérale des souris après exposition au CEES ou à l'ypérite.	210

Figure 54 : Souris exposée aux vapeurs d'ypérite présentant de l'œdème dans les minutes suivant le retrait des bouchons 211

Figure 55 : Souris exposée aux vapeurs de CEES présentant de l'œdème, 4 h post-exposition. 211

Figure 56 : Coupes de peau, coloration HPS, objectif x10. 213

Liste des tableaux

<i>Tableau I : Principaux effets cliniques de l'ypérite et délais d'apparition selon les voies d'exposition</i>	<i>36</i>
<i>Tableau II : Règle des 9 de Wallace permettant d'évaluer rapidement l'étendue de la brûlure</i>	<i>65</i>
<i>Tableau III : Tableau résumant les caractéristiques des brûlures selon leur degré.....</i>	<i>68</i>
<i>Tableau IV : Dénominations des connexines murines et humaines selon les deux nomenclatures et correspondance entre les connexines et leurs gènes associés.....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau V : Evolution des connexines-43, 26 et 30 dans le cas d'une plaie aigüe et chronique.....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau VI : Comparaison des troubles cognitifs observés chez 153 civils lors de la guerre Iran-Irak selon l'intensité des combats et l'exposition à l'ypérite. N=51 par ville.</i>	<i>82</i>
<i>Tableau VII : Comparaison de l'ypérite et du CEES.....</i>	<i>102</i>
<i>Tableau VIII : Classification de la teinte de la peau en fonction du degré ITA (selon la notice de Delfin Technologies®).....</i>	<i>111</i>
<i>Tableau IX : Evaluation de la qualité des ARN selon leur RIN.....</i>	<i>115</i>
<i>Tableau X : Liste des gènes étudiés et des gènes de référence (Housekeeping Genes ou H)</i>	<i>116</i>
<i>Tableau XI : Prise de poids moyenne (%) des souris après exposition au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127.....</i>	<i>214</i>
<i>Tableau XII : Surfaces de lésions moyennes (mm²) des souris après exposition au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127.....</i>	<i>215</i>
<i>Tableau XIII : ITA (°) moyens après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127</i>	<i>216</i>
<i>Tableau XIV : PIE moyenne (g/m²h) après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127</i>	<i>217</i>
<i>Tableau XV : Hydratation cutanée (HC) moyenne (u.a.) après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127.....</i>	<i>218</i>
<i>Tableau XVI : Score combiné lésionnel moyen après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127.....</i>	<i>218</i>

I. INTRODUCTION

I.1. Les armes chimiques

Article n°1 : Diversité et propriétés des principales armes chimiques utilisées lors de la première guerre mondiale

L'article intitulé « **Diversité et propriétés des principales armes chimiques utilisées lors de la première guerre mondiale** », de Gros-Désormeaux F., Médecine et armées, 2017, 45, 1, 041-046, retrace l'utilisation des armes chimiques lors de la première guerre mondiale et décrit les principales catégories d'armes chimiques qui furent développées.

La première guerre mondiale fut marquée par l'utilisation massive d'armes chimiques. La première arme chimique utilisée fut le dichlore en avril 1915, à Langemark en Belgique. Sous l'impulsion du chimiste allemand Fritz Jacob Haber, directeur du Kaiser Wilhelm Institute de physico-chimie à Berlin, les allemands ouvrirent des bonbonnes de dichlore afin que les nappes de gaz soient portées par le vent jusqu'aux lignes ennemies. Cette attaque mit 15 000 soldats hors de combat et fit 5 000 morts qui succombèrent principalement d'œdème aigu du poumon (1). Cette première attaque fut le début de l'escalade au développement des armes chimiques ainsi que des masques et des tenues de protection. Il s'ensuivit une grande variété d'agents utilisés par les belligérants afin de contrer les équipements de protection qui se développaient en réaction.

Les agents employés peuvent être classés selon leurs effets recherchés en deux catégories :

- Les agents incapacitants
- Les agents létaux

Parmi les agents incapacitants, on distingue les irritants lacrymogènes et les irritants sternutatoires. Parmi les agents létaux, les principales catégories sont les suffocants, les toxiques généraux et les vésicants, bien que ces derniers soient plus incapacitants que létaux (2).

Une description de ces armes chimiques est présentée dans l'article ci-après.

Diversité et propriétés des principales armes chimiques utilisées lors de la Première Guerre mondiale

F. Gros-Désormeaux

Résumé

La Première Guerre mondiale fut le théâtre de la première utilisation d'armes chimiques avec une visée de destruction de masse. Auparavant, les belligérants utilisaient des lacrymogènes pour le maintien de l'ordre. Les Allemands, malgré la signature de la convention de La Haye en 1899, mirent en œuvre la première arme chimique à visée de destruction de masse, le chlore, en Belgique près d'Ypres en 1915. Il s'ensuivit une course dans le développement, d'une part d'armes chimiques de plus en plus destructrices telles que le phosgène et l'ypérite et d'autre part d'équipements de protection de plus en plus performants. Ainsi, une grande diversité d'armes chimiques a été utilisée lors du premier conflit mondial. Ces armes à fort impact psychologique se sont surtout révélées être des moyens de harcèlement et d'usure de l'ennemi. Cet article s'attache à présenter la diversité et les propriétés des principales armes chimiques utilisées lors de la Première Guerre mondiale. Bien que de nombreuses associations entre ces divers composés aient été réalisées, cet article présentera les agents de façon indépendante.

Mots-clés : Armes chimiques. Lacrymogènes. Première Guerre mondiale. Suffocants. Vésicants.

Abstract

DIVERSITY AND MAIN PROPERTIES OF THE CHEMICAL WEAPONS USED DURING WORLD WAR I.

The 'Great War' was when chemical warfare agents were first used for mass destruction. Previously, the belligerents would use tear gas (lachrymators), or chemical agents for riot control. The Germans used the first chemical weapon of mass destruction, chlorine, in 1915 near Ieper (Belgium), despite the signature of the Hague Convention in 1899. Then followed a race to develop even more destructive chemical weapons, such as phosgene and sulphur mustard, and more effective protective equipment. Many different toxic compounds were used during the Great War. These weapons with a high psychological impact have mostly proved to be means of harassment and attrition of the enemy. This article will focus on the diversity and the properties of the main chemical warfare agents used during the Great War. Although many associations between these various compounds have been used, this article will present these agents independently.

Keywords : Chemical weapons. Lachrymators. First World War. Lung damaging agents. Vesicants.

Introduction

Dès octobre 1914, le front occidental étant stabilisé, les Allemands ont cherché un moyen de réaliser une percée. Malgré la convention de La Haye de 1899 interdisant l'emploi de gaz asphyxiants ou délétères et dont l'Allemagne était signataire, le chimiste allemand Fritz Jacob Haber propose de diffuser un gaz suffocant, le dichlore (ou Bertholite selon l'appellation française historique) (1). Celui-ci étant plus dense que l'air ($d = 2,5$), des nappes dérivantes peuvent être poussées par le vent jusqu'aux lignes ennemies. Cette première attaque par toxique chimique a été le début d'une escalade dans le développement d'armes chimiques.

F. GROS-DÉSORMEAUX, pharmacien des armées.

Correspondance : Madame le pharmacien des armées F. GROS-DÉSORMEAUX, Institut de recherche biomédicale des armées, département de Toxicologie et risques chimiques, BP 73 - 91223 Brétigny-Sur-Orge Cedex.
E-mail : fanny.grosdesormeaux@intradef.gouv.fr

De très nombreux composés ont ainsi été synthétisés et utilisés entre 1915 et 1918.

Ces composés chimiques peuvent être classés en deux catégories selon les effets recherchés : les agents létaux et les agents incapacitants. Parmi les agents létaux se trouvent les suffocants, les vésicants et les toxiques généraux, tandis que les irritants lacrymogènes et les irritants sternutatoires appartiennent à la catégorie des agents incapacitants.

Les agents létaux

Les suffocants (voir Renard, et al. dans ce numéro)

Chlore, dichlore ou bertholite Cl₂

Le dichlore a été découvert en 1774 par Carl Wilhelm Scheele mais ce n'est qu'en 1810 que Humphry Davy

lui attribue le nom de chlore. Ce composé est très réactif et possède une forte capacité d'oxydation.

L'attaque au dichlore du 22 avril 1915 à Langemarck près de Ypres en Belgique a surpris les troupes alliées, puisque cela était la première utilisation d'un agent chimique létal (voir Delacour et al. dans ce numéro). L'effet toxique du dichlore (asphyxie, irritation des yeux et des voies respiratoires principalement) a été immédiat (1, 2). La cause principale de létalité au dichlore est l'œdème pulmonaire secondaire (3). En effet, le dichlore est un agent suffocant entraînant une sensation de brûlure au niveau de la gorge, une toux spasmodique et suffocante ainsi que d'épaisses mucosités hémoptoïques. Celles-ci participent au phénomène de suffocation puisque l'organisme tente vainement de les expulser. De plus, les cordes vocales sont atteintes ce qui empêche l'intoxiqué de communiquer. Les lésions au chlore sont souvent profondes et laissent des séquelles même après guérison (4, 5).

Des moyens de protection d'abord très rudimentaires, tels que des chiffons imprégnés d'urine, recouvrant les voies respiratoires ont été utilisés rapidement sur le champ de bataille. Ces chiffons ont très vite été remplacés par des tampons contenant une solution d'hyposulfite et de carbonate de soude rendant ainsi le dichlore inefficace (1, 2). Le dichlore a donc été remplacé au profit d'autres composés passant à travers les premiers masques de protection développés.

Phosgène COCl_2

Après le dichlore, le phosgène (synthétisé pour la première fois en 1812 par John Davy) a été utilisé par les Allemands en 1915 (6, 7) mais les Français ont été les premiers à charger le phosgène dans des obus en 1916 (5).

Le phosgène est un agent plus pernicieux que le dichlore en raison d'une période d'apparente rémission allant de 6 à 10 h après la première phase symptomatique, puis l'œdème pulmonaire est déclaré. Lors des intoxications à faibles doses, la première phase de l'intoxication peut être asymptomatique, les symptômes n'apparaissant qu'après une latence pouvant aller jusqu'à plusieurs jours (5, 8, 9). De plus, le phosgène étant incolore et moins odorant que le dichlore, les soldats mettent plus de temps à se rendre compte de leur intoxication.

À noter que des mélanges dichlore-phosgène ont également été utilisés lors de la Première Guerre mondiale (10).

Chloropicrine CNO_2Cl_3

Les Russes ont été les premiers à utiliser ce composé en 1916 sous forme de mélange avec du chlorure de sulfuryle ou du chlore. La chloropicrine est un dérivé du chloroforme très volatil, persistant et lacrymogène. Les symptômes d'une intoxication à la chloropicrine sont proches de ceux du phosgène, à la différence que de nombreux vomissements ainsi qu'une méthémoglobinémie sont associés (5).

La chloropicrine est lipophile, contrairement au phosgène et au dichlore, ce qui lui permet de pénétrer dans l'organisme par d'autres voies que la voie

respiratoire, telle que la voie percutanée (5, 11). De plus, elle possède l'avantage de passer à travers les masques de l'époque fabriqués à l'aide de tampons imprégnés (1). De nouveaux masques contenant du charbon actif retenant la chloropicrine, furent mis en place pour s'en protéger.

Durant la Première Guerre mondiale, la chloropicrine a été très peu utilisée à l'état pur, elle fut principalement employée avec d'autres toxiques (5).

Les vésicants

Le 12 juillet 1917, un nouveau type d'agent létal est introduit dans le conflit: les vésicants, avec pour chef de file la moutarde au soufre (ypérite) qui présente l'intérêt, pour l'agresseur, d'agir non seulement par la voie respiratoire, mais également par la voie cutanée. De plus, la moutarde au soufre passe à travers de nombreux matériaux, dont les tissus utilisés pour confectionner les uniformes de l'époque (1, 5, 11).

L'ypérite ou moutarde au soufre $(\text{Cl}_2\text{H}_4)_2\text{S}$

Durant la Première Guerre mondiale, de nombreuses variétés et mélanges de moutardes au soufre ont été employés.

L'ypérite, ou sulfure de 2,2-dichlorodéthyle, tient son nom de la ville d'Ypres en Belgique à proximité de laquelle elle a été utilisée pour la première fois dans le conflit le 12 juillet 1917 (voir Dorandeu, et al. dans ce numéro).

L'ypérite est insidieuse car elle pénètre de très nombreux matériaux et la peau en quelques minutes seulement, mais les effets ne se font ressentir qu'après un temps de latence de plusieurs heures (12). De plus, l'ypérite est persistante puisqu'elle résiste à l'eau et reste active durant de nombreuses années (5). Les sols et surfaces restent donc contaminés durant de longues périodes et l'ypérite contenue dans des obus n'ayant pas explosé reste active. Les obus allemands contenant de l'ypérite étaient marqués d'une croix jaune.

L'ypérite provoque des lésions cutanées, oculaires et également pulmonaires suite à son inhalation. La cicatrisation des brûlures à l'ypérite est très lente et laisse des séquelles la plupart du temps (10). De plus, en raison de ses effets de type radiomimétique, le blessé ypérite doit donc être considéré et pris en charge comme un brûlé immunodéprimé (9, 13, 14), ce qui concourt à rendre la prise en charge médicale délicate, surtout à l'époque.

Arsines vésicantes: dichlorure d'éthylarsine $(\text{C}_2\text{H}_5\text{AsCl}_2)$ et dichlorure de phénylarsine $(\text{C}_6\text{H}_5\text{AsCl}_2)$

Le dichlorure d'éthylarsine a été utilisé pour la première fois en mars 1918, tandis que le dichlorure de phénylarsine l'a été dès novembre 1917. À l'état liquide, ces arsines sternutatoires possèdent également des propriétés vésicantes (voir Renard, et al. dans ce numéro). Le dichlorure de phénylarsine possède de plus des propriétés émétisantes (11). À la différence de l'ypérite, les phlyctènes guérissent rapidement

sans complications. Les obus allemands contenant du dichlorure d'éthylarsine étaient marqués d'une croix jaune, comme pour l'ypérite, en raison de sa propriété vésicante, mais comme cet agent était surtout utilisé dans le même plan de tirs que les suffocants, il a été chargé dans des obus croix vertes 3 (5, 11).

Les toxiques généraux

Acide cyanhydrique HCN

C'est le chimiste suédois Scheele qui a isolé l'acide cyanhydrique à l'état pur en 1783. Son mécanisme d'action toxique repose sur l'inhibition de la cytochrome oxydase mitochondriale par liaison avec le fer, inhibant ainsi la respiration cellulaire (7). Les cellules du système nerveux central sont les plus sensibles à cette anoxie. L'action toxique de ce composé est très rapide et sa gravité dépend de la quantité à laquelle le sujet est exposé et donc du taux d'inhibition de la respiration cellulaire. Le décès survient en quelques minutes selon la concentration d'exposition (5, 8).

Ce toxique est peu persistant mais pénètre de très nombreuses surfaces telles que les textiles et divers matériaux, que ce soit sous sa forme liquide ou gazeuse. Ce sont les Français qui, durant la Première Guerre mondiale, ont les premiers exploités ce composé à des fins militaires. Sa première utilisation a eu lieu sur le front de la Somme en juillet 1916 (5, 15). L'acide cyanhydrique a été utilisé sous forme de mélange avec du chlorure d'arsenic, du tétrachlorure d'étain et du chloroforme afin de l'alourdir et de rendre le nuage visible. Ce mélange portait le nom de Vincennite. Un autre mélange avec du trichlorure d'arsenic a également été employé sous le nom de Manganite. Cette association avait pour but de ralentir la décomposition de l'acide cyanhydrique et d'empêcher son inflammation lors de l'explosion des obus (5).

L'intérêt militaire de cet agent est d'agir très rapidement. Cependant, pour être efficace, ce composé doit être rapidement dispersé à de fortes concentrations. L'acide cyanhydrique a donc été assez vite remplacé car, à l'époque, il était techniquement difficile d'atteindre la concentration efficace, notamment en raison de l'inflammabilité du composé déjà mentionnée. De plus, des masques retenant ces composés ont été rapidement mis au point (8).

Chlorure de cyanogène CNCl

Le chlorure de cyanogène est un toxique général ayant une densité de vapeur (2, 13) supérieure à celle de l'acide cyanhydrique mais inférieure à celle du phosgène (5, 8). Cet agent agit également sur la cytochrome oxydase en inhibant la respiration cellulaire. Il possède de plus des propriétés suffocantes et lacrymogènes. Ainsi, ses effets sont proches de ceux de l'acide cyanhydrique combiné au phosgène (6).

Il a été parfois utilisé en mélange avec du trichlorure d'arsenic pour des raisons de stabilité. Ce mélange, nommé vitryte, avait pour but de remplacer la vincennite qui était peu efficace (5).

Bromure de cyanogène CNBr

Le bromure de cyanogène a été uniquement utilisé par les Autrichiens, seul ou en mélange avec du benzène et de la bromacétone. Cet agent est plus toxique que l'acide cyanhydrique (5).

Les agents incapacitants

Les irritants lacrymogènes

Les lacrymogènes ont été utilisés dès le début de la guerre, mais à partir de 1915 leur utilisation s'est intensifiée, notamment parce que les masques de l'époque n'offraient pas de protection satisfaisante. L'effet incapacitant des lacrymogènes a été recherché, plutôt que leur effet létal.

Une grande diversité d'irritants lacrymogènes a ainsi été utilisée lors de la Première Guerre mondiale. Leur action toxique se traduit par une irritation localisée des muqueuses de l'œil et des voies respiratoires. À l'exception de l'acroléine, les composés testés et utilisés à l'époque sont halogénés. Un classement des atomes d'halogène peut être réalisé selon le degré d'intensité de l'irritation : iode > brome > chlore > fluor. On distingue ainsi deux catégories : les cétones halogénées aliphatiques et aromatiques ainsi que les aromatiques azotés halogénés (5).

Bromacétate d'éthyle $\text{CH}_2\text{BrCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$

Le bromoacétate d'éthyle a été utilisé dès 1914 par les Français (15), composé bien connu et maîtrisé puisqu'il était auparavant utilisé, notamment par la police, dans des grenades à main dès 1912.

Chloracétone $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{Cl}$

La chloracétone a remplacé le bromoacétate d'éthyle dès avril 1915 en raison de la pénurie en brome. Elle était chargée dans les grenades Bertrand (11).

Bromoacétone $\text{BrCH}_2\text{COCH}_3$

La bromoacétone, surnommée B-Stoff, a été utilisée dès 1915 par les Allemands, soit pure, soit en mélange, notamment avec le bromure de xylyle, moins volatil (T-Stoff vert). Les Français l'ont utilisée en 1916 mais sous forme de mélange avec d'autres dérivés (5). La bromoacétone imprègne les tissus, de sorte que la victime soustraite de la zone contaminée peut encore inhaler les vapeurs dégagées par ses vêtements (11).

Chlorure de benzyle $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCH}_2\text{Cl}$, de xylyle $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$ et de cacodyle $(\text{CH}_3)_2\text{AsCl}$

Le chlorure de benzyle a été rapidement remplacé car il a l'inconvénient d'être peu volatil. De ce fait, il devait être pulvérisé et dispersé par de petites charges explosives. De plus, la durée d'action de cet agent était faible.

Bromure de benzyle $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Br}$ et bromure de xylyle $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Br}$

Le bromure de benzyle a été rapidement remplacé par le bromure de xylyle car le toluène nécessaire à sa

synthèse était très utilisé, notamment pour la fabrication d'explosifs nitrés. Jusqu'il y a peu, ce liquide a été utilisé par les armées françaises pour l'entraînement au port du masque de protection respiratoire dans les salles d'atmosphère viciée.

Comme déjà mentionné, le bromure de xylyle est connu sous le nom de T-Stoff chez les Allemands, le « T » faisant référence au chimiste Tappen qui a proposé son emploi. Ce toxique, très peu létal, (concentration létale = 6000 mg/m³), est facilement retenu par le charbon actif. Il dégage une odeur de lilas ce qui le rend détectable. Par ailleurs, sa volatilité diminue fortement avec la température (de 600 mg/m³ à 20 °C à 140 mg/m³ à 0 °C), ce qui a conduit les Allemands à le remplacer par la bromacétone par temps froid (5, 11).

Iodure de benzyle C₆H₅CH₂I et de xylyle CH₃C₆H₄CH₂I

L'iodure de xylyle est un lacrymogène puissant qui a été utilisé par les Français en 1915 en opposition au bromure de xylyle et au bromure de benzyle employés par les Allemands (ils détenaient en effet le quasi-monopole du brome).

Iodacétate d'éthyle ICH₂COOC₂H₅ et de méthyle ICH₂COOCH₃

L'iodacétate d'éthyle était le plus souvent dilué dans de l'alcool ou en mélange avec la chloropicrine.

Acroléine ou papite CH₂CHCOH

L'acroléine, également appelée papite, du nom de Lepape qui a travaillé sur ses usages, a été utilisée par les Français en remplacement de la chloracétone en 1916 (11). La particularité de l'acroléine est que, contrairement aux principaux lacrymogènes, elle n'est pas halogénée. Elle est produite par dessiccation de la glycérine et a été principalement utilisée dans des grenades à main, son mode de dispersion le plus efficace (11). L'acroléine est peu létale dans des espaces ouverts, tandis que dans des espaces clos, la concentration létale peut être plus facilement atteinte (50 mg/m³) (5). Son utilisation était donc surtout destinée à faire sortir l'ennemi des tranchées.

Les irritants sternutatoires

Les irritants sternutatoires sont également appelés « arsines » du fait de leur structure chimique comprenant un atome d'arsenic. Deux groupes chimiques peuvent être distingués selon leur substitution : les dérivés de la phénylarsine (aromatiques) et les dérivés de l'éthylarsine (aliphatiques). Les aromatiques sont liquides, contrairement aux aliphatiques qui sont sous forme solide (11). Le but de ces irritants sternutatoires était de traverser le masque pour exercer leur action irritante sur l'arbre respiratoire supérieur afin d'empêcher le port du masque (16). Il n'existe pas de traitement contre ces agents. Toutefois, les concentrations utilisées militairement n'étaient pas létales, celles-ci ne pouvant être atteintes que dans des enceintes confinées.

Les dérivés dichlorure et dibromure d'éthylarsine possèdent en plus des propriétés vésicantes.

Chlorure de diphenylarsine (C₆H₅)₂AsCl et cyanure de diphenylarsine (C₆H₅)₂AsCN

Le chlorure et le cyanure de diphenylarsine, également appelés respectivement Clark I et Clark II, sont des irritants des muqueuses respiratoires et oculaires. Des effets sur le système nerveux ont pu être observés à la suite de leur inhalation avec des troubles moteurs et d'équilibre ainsi que des douleurs dans les membres. Le maximum des effets surviennent de 5 à 10 minutes après l'exposition. Le port du masque devenant très vite insupportable, les personnes exposées sont obligées de l'enlever. Pour cette raison, ces composés sont aussi connus comme des « brises-masque ». Le Clark II, insoluble dans l'eau, a remplacé le Clark I qui présente l'inconvénient de se décomposer rapidement en milieu aqueux, diminuant ainsi son efficacité. Les effets toxiques du Clark II sont les mêmes que ceux du Clark I (5).

Le chlorure de diphenylaminarsine ou adamsite HN (C₆H₄)₂AsCl

Le chlorure de diphenylaminarsine porte le nom d'adamsite, en référence à l'Américain Adam qui a revendiqué sa découverte en 1918. Cependant, d'un point de vue historique, l'industrie Bayer & Co avait déjà breveté son procédé d'élaboration en 1915 (5). Son emploi durant la Première Guerre mondiale reste en discussion (16). Seuls les Italiens l'auraient utilisé (5). Ses effets toxiques sont semblables à ceux des Clarks I et II. L'adamsite avait l'avantage par rapport aux Clark I et II d'être plus aisé à synthétiser et à manipuler et d'être moins coûteux. L'adamsite est resté utilisé par de nombreuses armées occidentales au cours du XX^e siècle.

Conclusion

Malgré la convention de La Haye en 1899, de nombreuses armes chimiques ont été employées durant la Première Guerre mondiale. Des gaz lacrymogènes, auparavant utilisés pour le maintien de l'ordre, ont été utilisés les premiers, notamment par les Français. La première attaque au dichlore en 1915 a marqué le réel début de l'emploi d'armes chimiques létales. Ces armes sont devenues de plus en plus performantes, tandis qu'en parallèle les moyens de protection étaient de plus en plus efficaces. Les champs de bataille sont ainsi devenus le théâtre de tests et de mise au point de nouvelles armes chimiques.

De nombreux paramètres ont conditionné le choix des toxiques, notamment leur concentration efficace ou létale, leur volatilité, leur stabilité, leur capacité à traverser les protections mises en place par le camp adverse, leur facilité et leur coût de synthèse pour pouvoir les produire en grandes quantités, leur stabilité, les moyens de dispersion possibles par obus ou grenades notamment (12).

Cet article s'est attaché à présenter la diversité des composés synthétisés et utilisés lors de la Première Guerre mondiale à travers cette liste non exhaustive.

Tableau I. Récapitulatif des principaux agents utilisés lors de la Première Guerre mondiale (1, 5, 6).

Classe	Agent	Nom de code	Date de première utilisation
Suffocants	Chlore	Bertholithe	22/4/1915
	Phosgène	Collongite	19/12/1915
	Chloropicrine	Aquinite	Fin 1916
Vésicants	Sulfure d'éthyle dichloré	Ypérite, Gaz moutarde	12/7/1917
	Dichlorure d'éthylarsine	Dick	4/1918
	Dichlorure de phénylarsine	Dick	
Toxiques généraux	Acide cyanhydrique	Forestite	7/1916
	Chlorure de cyanogène	Mauguinite, CK (GB)	
	Bromure de cyanogène		
Irritants lacrymogènes	Bromacétate d'éthyle	Macétite	8/1914
	Chloracétone	Tonite	24/4/1915
	Acroléine	Papite	1916
	Chlorure de benzyle, xylyle, cacodyle	Cedenite (chlorure de nitrobenzyle)	
	Iodure de xylyle, benzyle	Fraissite (iodure de benzyle)	
	Iodoacétate d'éthyle, de méthyle	SK (GB)	
	Bromure de benzyle	Cyclite	1915
	Bromure de xylyle	T-Stoff (allemand)	1/1915
	Bromacétone	Maronite, B-Stoff (allemand)	7/1915
Irritants stématoires	Chlorure de diphénylarsine	Clark 1 (allemand)	11/7/1915
	Cyanure de diphénylarsine	Clark 2 (allemand)	20/5/1918
	Chlorure de diphénylaminarsine	Adamsite	

Parmi tous ces composés, certains n'ont été cependant que très peu utilisés en raison de leur moindre efficacité sur le terrain ou à cause des équipements de protection qui se développaient très rapidement. Les principaux

toxiques font l'objet d'autres articles de ce numéro spécial.

L'auteur ne déclare pas de conflit d'intérêt concernant les données présentées dans cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lepick O. La Grande Guerre chimique 1914-1918. Paris: Presses Universitaires de France; 1998.
2. Sbrava D, ECPAD. La guerre des gaz 1915-1918 vue à travers les archives de l'ECPAD, janvier 2011. http://archives.ecpad.fr/wp-content/uploads/2011/01/guerre_des_gaz.pdf, septembre 2015.
3. Office of Environmental Health Hazard Assessment, Determination of acute reference exposure levels for airborne toxicants – Acute toxicity summary – Chlorine (Bertholite) – 1999. http://www.oeaha.ca.gov/air/acute_rels/pdf/7782505a.pdf, juillet 2015.
4. Bonnard N, Brondeau M-T, Clavel T, Jargot D, Schneider O, Chlore-Fiche toxicologique – INRS. <http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/fichetox.html?ref=INRS=FT%2051>, juillet 2015.
5. Bélot H, Bélot M. 1915-1945 Trente ans de munitions chimiques, Tome second. Les agents de guerre chimiques, Une documentation à l'attention des artificiers ayant à éliminer les munitions anciennes. Metz: Henry Bélot, Michael Bélot; 1994.
6. Chauhan S, Chauhan S, D'Cruz R, Faruqi, Singh KK, Varma S, et al. Chemical warfare agents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008; 26: 113-22.
7. Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR. Chemical warfare agents, Toxicology and treatment. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1996.
8. WHO, Health aspects of chemical and biological weapons – Report of a WHO group of Consultants, 1970. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39444/1/24039.pdf>, juillet 2015.
9. Evison D, Hinsley D, Rice P. Chemical weapons. *BMJ* 324, 2002: 332-5.
10. Fitzgerald GJ. Chemical warfare and medical response during World War I. *American Journal of Public Health* 98 (4), 2008:611-25.
11. Lejaille A. La guerre des gaz, <http://www.guerredesgaz.fr/lesgaz/suffocants/suffocants.htm>, juillet 2015.
12. Piérard G. La guerre et la médecine d'une culture de paix. 3- Synopsis des armes chimiques. *FALCO* janvier, 2003: 14-18
13. Mérat S, Perez JP, Rittmann M, Bordier E, Lienhard A, Lenoir B, Pats B. Intoxication aiguë par arme chimique vésicante: l'ypérite. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 22 (2), 2003: 108-18.
14. Graham JS, Chilcott RP, Rice P, Milner SM, Hurst CG, Malner BI. Wound healing of cutaneous sulfur mustard injuries: strategies for the development of improved therapies. *J Burns Wounds*, 2005: 4 (1) 1.
15. Szinicz L, History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214, 2005: 167-81.
16. Plantumara J, Bousquet A, Valéro E, Vest P, Renard C. Les arsines vomitives: toxiques chimiques toujours d'actualité? *Médecine et Armées*, 39 (5), 2011: 453-7.

I.1.1 Historique : les agents vésicants

Dans ce contexte de guerre chimique, la première utilisation de l'ypérite eut lieu dans la nuit du 12 au 13 juillet 1917 à Ypres, lui conférant son nom d'ypérite (3). L'ypérite, ou sulfure d'éthyle dichloré (Figure 1), plus connu sous le nom de gaz moutarde, est le chef de file des agents vésicants. Elle possédait l'intérêt d'exercer une toxicité à la fois sur les systèmes respiratoire et oculaire, et également par voie cutanée. De plus, elle a la faculté de traverser de très nombreux matériaux comme le caoutchouc ou le cuir par exemple, utilisés à l'époque pour les équipements de protection individuels.

L'ypérite fut synthétisée pour la première fois en 1822 par le chimiste français César Despretz en faisant barboter de l'éthylène dans du dichlorure de soufre (Figure 2). Cependant, Despretz n'avait pas noté les propriétés toxiques du composé obtenu, mais uniquement son odeur de raifort ou de moutarde, mettant en doute sa synthèse complète (4, 5).

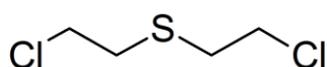


Figure 1 : Formule chimique de l'ypérite (sulfure d'éthyle dichloré ou sulfure de 2,2'-dichlorodéthyle)



Figure 2 : Synthèse de l'ypérite par Despretz en 1822 (5)

Il a fallu attendre 1860, pour que l'anglais Frederick Guthrie et l'allemand Albert Niemann, ayant également synthétisé de l'ypérite, décrivent ses propriétés irritantes. Albert Niemann décrit ainsi les premières propriétés toxiques du liquide huileux obtenu : « la moindre trace qui entre en contact avec une quelconque partie de la peau, bien qu'elle ne cause aucune douleur au début, produit en quelques heures une rougeur et le lendemain une

vésicule sévère, qui suppure pendant longtemps et est très difficile à cicatriser » (6). Niemann souffrira par la suite d'effets pulmonaires probablement induits par l'ypérite, provoquant une mort précoce à l'âge de 27 ans (5, 7). En 1886, Victor Meyer décrivit sa structure chimique complète et produisit de l'ypérite par réaction de 2-chloroéthanol avec du sulfure de potassium aqueux obtenant ainsi du thiodiglycol (TDG) qu'il a fait réagir avec du trichlorure de phosphore (Figure 3).

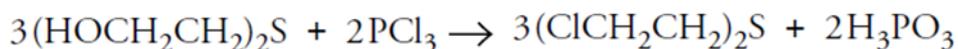
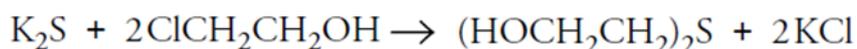


Figure 3 : Synthèse de l'ypérite par Meyer en 1886 (5)

L'ypérite obtenue par cette réaction dite de Meyer est pure et induit des effets plus délétères que l'ypérite obtenue précédemment. Meyer décrivit que même des solutions diluées d'ypérite induisaient une inflammation cutanée. Il testa ses vapeurs sur des lapins et décrivit des rougeurs au niveau des yeux ainsi que de leur nez au premier jour. Au second jour, il décrivit une inflammation de leur nez, oreilles et yeux, avec des paupières « collées » par les sécrétions lacrymale. Les lapins moururent d'une pneumonie au bout de trois jours (5).

En 1913, Hans Thacher Clarke remplaça le trichlorure de phosphore par de l'acide chlorhydrique concentré (Figure 4) (8).

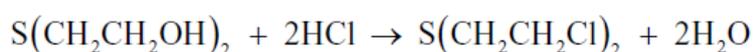
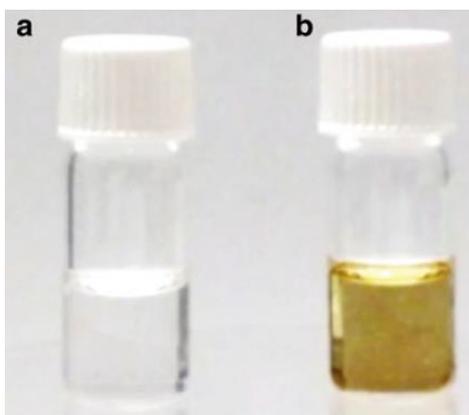


Figure 4 : Synthèse de l'ypérite par Clarke en 1913 (8)

La réaction de Meyer fut utilisée comme procédé de fabrication de l'ypérite par les Allemands lors de la première guerre mondiale. Les alliés, qui n'avaient pas tous les réactifs à disposition, ont utilisé un autre procédé : le procédé Levinstein consistant à faire réagir de l'éthylène avec du dichlorure de soufre comme Despretz l'avait fait auparavant. L'ypérite obtenue avec ce procédé est cependant moins pure puisqu'elle contient environ 30 % d'impuretés, lui conférant la couleur jaune et l'odeur alliée de l'ypérite (Figure 5) (9, 10). Ces impuretés sont la signature chimique de la fabrication de l'ypérite par ce procédé et permettent ainsi d'identifier le pays l'ayant synthétisée. En 1916, deux chimistes allemands, Wilhelm Lommel et Wilhelm Steinkopf, ont développé une méthode de production d'ypérite à grande échelle sous la direction de Fritz Haber (11, 12).



*Figure 5 : Deux fioles contenant de l'ypérite à différent degrés de pureté
a) >99.9 %, b) 98.5 % (par analyse en spectroscopie RMN) (7)*

Bien que l'ypérite soit classée parmi les agents létaux et qu'elle fut responsable de 80 % des victimes par arme chimique, son taux de mortalité n'est que d'environ 3 % (13). C'est donc un agent plus incapacitant que léthal (2, 14). En effet, le nombre moyen de jours à l'écart des combats fut de 42. L'utilisation de l'ypérite avait ainsi pour but de désorganiser et d'affaiblir l'ennemi (15). De plus, l'ypérite est un agent persistant qui résiste à l'eau et reste actif de nombreuses années, laissant ainsi les sols contaminés (16).

Parmi les agents vésicants, d'autres molécules ont été synthétisées, telles que la lewisite ou 2-chlorovinylchlorarsine, également appelée chlorovinylarsine. Cet agent possède un atome d'arsenic lui conférant une toxicité systémique liée à l'arsenic en plus de ses propriétés vésicantes. Les lésions apparaissent plus rapidement que l'ypérite et induisent une coloration grisâtre caractéristique autour de la zone de contact. La lewisite a été synthétisée en 1918 par un capitaine de l'armée américaine W. L. Lewis, à la fin de la première guerre mondiale, mais n'a pas été utilisée, l'armistice ayant été signée auparavant. Le processus de production de la lewisite génère, en plus de la lewisite (lewisite-1, code OTAN L-1), la Bis(2-chlorovinyl)chlorarsine (lewisite-2, code OTAN L-2) et la Tris(2-chlorovinyl)arsine (lewisite-3, code OTAN L-3) qui sont éliminées par distillation sous vide (17). D'un point de vue militaire, la lewisite possède l'inconvénient de s'hydrolyser rapidement, la rendant inactive lors de temps pluvieux, humide (13). L'usage de la lewisite par le Japon et l'URSS était principalement en tant qu'additif de l'ypérite pour augmenter sa volatilité (2) ou abaisser son point de fusion (4). Par ailleurs, la lewisite perdit son intérêt militaire suite à la découverte de son antidote, le BAL (British Anti-Lewisite) ou dimercaprol. Cet antidote, chélateur des métaux lourds (dont l'arsenic), développé en 1940 par des biochimistes anglais, agit en protégeant la pyruvate déshydrogénase et en inversant les effets de l'arsenic sur l'enzyme (18). Cependant, il n'existe plus de préparation de BAL à usage oculaire ou cutané (13), son seul mode d'administration est l'injection intramusculaire profonde (19). Les injections, qui sont par ailleurs très douloureuses, sont à réaliser avec des seringues en verre, le plus tôt possible. La 1^{ère} injection devra être suivie de 5 autres injections espacées de 4 h, puis 6 injections au 2^{ème} jour, 4 le 3^{ème} jour, puis 2 injections par jour pendant 7 à 10 j (19). D'autres chélateurs hydrosolubles utilisés en clinique pourraient être utilisés tels que l'acide meso-2,3-dimercaptosuccinique (DMSA) et l'acide 2,3-dimercapto-1-propanesulfonique (DMPS). Ceux-ci sont mieux tolérés, et auraient une efficacité de chélation similaire au BAL. Cependant, le DMSA est disponible uniquement sous forme de gélules en France, rendant son absorption trop variable. De plus, le manque de données de toxicocinétique de la lewisite et d'études d'efficacité de ces chélateurs dans le cas d'une intoxication à la lewisite ne permet pas de préjuger de leur efficacité dans ce contexte (19).

Trois autres moutardes, à l'azote cette fois, (bis(2-chloroéthyl)éthylamine, bis(2-chloroéthyl)méthylamine et tris(2-chloroéthyl)amine) (4), ont été synthétisées durant la seconde guerre mondiale dans le but d'être utilisées comme armes chimiques, mais n'ont jamais été employées à cet effet. En revanche, elles ont été utilisées à des fins médicales pour le traitement de lymphomes. Ainsi la chlorméthine a été la première moutarde à l'azote qui fut utilisée en chimiothérapie en 1942. La première indication fut le traitement du lymphome du fait de la sensibilité du tissu lymphoïde qui a été observée après les expositions aux agents vésicants (20). Auparavant, à la fin des années 1920, une diminution de « divers types histologique de tumeurs superficielles » avait été observée après application par voie topique d'ypérite dissoute dans de l'alcool (21). Cependant, des difficultés d'administration par voie intraveineuse ont conduit à abandonner l'utilisation de l'ypérite en clinique au profit des moutardes azotées (21). De nombreuses molécules, dérivées des moutardes azotées sont encore aujourd'hui utilisées en chimiothérapie telle que le cyclophosphamide (Endoxan®) (22, 23).

I.1.2 Nomenclature des composés

De très nombreux composés furent utilisés lors de la première guerre mondiale. Des codes et abréviations différents selon les pays furent utilisées afin d'identifier le contenu des obus. L'ypérite, qui est l'appellation française du sulfure d'éthyle dichloré est appelée « sulfur mustard » ou « mustard gas » par les anglais et américains et « LOST » par les allemands. LOST est l'abréviation des noms des deux chimistes allemands (Lommel et Steinkopf) ayant développé une technique de production de l'ypérite à grande échelle (11). L'abréviation utilisée par les alliés était HS pour « Hun Stoffe » (2, 24). Par la suite, seule la lettre « H » sera adoptée par les alliés. Pour distinguer l'ypérite pure, l'abréviation « HD » fût ensuite utilisée, le « D » signifiant « distilled ». A noter que, en toute rigueur, le terme HD fait référence au procédé de fabrication par le processus Levinstein uniquement (25). Néanmoins, les codes OTAN retenus pour l'ypérite sont « H », et « HD » pour sa forme distillée, quel que soit le

processus de fabrication. Les moutardes azotées possèdent quant à elles le code « HN », la lewisite le code « L » et le mélange ypérite-lewisite le code « HL » (26).

Dans cette thèse, l'abréviation HD sera utilisée pour désigner l'ypérite.

I.1.3 L'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC)

Des armes chimiques ont été utilisées depuis des siècles (flèches empoisonnées, fumées d'arsenic,...) mais l'essor de la chimie industrielle du XIX^{ème} siècle a réellement enclenché une course à l'innovation dans ce domaine. Ainsi, la première guerre mondiale a vu de nombreuses armes chimiques être utilisées malgré des accords interdisant leur emploi (27). Le premier accord datait de 1675, et avait été signé à Strasbourg de manière bilatérale entre la France et l'Allemagne pour interdire l'utilisation de balles empoisonnées. En 1874, un nouvel accord international, entre 15 états, portant sur les lois et coutumes de guerre, a été conclu à Bruxelles. Ce texte interdisait l'utilisation de poisons, d'armes empoisonnées ou causant d'inutiles souffrances. Cependant, ce texte ne fut pas ratifié (28, 29) mais servit de base au traité de La Haye de 1899, interdisant « l'emploi des projectiles ayant pour unique but de répandre des gaz asphyxiants ou délétères » (29). Malgré ce traité, de nombreuses armes chimiques furent utilisées lors de la première guerre mondiale. 90 000 soldats en seraient morts et près d'un million auraient perdu la vue, été défigurés ou atteints d'autres blessures graves (29). L'emploi d'armes chimiques créa un traumatisme des populations, amenant au Protocole de Genève de 1925 interdisant l'emploi lors de guerre de gaz asphyxiants, toxiques ou similaires et de moyens bactériologiques. Cependant, ce protocole n'interdisait pas la mise au point, la fabrication et la détention d'armes chimiques. De plus, les pays se gardaient le droit de riposter avec de telles armes en cas d'agression chimique et également d'attaquer par ce moyen des pays qui n'auraient pas signé le protocole. Ainsi, après la première guerre mondiale et malgré la signature du Protocole de Genève, la recherche sur les armes chimiques se poursuivit avec notamment la découverte des agents neurotoxiques organophosphorés dans les années 30. En effet, en 1936, le Dr Schrader isola accidentellement le tabun lors de recherches portant sur les pesticides. Le tabun était initialement appelé par les allemands Le-100 puis Trilon-83 avant

de devenir tabun, puis les américains le nommèrent GA pour « German Agent A »(13). Schrader découvrit ensuite en 1938 le sarin, 10 fois plus toxique que le tabun, également nommé T-144 et Trilon-46 et GB par les américains (13). Ces agents neurotoxiques n'ont cependant pas été utilisés lors de la seconde guerre mondiale. En revanche, l'ypérite fut utilisée lors de conflits ultérieurs à la première guerre mondiale, y compris sur des populations civiles (4, 6, 30-33) :

- 1919 : conflit entre le Royaume-Uni et l'armée rouge
- 1921-1927 : Espagne contre les insurgés du Rif au Maroc
- 1930 : Italie contre Lybie
- années 1930 :
 - o Union Soviétique contre Japon,
 - o Italie contre Ethiopie (Abyssinie)
- 1939-1945 :
 - o Pologne contre Allemagne
 - o Allemagne contre Pologne et Union Soviétique
 - o Japon contre Chine
- 1963-1967 : Egypte – Nord Yémen
- 1983-1988 : Irak contre Iran
- 1992 : Arménie – Azerbaïdjan
- 1995-1997 : Soudan
- 2015-2016 : Syrie

Après la Première Guerre Mondiale, l'ypérite fut utilisée de façon massive lors de la Guerre Iran-Irak de 1980-1988 (13, 34).

Ce n'est que le 13 janvier 1993 que la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) fut signée à Paris par 130 pays, puis entra en vigueur en 1997. L'OIAC est composée de trois organes principaux : la Conférence des États parties, le Conseil exécutif et le Secrétariat technique. Cette Organisation veille à la bonne application de la CIAC, y compris en ce qui concerne la vérification du respect de la Convention par des inspections (35).

Ci-après l'article premier de la CIAC fixant les principes généraux de cette Convention.

ARTICLE PREMIER

OBLIGATIONS GENERALES

1. Chaque Etat partie à la présente Convention s'engage à ne jamais, en aucune circonstance :

a) Mettre au point, fabriquer, acquérir d'une autre manière, stocker ou conserver d'armes chimiques, ou transférer, directement ou indirectement, d'armes chimiques à qui que ce soit;

b) Employer d'armes chimiques;

c) Entreprendre de préparatifs militaires quels qu'ils soient en vue d'un emploi d'armes chimiques;

d) Aider, encourager ou inciter quiconque, de quelque manière que ce soit, à entreprendre quelque activité que ce soit qui est interdite à un Etat partie en vertu de la présente Convention.

2. Chaque Etat partie s'engage à détruire les armes chimiques dont il est le propriétaire ou le détenteur, ou qui se trouvent en des lieux placés sous sa juridiction ou son contrôle, conformément aux dispositions de la présente Convention.

3. Chaque Etat partie s'engage à détruire toutes les armes chimiques qu'il a abandonnées sur le territoire d'un autre Etat partie, conformément aux dispositions de la présente Convention.

4. Chaque Etat partie s'engage à détruire toute installation de fabrication d'armes chimiques dont il est le propriétaire ou le détenteur, ou qui se trouve en un lieu placé sous sa juridiction ou son contrôle, conformément aux dispositions de la présente Convention.

5. Chaque Etat partie s'engage à ne pas employer d'agents de lutte antiémeute en tant que moyens de guerre.

Les Etats parties n'ont donc pas uniquement l'interdiction de fabriquer ou d'utiliser des armes chimiques, ils ont également l'obligation de détruire leur stocks y compris ceux abandonnés et oubliés (36). A ce jour, il y existe 193 Etats parties, un Etat signataire qui n'a pas ratifié la CIAC (Israël) et 3 Etats non signataires (Corée du Nord, Egypte et Soudan du Sud). L'Angola qui faisait partie des Etats non signataires a ratifiée la CIAC en 2015 (37).

La classification de la CIAC comporte 3 tableaux. Le premier tableau correspond aux agents de guerre, le tableau 2 comprend des « composés chimiques sans intérêt commercial et pouvant être utilisés à des fins militaires ainsi que des précurseurs du tableau 1 fabriqués en petites quantités industrielles ». Le troisième tableau regroupe « d'anciens agents de guerre chimique aujourd'hui fabriqués en grandes quantités industrielles à des fins non interdites par la CIAC ainsi que des précurseurs de la synthèse de produits du tableau 1 ou du tableau 2 » (38).

L'ypérite figurant sur le tableau I de la CIAC est donc interdite. Malgré cela, elle a été utilisée en Syrie (2015-2016) par un acteur non étatique, causant des victimes civiles, notamment un enfant de 3 ans et un bébé de 5 jours (39). De plus, l'ypérite est facilement synthétisable (33), ne possède pas d'antidote, et induit des lésions particulièrement impressionnantes, pouvant terroriser la population (39). Tous ces aspects font de l'ypérite un agent de la menace. En plus du risque terroriste, il existe un risque accidentel puisque de nombreux obus de la première guerre mondiale chargés d'ypérite sont encore enfouis. Chaque année, environ 20 tonnes d'obus chimiques sont déterrés dans le Nord et l'Est de la France (40), lors de travaux de terrassement, agricoles ou encore par des collectionneurs de militaria, engendrant des expositions accidentelles à l'ypérite. Ainsi, en septembre 2021, un agriculteur a été exposé à de l'ypérite après manipulation d'un obus coincé dans sa machine agricole. Ne se sachant pas exposé, il a contaminé sa famille par transfert de contamination notamment via la literie, conduisant à l'hospitalisation de sa femme et de ses enfants (41). L'ypérite constitue donc un enjeu de santé publique en raison de la menace terroriste et du risque accidentel.

Bien que la mise au point, l'utilisation et la détention soient prohibées par la CIAC, des dérogations existent à des fins de recherche. Ainsi en France, une seule installation unique à petite échelle (INSUPE, à DGA Maîtrise NRBC) est habilitée à synthétiser ces agents dans le cadre de recherche ou d'expertise. L'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) est

quant à lui habilité à utiliser ces agents dans le cadre de ses recherches. Ces autorisations font l'objet de contrôles, d'inspections et de procédures strictes. Ainsi, dans le cadre de travaux de recherche portant sur l'ypérite, des laboratoires universitaires et/ou privés se trouvent contraints de substituer l'ypérite par un de ses analogues, tels que la moutarde à l'azote ou le 2-chloroéthyl-éthyl sulfide (CEES) structurellement très proche de l'ypérite. Le CEES avait par ailleurs été étudié initialement comme un potentiel agent chimique de guerre (42). Peu d'études ont cependant comparé leurs effets physiopathologiques afin d'évaluer la pertinence de cet analogue. Un des objectifs de cette thèse était donc d'évaluer la pertinence du CEES en tant qu'analogue de l'ypérite dans le cadre d'études physiopathologiques et thérapeutiques.

I.2. L'ypérite

I.2.1 Physiopathologie

L'ypérite, sous forme liquide ou gazeuse, pénètre dans l'organisme par plusieurs voies : pulmonaire, oculaire, cutanée et entérale (en cas d'ingestion d'aliments contaminés). La pénétration de l'ypérite est indolore et les premiers effets apparaissent après un délai de latence. Ce délai de latence ainsi que la sévérité des lésions dépendent principalement de la dose, de la voie et du mode d'exposition (43). Ainsi, les délais d'apparitions des premiers symptômes différent selon les sources. Le Tableau I ci-dessous résume les principaux effets selon la voie d'exposition et les délais moyens d'apparition des premiers symptômes (3, 13, 44, 45). Les principaux organes affectés correspondent aux voies d'exposition, cependant, l'ypérite diffuse dans tout l'organisme et peut induire des effets cliniques sur d'autres organes et systèmes (13).

Tableau I : Principaux effets cliniques de l'ypérite et délais d'apparition selon les voies d'exposition

Atteinte	Sévérité	Effets	Délai d'apparition des 1 ^{ers} effets
Oculaire	Légère à modérée	<ul style="list-style-type: none"> - larmoiement intense - sensation de brûlure, sensation granuleuse - rougeur - irritation conjonctivale - photophobie - douleurs oculaires croissantes - vision floue 	3-12 h (13, 44)
	Sévère	<ul style="list-style-type: none"> - blépharospasme, - douleurs très vives - hémorragie conjonctivale - larmoiement purulent - œdème puis vésications palpébrales - possibilité d'ulcérations cornéennes - cécité possible 	1-6 h (13, 44)
Pulmonaire	Légère à modérée	<ul style="list-style-type: none"> - signes d'irritation avec congestion non spécifique des voies aériennes supérieures (rhinorrhée, éternuements, épistaxis, toux sèche) - trachéobronchite avec expectoration 	6-24 h (13, 44)
	Sévère	<ul style="list-style-type: none"> - toux productive - œdème entraînant dyspnée et dysphonie - nécrose muqueuses bronchiques - atélectasie et bronchopneumopathie avec expectoration purulente Puis : - œdème pulmonaire - insuffisance respiratoire 	2-8 h (13, 44)
Cutanée	Modérée	<ul style="list-style-type: none"> - érythème - prurit 	2-12 h (3, 44, 45)
	Sévère	<ul style="list-style-type: none"> - phlyctènes 	12-48 h (44)

L'œil est l'organe le plus sensible à l'ypérite (46). 80 à 90 % des victimes présentent des symptômes oculaires (47). Après une période asymptomatique variable, les premiers symptômes sont une irritation accompagnée d'une rougeur et d'un larmoiement puis, avec l'augmentation de la dose d'exposition, d'autres symptômes apparaissent notamment un blépharospasme, une douleur de plus en plus intense, des dommages cornéens et une photophobie (13, 47). Cette dernière peut durer des semaines (13). L'acuité visuelle diminue proportionnellement aux dommages cornéens (47). La guérison complète d'une conjonctivite modérée nécessite environ 2 semaines, tandis que pour une conjonctivite sévère, avec une faible atteinte cornéenne, il faut compter 5 semaines. Pour les cas plus sévères, plusieurs mois sont nécessaires (13) et parmi ceux-ci, 0,5 % des victimes ont développé une kératite ulcéreuse retardée jusqu'à 40 ans après leur exposition (47). Une décontamination immédiate est cruciale du fait de la vitesse de pénétration oculaire de l'ypérite estimée à quelques minutes (13, 48).

Sur le plan respiratoire, les voies supérieures puis inférieures sont atteintes par l'ypérite de façon dose-dépendante. A faible dose, les premiers symptômes sont une irritation, une toux sèche et un enrouement, puis les symptômes nasaux apparaissent peu après. La sévérité des symptômes augmente avec la dose. La formation de pseudomembranes et la présence de débris inflammatoires conduisent à une occlusion des voies respiratoires supérieures puis inférieures (13, 49, 50). Les premiers jours, les bronchites sont non bactériennes, tandis qu'à partir du 4^{ème} jour environ, une infection bactérienne apparaît (13), l'ypérite induisant une immunosuppression. La mortalité par l'ypérite est généralement due à une défaillance respiratoire ou à une immunosuppression différée (47, 50).

Sur le plan cutané, les lésions apparaissent après un délai de latence variable selon la dose d'exposition, la forme (liquide ou vapeur), la température, l'humidité... Les premiers symptômes sont un érythème et un prurit. Des phlyctènes peuvent ensuite se développer. Celles-ci sont remplies d'un exsudat jaunâtre translucide. Ce liquide ne contenant pas d'ypérite mais du thiodiglycol (TDG), un métabolite pouvant servir de biomarqueur (13). 0,1 à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'ypérite suffisent à induire un érythème et un prurit et 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ des phlyctènes (3). Du fait du risque d'infection des lésions, les victimes sont prises en charge comme des brûlés immunodéprimés (44).

I.2.2 Mécanisme d'action

Contrairement à la lewisite, le mécanisme d'action de l'ypérite reste imparfaitement compris. Néanmoins, les nombreuses recherches ont pu mettre en évidence ses principaux mécanismes d'action.

L'absorption cutanée et la sévérité des lésions dépendent de la dose, de la température, de l'humidité ainsi que de l'épaisseur de la peau. Environ 80 % de la dose d'ypérite reçue sur la peau vont s'évaporer tandis que 10 % passeront dans la circulation systémique. Les 10 % restants au niveau du site d'exposition, seront responsables des effets locaux (51-53). L'ypérite étant lipophile, le tissu adipeux et les annexes cutanées vont constituer un réservoir (54, 55). De même, la pénétration de l'ypérite sera plus élevée par les follicules pileux que par les glandes sudoripares (56).

Après pénétration, l'ypérite va se cycliser en présence d'eau par une réaction de substitution nucléophile pour former l'ion épisulfonium. Cet ion, très réactif, va réagir avec les molécules nucléophiles (51), notamment avec les groupements thiols (-SH) des protéines et les groupements amines (-NH₂) des bases aminées des acides nucléiques pour former des adduits (51, 57). Une seconde cyclisation peut ensuite avoir lieu avec le départ du second atome de chlore et former ainsi un double adduit. L'ypérite est donc mono- et bi-alkylante. La Figure 6 ci-dessous représente l'alkylation des deux brins d'ADN par deux cyclisations successives de l'ypérite. Les principales alkylations sont la mono-alkylation de la guanine en

position N7, pour former la N7-hydroxyéthylthioéthylguanine (HETE-N7Gua, ou N7-HETEG), pour 60 %, puis la mono-alkylation de l'adénine en position N3, pour former la N3-hydroxyéthylthioéthyl-adénine (HETE-N3Ade ou N3-HETEA), pour 16 %, et enfin la bi-alkylation inter- et intra-brins de la guanine en N7, conduisant au bis(N7-guanyl)-éthylthioéthyl (N7Gua-ETE-N7Gua ou Bis-G), pour 16 % (51, 58).

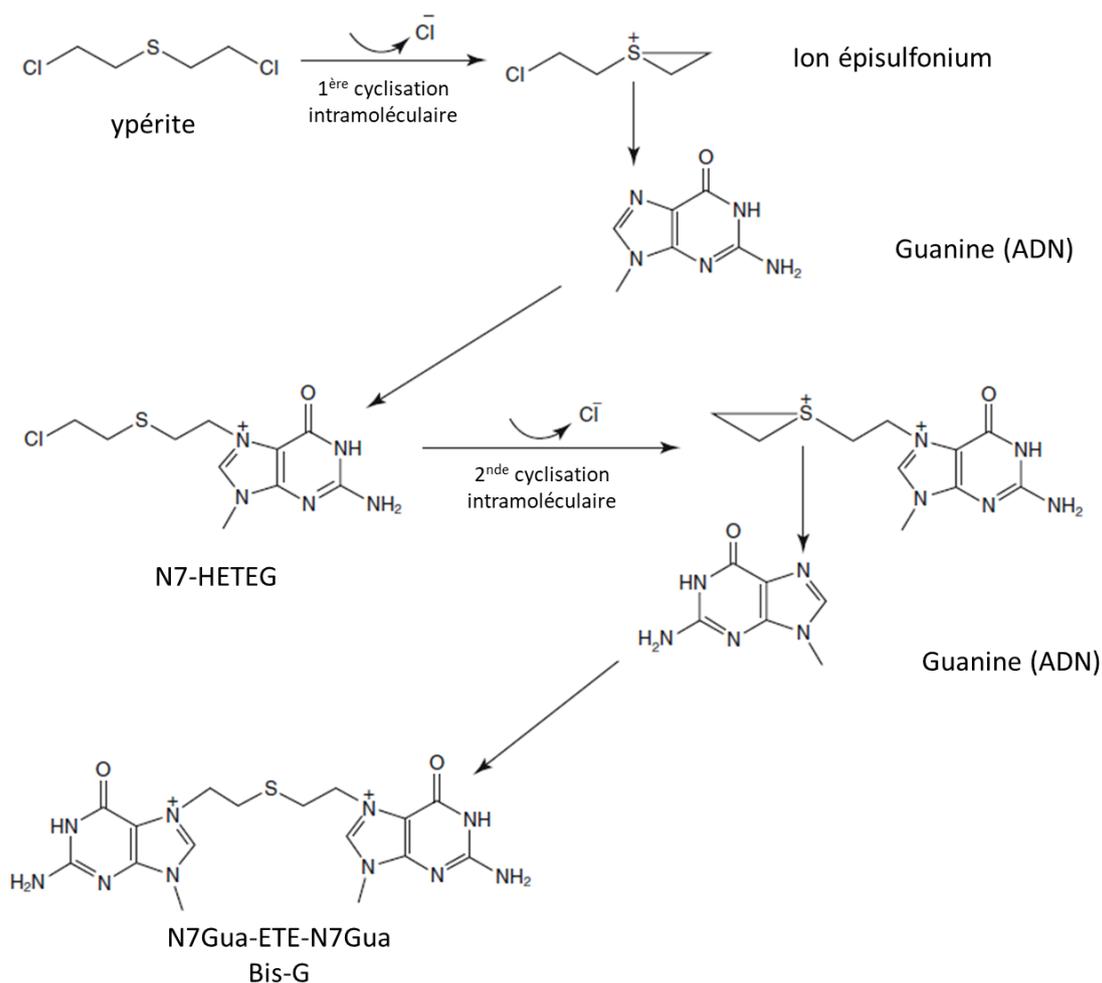


Figure 6 : Alkylation de l'ADN par l'ypérite.

La cyclisation intramoléculaire de l'ypérite par libération de Cl^- aboutit à la formation de l'ion épisulfonium qui va alkyler notamment les bases de l'ADN, dont la guanine en position N7.

Une seconde cyclisation peut avoir lieu conférant le caractère bialkylant de l'ypérite.

(D'après Mostafalou and Abdollah, 2015, (51))

Ces alkylations vont conduire à l'arrêt du cycle cellulaire et activer le système de réparation de l'ADN dont l'enzyme poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). L'activation de la PARP va conduire à la déplétion de son cofacteur, le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) (51, 52). Lorsque l'exposition à l'ypérite est modérée, la cellule pourra soit réparer son ADN, soit entrer dans la voie de l'apoptose. Dans le cas d'une plus forte exposition, la déplétion de NAD⁺ va entraîner la mort cellulaire par nécrose via l'activation de protéases et de cytokines proinflammatoires (52, 53).

Une autre voie de toxicité de l'ypérite décrite est celle des thiols, cibles d'alkylation par l'ion épisulfonium. Parmi les composés comportant un groupement thiol, le glutathion (GSH) est un acteur majeur de la défense contre le stress oxydatif grâce aux enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase). La déplétion du GSH et l'alkylation de ces enzymes entraînent ainsi une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO seront responsables de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et de leur dégradation (51, 59).

Une troisième voie de toxicité liée aux médiateurs de l'inflammation a été décrite. En effet, après une exposition à l'ypérite, un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires sont exprimées par des kératinocytes, fibroblastes, et des cellules inflammatoires infiltrant la peau (60). Les principales cytokines exprimées après une exposition cutanée à l'ypérite sont le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), les Interleukines-1 α , -1 β , -6 et -8 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) (6, 51, 59). Il a de plus été décrit que les voies du Nuclear Factor-kappa B (NF κ B) et du Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) sont impliquées dans la libération de ces cytokines (60).

Tous ces dommages cellulaires vont particulièrement affecter les cellules à division rapide telles que les cellules de la couche basale épidermique ou les cellules de la moelle osseuse, si bien que l'ypérite peut être considérée comme un agent radiomimétique (61).

I.2.3 Biomarqueurs

Comme mentionné dans la fiche Piratox n°6 de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) portant sur l'ypérite, « à ce jour, 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 » (62). Or, afin de faire la preuve médico-légale d'une exposition à l'ypérite, il est nécessaire de disposer de biomarqueurs spécifiques. De plus, ceux-ci doivent être rémanents afin de pouvoir réaliser la détection le plus longtemps possible après l'exposition. Les méthodes de détection doivent être par ailleurs suffisamment sensibles pour détecter de faibles quantités de biomarqueurs.

Les méthodes actuelles de détection de biomarqueurs de l'ypérite visent à doser ses métabolites issus de l'hydrolyse ou ses adduits (63). Les métabolites de l'ypérite issus de ses principales voies métaboliques sont les produits d'hydrolyse et d'oxydation, les produits de la β -lyase (conjugaison au glutathion), les adduits de l'ADN et les adduits protéiques (Figure 7) (64, 65).

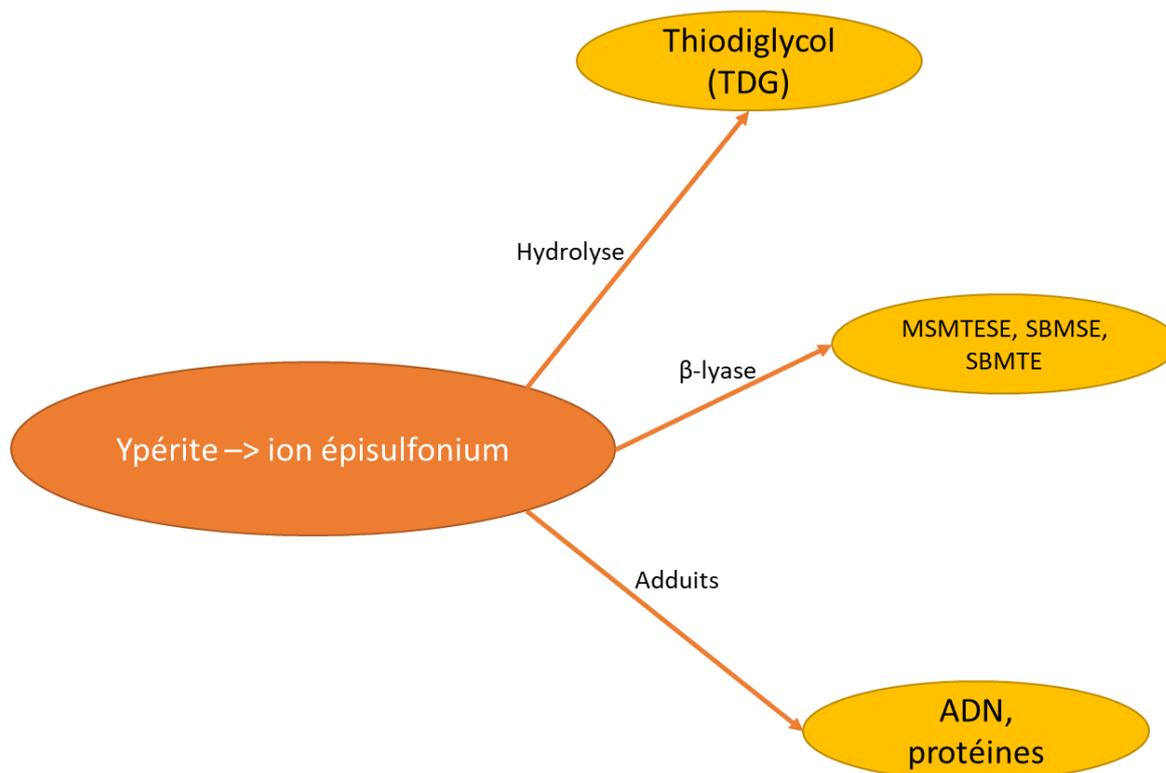


Figure 7 : Biomarqueurs de l'ypérite issus de ses principales voies métaboliques. L'hydrolyse et l'oxydation, les produits issus de la voie de la β -lyase, les adduits aux protéines et à l'ADN. (D'après Xu et al., 2014 (64) et Steinritz and Thiermann, 2005 (63)).

Les principales méthodes employées pour détecter ces biomarqueurs sont la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (64) ou à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS) (66), la chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) (66), la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) (63, 64). Des étapes de préparation d'échantillons telles que l'extraction sur phase solide (SPE), de réduction, de dérivation peuvent être nécessaires (66, 67).

Le principal produit d'hydrolyse est le thiodiglycol (TDG) (Figure 8). Il peut être détecté dans l'urine et l'exsudat de phlyctène durant une environ une semaine, et pendant moins de 48 h dans le sang (64). En plus de cette courte fenêtre de détection, le TDG a l'inconvénient d'être endogène (63, 64). Ce biomarqueur n'est donc pas spécifique de l'ypérite. Par ailleurs, le TDG figure au tableau 2 de la CIAC car il peut servir de précurseur à la synthèse de l'ypérite (*cf* synthèses de Meyer, Figure 3, et Clarke, Figure 4).

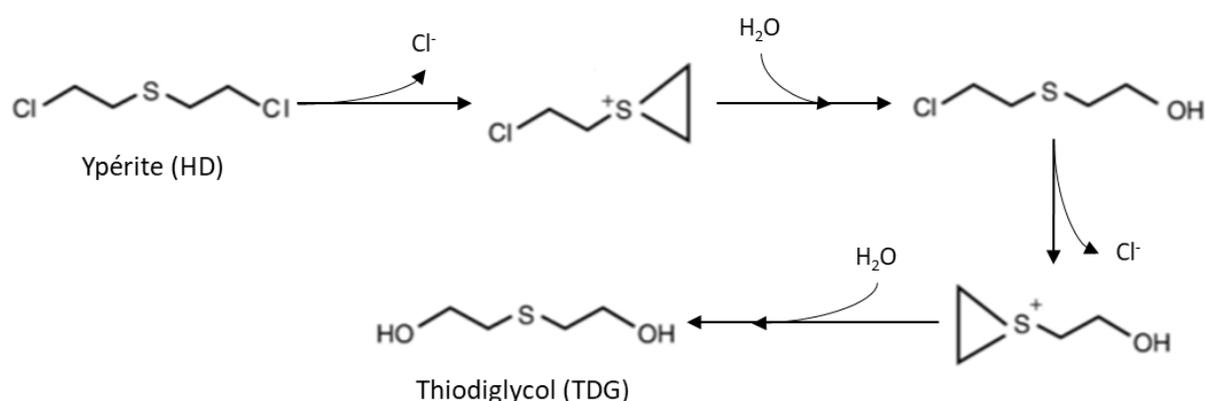


Figure 8 : Hydrolyse de l'ypérite (HD) en thiodiglycol (TDG).

Formation de l'ion épisulfonium par substitution nucléophile suivi d'une hydrolyse. L'ypérite possédant deux atomes de chlore, cette réaction est reproduite sur le second chlore, aboutissant ainsi au TDG.

Les métabolites de la voie de la β -lyase issus de la conjugaison avec le glutathion (1-méthyl-sulfinyl-2-[(méthylthio)éthyl-sulfonyl]éthane ou MSMTESE, 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane] ou SBMSE, 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] ou SBMTE) sont quant à eux spécifiques de l'ypérite. Ces adduits ont été détectés dans l'urine, le sang et l'exsudat de phlyctènes durant environ 10 j, chez des victimes exposées à l'ypérite (64). Cette fenêtre de détection est donc également relativement courte.

Concernant les adduits de l'ypérite avec l'ADN, le principal représentant est l'adduit de la guanine en position N7 (HETE-N7Gua). Cet adduit est détectable chez l'Homme pendant 30 j dans l'urine, 15 j dans le sang (64) et 21 j dans la peau (68).

Enfin, de nombreux adduits aux acides aminés peuvent être détectés (63, 69). Ainsi, l'adduit au N terminal de la valine de l'hémoglobine (HETE-Val) est détectable durant plus de 3 mois après exposition (64), soit environ la durée de vie d'un érythrocyte. Cet adduit est donc actuellement le biomarqueur le plus persistant, tout en étant spécifique de l'ypérite.

Une autre approche émergente est la recherche d'adduits protéiques par immunochimie. Ainsi, Van der Schans et al. décrivent la production d'anticorps monoclonaux ciblant l'adduit de l'ypérite avec la kératine. Ce type d'approche pourrait permettre à terme de développer des kits de détection d'une exposition à l'ypérite, directement applicables sur la peau (70).

I.2.4 Prise en charge d'une exposition cutanée à l'ypérite

Article n°2 : Therapeutic Perspectives for the Prevention and Treatment of Skin Lesions and Sequelae Induced by Sulfur Mustard

Les traitement et perspectives thérapeutiques susceptibles d'être mis en œuvre lors d'une intoxication cutanée à l'ypérite font l'objet d'une publication intitulée « ***Therapeutic Perspectives for the Prevention and Treatment of Skin Lesions and Sequelae Induced by Sulfur Mustard*** », par Gros-Désormeaux et al., mars 2022, dans International Review of the Armed Forces Medical Services, 95/1, p38-51.

L'ypérite étant un toxique persistant, il existe un risque de transfert de contamination. La première étape de la prise en charge, après l'extraction de la victime, sera donc la décontamination. Plusieurs protocoles de décontamination existent (décontamination médicale interventionnelle, décontamination médicale approfondie) selon l'urgence de la prise en charge. La décontamination s'effectue classiquement au moyen d'un gant poudreux agissant par déplacement du toxique. En effet, les gants poudreux contiennent de la terre de foulon (argile smectique) qui possède une grande surface spécifique et peut ainsi adsorber le toxique. En pratique, il faut tapoter le gant poudreux au-dessus de la zone contaminée pour faire tomber la terre de foulon sur la zone, puis l'essuyer avec l'autre face du gant. L'autre matériel de décontamination couramment utilisé est la RSDL (Reactive Skin Decontamination Lotion) mise au point par les Canadiens (Figure 9) (71-73). La RSDL est une éponge imprégnée d'une solution constituée d'un mélange de 2,3 butanedione mono-oximate de potassium (KBDO à 1,25 M) et de son oxime libre (diacétyl mono-oxime, DAM à 5 %) dans un support de polyéthylène glycol monométhyl éther (PME) dans l'eau » (72, 74). L'oxime a pour but d'agir contre les agents neurotoxiques, ou à défaut de les détruire par une réaction nucléophile de type 2, tandis que le support glycol solubilise les agents huileux, tels que l'ypérite et les retient afin d'éviter qu'ils pénètrent dans la peau (75, 76).

Il n'existe à ce jour aucun antidote de l'ypérite. La prise en charge recommandée par l'ANSM (Fiche Piratox n°6) est uniquement symptomatique et vise à soulager la douleur par des antalgiques (morphine, buprénorphine) et à limiter l'infection (pansement à la pommade de sulfadiazine argentique en couche épaisse). La prise en charge est identique à celle des brûlés immunodéprimés. En milieu hospitalier, une mise à plat des phlyctènes menaçant de se rompre peut être réalisée ainsi que le traitement des zones nécrosées. Comme pour les brûlures thermiques, il faudra veiller à corriger les pertes hydro-électrolytiques et à lutter contre la dénutrition. Plusieurs techniques de détersion (laser, hydrochirurgie) peuvent être mises en place ainsi que des greffes de peau (62).



Figure 9 : Eponge RSDL.

Ce dispositif permet de décontaminer une zone exposée à un toxique persistant tel que l'ypérite. Il faut essuyer la zone avec l'éponge imprégnée de la solution RSDL. Un rinçage à l'eau dès que possible est ensuite recommandé.

Afin d'améliorer la prise en charge des victimes exposées à l'ypérite, des pistes thérapeutiques émergent. Ces thérapeutiques couvrent différentes temporalités de prise en charge, puisque certaines seraient à mettre en œuvre avant l'apparition des lésions, d'autres une fois que les signes cliniques apparaissent et enfin les dernières pour traiter les séquelles.

Des approches innovantes cherchent à piéger l'ypérite avant qu'elle agisse. C'est le cas de la mélatonine administrée en pré-traitement. D'autres thérapeutiques potentielles sont basées sur les voies de toxicité connues de l'ypérite ou des voies impliquées dans la réparation tissulaire. Ainsi, des thérapeutiques antiinflammatoires, antioxydantes ainsi que des agomiR et antagomiR (miARN régulant les ARNm) pourraient limiter les lésions et faciliter la cicatrisation. Enfin, le dispositif médical Recell® pourrait permettre de traiter les dyspigmentations, séquelles des lésions induites par l'ypérite.

Toutes ces approches thérapeutiques sont décrites dans l'article ci-dessous.

Therapeutic Perspectives for the Prevention and Treatment of Skin Lesions and Sequelae Induced by Sulfur Mustard.

By F. GROS-DESORMEAUX¹, F. CAFFIN², B. BACCUS² and C. PIERARD². France



Fanny GROS-DESORMEAUX

Pharmacien Principal (OF-3) Fanny GROS-DESORMEAUX is researcher in Vesicant Unit in Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Brétigny-sur-Orge, France).

She got a Pharmacy doctorate and a master degree of Human Toxicology and Risk Assessment. Her research area is the medical countermeasures against sulfur mustard, especially regarding skin and eye intoxications.

For this purpose, she is working on mice and rabbit models in order to assess efficacy of new medical countermeasures and to find new relevant biomarkers.

RESUME

Perspectives thérapeutiques pour la prévention et le traitement des lésions et des séquelles cutanées induites par le gaz moutarde.

L'ypérite (SM) demeure un agent de la menace chimique. La prise en charge de ses lésions représente un défi notamment sur le plan cutané, à la fois pour le traitement des lésions lors de la phase aiguë de l'exposition, mais également pour le traitement des séquelles.

La prise en charge thérapeutique actuelle est symptomatique et comprend des soins de support, une antalgie et une prévention des infections. Plusieurs pistes thérapeutiques visant à accélérer la cicatrisation, et à traiter les séquelles cutanées émergent. Parmi elles, se dégage la mélatonine administrée avant exposition à l'ypérite qui agirait comme un piègeur de l'ypérite; des antagonistes et agonistes permettant de favoriser la cicatrisation et de lutter contre des cancers, ou encore, le dispositif Recell[®] pour traiter la dépigmentation qui est une séquelle fréquente.

Les traitements présentés dans cette revue permettraient de prévenir l'apparition des lésions induites par l'ypérite, faciliter la cicatrisation, réduire les séquelles et améliorer ainsi la qualité de vie des victimes.

KEYWORDS: Sulfur mustard, Skin lesions, Therapeutics, Wound healing, Sequelae.

MOTS-CLÉS : Ypérite, Lésions cutanées, Traitements, Cicatrisation, Séquelles.

BACKGROUND

Despite the Chemical Weapons Convention (CWC) ratified by 193 countries¹, the chemical threat remains actual as evidenced by events in the Middle East in 2015²⁻³. Chemical weapons are commonly divided in three main categories: lethal, incapacitating and riot-control agents. Among lethal agents, vesicants are persistent

¹ Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 1 place du Général Valérie André, BP73, 91 223 Brétigny sur Orge Cedex, France.

² Direction Centrale du Service de Santé des Armées, 60 Boulevard du Général Valin, CS21623, 75 509 Paris Cedex 15, France.

Corresponding Author:
Phone: (+33) 1 78 65 13 79
E-mail: fanny.gros-desormeaux@def.gouv.fr

and the main agent is sulfur mustard (SM), also called mustard gas, yperite or HD.

SM induces severe and widespread tissue damage (burns, blisters, necrosis), as well as systemic effects. Easily synthesized, this chemical weapon is likely to be used in non-conventional conflicts or for terrorist attacks. It is also established that ISIS had SM in his possession^{4,5}. Beside, despite the commitment of the States Parties which have agreed the CWC, stockpiles can persist or have been disseminated. Alongside to its non-conventional use, SM is a source of recurrent accidental exposure due to numerous shells of the WWI still present in the fields which were heavily bombed. Indeed, 10 to 20 tons are discovered in France each year⁶. Since its first use in 1917 and despite numerous research programs, its mechanism of action remains partially understood. SM has multiple tissue, cellular and molecular targets and its distribution through the body takes only few minutes⁷. The targeted organs are mainly skin, eyes and lungs, but systemic effects are also possible. Moreover, radiomimetic effects of SM lead medical staff to consider casualties as immunocompromised burn victims. Because of the lack of antidote, the medical strategy is still limited to symptomatic and supportive cares to manage pain, to prevent infection and to improve the skin healing. One of the objectives of recovery is to mitigate functional and esthetical sequelae.

The aim of the present paper is to review the most promising therapeutic approaches intended to prevent or to treat SM-induced skin lesions as well as sequelae.

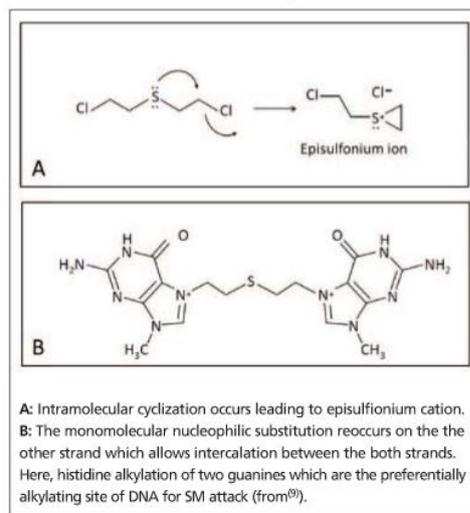
MECHANISM OF ACTION

While SM penetrates into the skin, an episulfonium ion is formed by cyclization (Figure 1). This ion represents the main actor of SM toxicity due to its high electrophilic

reactivity and its ability of alkylation⁸, thus forming DNA and protein adducts⁹. These alkylations have several deleterious effects (Figure 2):

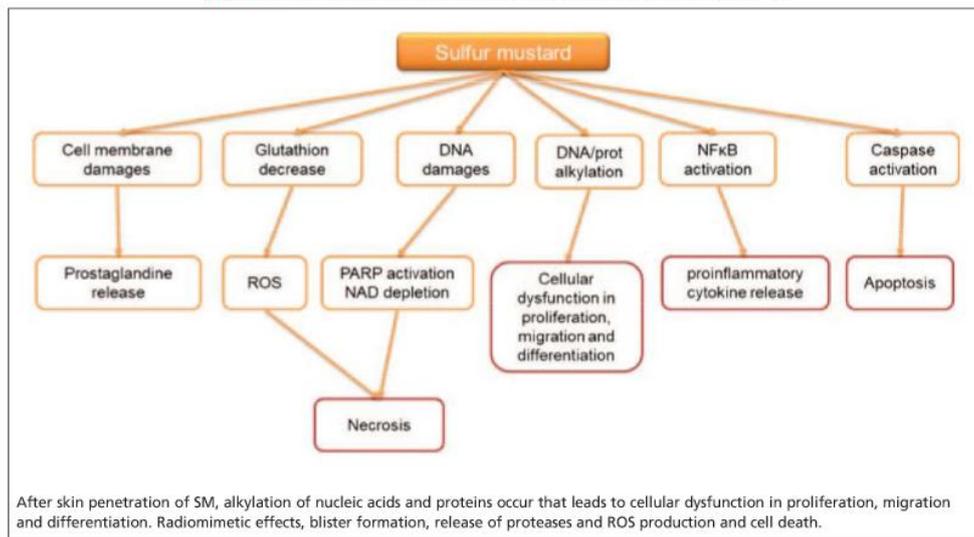
- Inhibition of protein synthesis and mitosis conferring radiomimetic properties to SM. Regarding the skin, these cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects particularly alter the rapidly dividing cells, especially in the epidermal germinal basal layer cells¹⁰. The alteration of proteins such as laminin-5 and integrin- α 6- β 4 causes a detachment of the dermis and epidermis inducing blisters and delaying wound healing¹¹.

Figure 1: Cyclisation of sulfur mustard in episulfonium ion, its main reactive form.



A: Intramolecular cyclization occurs leading to episulfonium cation. B: The monomolecular nucleophilic substitution reoccurs on the other strand which allows intercalation between the both strands. Here, histidine alkylation of two guanines which are the preferentially alkylating site of DNA for SM attack (from⁹).

Figure 2: Metabolic pathways involved in pathophysiology of SM (from²⁴).



VOL.
95/1

After skin penetration of SM, alkylation of nucleic acids and proteins occur that leads to cellular dysfunction in proliferation, migration and differentiation. Radiomimetic effects, blister formation, release of proteases and ROS production and cell death.

VOL.
95/1

- Activation of DNA-repair enzyme, such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). The excessive activation of this enzyme leads to a depletion of its cofactor NAD⁺, thereby inhibiting glycolysis and mitochondrial respiration, inducing a bio-energetic failure, cell necrosis¹², and a release of proteases involved in blister formation¹³.
- Metabolism alteration by generation of Reactive Oxygen Species (ROS), peroxidation of lipids and loss of defense against oxidative stress, as a consequence of the alkylation of thiol groups of antioxidant enzymes (e.g. superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase)^{11, 14}.

PATHOPHYSIOLOGY OF SM-INDUCED SKIN LESIONS

SM is characterized by a strong penetration power and a rapid distribution due to its lipophilic character. It quickly crosses the skin barrier: epidermis within 2 minutes and dermis within 30 minutes¹⁵. The penetration is insidious because it is painless, thus delaying the decontamination of exposed victims, which is however crucial to prevent the apparition of skin lesions.

Skin can be exposed by SM vapor or liquid. First cutaneous symptoms (erythema and pruritus) appear after a delay of 4 to 12 h depending of the dose and the route of exposure (e.g. liquid or vapor)¹⁶. Blisters containing a non-toxic light yellow serous liquid¹⁷ may then arise in 12 to 48 hours at the periphery or in the center of the erythematous area. The basement membrane is damaged with the formation of intra and extra-cellular vacuoles causing dermal-epidermal dissociation¹⁸.

Erythema disappears within 1 to 2 weeks, often leaving hyper and hypo-pigmented zones^{18, 19}. Complete scarring of blistered areas may take several weeks to several months. Moreover, sequelae such as pruritus, burning sensation, pigmentation disorder, angioma or even cancers are frequent. It has been observed that blistered areas are most likely to develop sequelae several years after the exposure²⁰. Rarely, poikilodermal lesions can persist after several years. Persistence of scar is dependent on the depth of the lesion¹¹.

CURRENT CARE RECOMMENDATIONS IN FRANCE

The persistence of SM leads to a major risk of contamination transfer. Therefore, decontamination, starting with the undressing of the exposed people, is the first step of casualty management^{15, 21}. The powder glove containing an adsorbent (fuller's earth) constitutes an emergency decontamination device, currently available in the United Kingdom and the French armed forces, whereas skin decontamination in the US and Canada is based on M291 Skin Decontamination Kit and RSDL (Reactive Skin Decontamination Lotion) respectively²². A thorough decontamination with smooth soap and water may be used to complete the emergency decontamination²³. After decontamination, medical management is symptomatic, similar to those of immunocompromised

burn patients¹⁵. Control of the hydro-electrolytic balance, infection prevention, administration of opiate pain relievers in addition with supportive care, represents the main treatments of severe SM-exposed people²³. In order to prevent infections and to facilitate healing, a silver sulfadiazine dressing can be applied on skin lesions¹⁵. Pruritus, which is a source of infection by scratching, can be relieved by the administration of antihistaminic drugs such as hydroxyzine and doxepine¹³.

A laser debridement, hydro-dissection as well as surgery can be needed, depending on the extension and the severity of the lesions, such as flattening of the largest blisters likely to burst, excision of necrotic tissues and even skin grafts.

PRE-TREATMENTS AND EARLY TREATMENTS

In order to limit the occurrence of skin lesions after cutaneous SM exposure, or their severity in a delayed phase, many therapeutics approaches are developed. The main two approaches described below consist on i) to pretreat soldiers, or even people, at risk of exposure (pre-treatments) or ii) to treat as soon as possible after SM-exposure but before the apparition of symptoms (early treatments).

Protease inhibitors

A local release of some tissue Matrix Metallo Proteases (MMPs) occurs in all the organs affected by SM²⁴. For example, MMP-9 is up-regulated after SM-exposure and contributes to blister formation by facilitating degradation of the extracellular matrix (ECM) including laminin²⁵. To prevent degradation of ECM, protease inhibitors were tested on cultured normal human epidermal keratinocytes exposed to 200µm SM. Thus, the serine protease inhibitor aprotinin (100µm) and the metalloprotease inhibitor amastatin (100mM) added 30 min prior to the SM-exposure prevented the laminin-5γ2 degradation²⁶.

Protease inhibitors could represent an interesting therapeutic approach, mainly in pre-treatment or shortly after SM exposure^{26, 27}.

Cannabinoids

Endogenous cannabinoids play an important role in the wound healing, especially via the migration of keratinocytes and the regulation of inflammation. They act on cannabinoids receptors CB-1 and CB-2 and on peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα). The level of endogenous cannabinoids is regulated by the fatty acid amide hydrolase (FAAH). A study demonstrated *in vivo* that topical application analogues of SM, nitrogen mustard and 2-chloroethyl-ethyl sulfide (CEES also called half-mustard) increased expression of CB-1, CB-2, PPARα and FAAH in immunochemistry experiments²⁸. In order to promote wound healing by limiting inflammation, a FAAH inhibitor belonging to the class of vanillyl alcohol carbamates has been tested *in vivo* on mouse ears exposed to CEES²⁸. Indeed, a diminution of CEES-induced inflammation was observed. However,

since mice were sacrificed 5 h after exposure, a longer study would be necessary to better evaluate the effectiveness of the above FAAH inhibitor. In addition, URB597, another FAAH inhibitor, was also found to accelerate *in vivo* the skin healing in a dose-dependent manner, daily topically applied on mice excision model²⁹.

Calcium modulators

Human hTRPA1 calcium channel receptors activation by SM has been evidenced by intracellular calcium dosage. N-acetylcysteine (NAC) delivered early after exposure inhibits calcium influx, probably through to its direct action on hTRPA1 receptor. Thus, hTRPA1 receptor seems to be a therapeutic target of interest³⁰. An *in vivo* study on CEES-exposed mouse showed a decrease of oedema and pro-inflammatory cytokines expression after topical or intraperitoneal administration of TRPA1 antagonists (respectively A-967079 and HC-030031) after 1 h, 8 h and 16 h post-exposure³¹. NAC was also co-administrated with 2-oxo-thiazolidine-4-carboxylate (OTC) and acetaminophen. An *in vitro* study demonstrated, after SM exposure, that this association induced an increase in catalase activity (100%) and GSH activity (470%) in addition with a better cellular viability (about 40%)³². Moreover, older papers have demonstrated the effectiveness of calmodulin antagonists (10% pentamide, 1% trifluoperazine, 2% thioridazine) and local anesthetics (20% lidocaine and 3% benoxinate) applied as ointments or by intradermal injection for the treatment of cutaneous SM-induced lesions on pigs, 5 minutes post exposure, twice a day for at least 3 days³³.

Melatonin

Several studies dealt with the efficacy of melatonin as a scavenger of SM, and of both oxygen and nitrogen based radicals³⁴. Indeed, melatonin could counteract the formation of the episulfonium ion, which is responsible for protein and DNA/RNA alkylation and participates to oxidative stress³⁵. More precisely, melatonin

acts with SM to form the thiirane, a far less toxic compound^{36, 37}. Interestingly, it was observed in Iranians veterans exposed to SM and having lung and sleep disorder, that oral melatonin (3mg) taken 1 h before bedtime during 56 days increases total antioxidant in blood from 0.43 ± 0.01 to 0.48 ± 0.01 mmol/L³⁸. Furthermore, a study was conducted in rats to test the effectiveness of melatonin administration (intraperitoneal route) 1h before to be intradermal SM intoxicated. An increase in antioxidant production in blood was observed for high doses of SM. However, this study did not confirm a clinical improvement of the treated rats, since they were sacrificed 2 h after exposure³⁹.

ACUTE PHASE TREATMENTS OF SM EXPOSURE

In the acute phase, the first effects of SM on skin appear after a latency period depending on concentration and route of exposure⁴⁰. Thus, treatment of casualties often follows the appearance of the first local symptoms including pruritus, erythema, burning sensation, blister formation^{24, 40, 41}. The most promising acute-phase treatments are described below.

Anti-inflammatory and antioxidants

Based on the known SM mechanism of action, most research works are focused on molecules with anti-inflammatory and/or antioxidant properties.

An original bi-functional non-steroidal anti-inflammatory drug was recently tested on SKH-1 hairless mouse: NDH4338⁴². One part of the molecule targets cyclooxygenase 2 (COX2), while the other acts on acetylcholinesterase⁴³. Local application of NDH4438 following SM vapor exposure allows a dermal oedema reduction at 96 hours, increased re-epithelialization, restoration of basement membrane integrity as well as reduced COX2 expression⁴². Another *in vivo* study conducted in mouse with NDH4338, also reduce skin inflammation, injury and enhanced tissue repair with a decreased mast cell degranulation⁴⁴.

Table I: Pre-treatments and early treatments SM skin exposure.

GROUP	MOLECULES	REFERENCES
Protease inhibitors	Amastatin	Xiannu <i>et al</i> , 2016 ²⁶
	Aprotinin	Xiannu <i>et al</i> , 2016 ²⁶
Cannabinoids	Vanillyl alcohol carbamates	Wohlman <i>et al</i> , 2016 ²⁸
	URB597	Sasso <i>et al</i> , 2016 ²⁹
Calcium modulators	HC-030031 and A-967079	Achanta <i>et al</i> , 2018 ³¹
	NAC + OTC + acetaminophen	Saberi and Mahmodabady, 2009 ³²
	Pentamide	Kadar <i>et al</i> , 2000 ³³
	Trifluoperazine	Kadar <i>et al</i> , 2000 ³³
	Thioridazine	Kadar <i>et al</i> , 2000 ³³
Melatonin	Melatonin	Pohanka <i>et al</i> , 2011 ³⁹
	Melatonin	Shahriary <i>et al</i> , 2018 ³⁸

VOL.
95/1

VOL.
95/1

Antioxidant molecules of natural origin, such as flavonoids mixtures⁴⁵, caffeic acid⁴⁶, or vitamin E⁴⁷ have been successfully tested. Among these molecules, silibinin was studied in U.S.A and Germany. This molecule seems to act on multiple pathophysiological mechanisms linking oxidative stress and inflammation to reduce damages induced by SM or its analogues (CEES and nitrogen mustard)⁴⁸⁻⁵¹. It would also exhibit anti-necrotic and pro-apoptotic properties by eliminating irreversibly damaged cells^{48, 50}. Encouraging results obtained with silibinin have led the American National Institute of Health (NIH) to consider its development as a medical countermeasure for SM injuries⁴⁹.

Anti-connexins 43

Connexins is a family of ubiquitous proteins⁵², especially expressed in skin. As gap junction (GJ) proteins, they allow intercellular exchanges of metabolites, second messengers and mediators (of inflammation for example). Regulation of their expression is needed to respond to physiological and pathological stimuli⁵³. Connexin 43 (Cx43) is the main connexin found in proliferating cells of epidermis basal layer⁵⁴. After skin lesion, the Cx43 decrease at the beginning of healing, especially promotes a decrease in the inflammatory response, an increase in angiogenesis, fibroblast migration and reepithelialisation⁵⁵. Several molecules such as ACT1 peptide corresponding to the C-terminal part of Cx43 or siRNA or Cx43 antisense oligonucleotides have been identified to improve wound healing, especially in the diabetic ulcer⁵⁶⁻⁵⁹. Clinical trials testing ACT1 are ongoing⁵⁶. A relevant study has demonstrated the interest of these molecules in skin healing after exposure to a blistering agent (nitrogen mustard) on mice, by limiting inflammation and facilitating healing⁶⁰. Further works must be carried out to verify the effectiveness of these Cx43 modulators on SM induced skin lesions.

Antagomirs and mimics

Micro-RNAs or miRNAs are intracellular short RNA molecules regulating mRNAs by base-pairing, thus conducting to silencing mRNAs. During SM dermal exposure, miRNAs dysregulation has been reported⁶¹. Antagomirs, synthetic inhibitors of miRNA, have been studied to improve skin healing. Indeed, some miRNAs, as miRNA-203 and -210, play a role in re-epithelialization of lesions by acting on proliferation and migration of keratinocytes⁶²⁻⁶⁴. An *in vitro* study demonstrated that these miRNAs are overexpressed after SM exposure, only in hypoxia for miR-210 and both normoxia and hypoxia for miR-203. A consequence of these miRNAs overexpression is a dysregulation of cell growth and differentiation⁶⁵. SM-induced skin lesions are characterized by hypoxic areas. Thus, targeting these miRNAs with antagomirs would improve re-epithelialization⁶⁵. This hypothesis was confirmed *in vivo* by the injection of 16 µg of miR-210 antagomir prior to SM exposure. It has been shown, in SKH-1 hairless mice, a downregulation of SM-induced miR-210 expression that promotes skin healing⁶⁶.

Another therapeutic strategy would be the use of synthetic

miRNAs (also called agomirs or mimics), especially miR-21 and 20a. Indeed, it has been observed in SM casualties, a down-regulation of miR-21 and miR-20a, in skin SM-exposed tissues⁶⁷.

Thus, antagomirs and agomirs represent promising approaches for the treatment of SM-induced skin lesions.

Mesenchymal stem cell transplant

Stem cells therapy is one of the vanguard strategy of regenerative medicine⁶⁸. Mesenchymal stem cells (MSCs) are being investigated as a therapeutic tool for both chronic diabetic ulcers and severe thermal burns⁶⁹. In addition, it has been shown *in vitro* that MSCs extracted from human femoral heads are highly resistant to high concentrations of SM (up to 40µm), without alteration of their ability to differentiate⁷⁰. However, they lose their ability to migrate (from 1µm of SM)⁷¹. This lead to consider stimulation of MSCs SM-altered migration by cytokines as a new therapeutic option⁷¹. Therewith, in a context of SM-induced chronic pulmonary injury with systemic injections of MSC, the evolution of lesions was favorable⁷². Thus, MSCs seem to be an encouraging approach for the treatment of SM-induced skin lesions.

TREATMENTS OF SKIN SEQUELAE

In addition to the early symptoms, SM also induces sequelae which may persist decades after exposure²⁰. Most common skin sequelae induced by SM exposure are pruritus, burning sensation⁷³⁻⁷⁵ and pigmentation disorders⁷⁶. An increase of skin cancer has also been observed in SM-exposed veterans⁷⁷. Some therapeutic approaches aimed to treat SM-induced skin sequelae are presented below.

Treatments of pruritus and atopic dermatitis

Aloe vera

Classic treatments for pruritus and atopic dermatitis are topical corticosteroids as well as antihistaminic drugs⁷⁸. However, these molecules have side effects that lead researchers to consider molecules with better tolerance, especially in long-term therapies. A study dealing with pruritus mitigation in SM-exposed Iranian casualties during the Iran-Iraq war (1980-1988) compared a betamethasone ointment and a formulation combining olive oil and Aloe vera. Aloe vera is a traditional medicine plant used for many centuries because of its anti-inflammatory and antioxidant effects⁷⁹. This formulation combining Aloe vera and olive oil significantly reduced pruritus and burning sensation in Iranian veterans. This formulation appeared to be at least as effective as betamethasone, without common side effects observed with corticosteroids⁸⁰.

Curcumin

A clinical trial was conducted on Iranian veterans suffering from pruritus following SM exposure during Iran-Iraq war. This clinical trial compared the efficacy of curcumin vs placebo, administered per os for 4 weeks.

Table II: Treatments of the acute phase of SM skin exposure.

GROUP	MOLECULES	REFERENCE
Anti-inflammatory and antioxidants	NDH4338	Chang <i>et al</i> , 2014 ⁴² Joseph <i>et al</i> , 2018 ⁴⁴
	Flavonoïdes	Li <i>et al</i> , 2015 ⁴⁵
	Cafeic acid	Kim <i>et al</i> , 2016 ⁴⁶
	Vitamin E	Pohanka 2012 ⁴⁷
	Silibinin	Tewari-Singh <i>et al</i> , 2012 ⁴⁸ Tewari-Singh <i>et al</i> , 2016 ⁴⁹ Balszuweit <i>et al</i> , 2013 ⁵⁰ Jain <i>et al</i> , 2015 ⁵¹
Anti-connexin 43	ACT1	Montgomery <i>et al</i> , 2018 ⁵⁶ Ongstad <i>et al</i> , 2011 ⁵⁷ Rhett <i>et al</i> , 2008 ⁵³
	antisens Cx43 RNA	Wang 2014 ⁶⁰ Rhett <i>et al</i> , 2008 ⁵³ Coutinho <i>et al</i> , 2015 ⁵⁹
	siRNA	Montgomery <i>et al</i> , 2018 ⁵⁶
Antagomir	miR-203	Deppe <i>et al</i> , 2016 ⁶⁵
	miR-210	Deppe <i>et al</i> , 2016 ⁶⁵ Ye <i>et al</i> , 2019 ⁶⁶
Agomir	miR-21	Valizadeh <i>et al</i> , 2015 ⁶⁷
	miR-20a	Valizadeh <i>et al</i> , 2015 ⁶⁷
MSC		Schmidt <i>et al</i> , 2013 ⁷⁰ Schreier <i>et al</i> , 2018 ⁷¹ Nejad-Moghaddam <i>et al</i> , 2017 ⁷²

Patients treated with curcumin have improved their quality of life (from 35.63 ± 3.85 to 24.78 ± 5.22 , $P < 0.001$) as well as their pruritus score (from 40.60 ± 4.43 to 28.23 ± 4.95 , $P < 0.001$)⁸¹. In addition, curcumin have been found to contribute to the prevention and treatment of various cancers and premalignant lesions⁸². Nowadays, *in vitro* and *in vivo* studies have evidenced the antitumoral properties of curcumin for the treatment of melanomas^{83, 84}. However, curcumin antitumoral properties remain to be confirmed in SM-induced skin cancers.

Interferon- γ

A clinical trial has been conducted on SM-exposed Iranian veterans suffering from severe chronic atopic dermatitis about 20 years after SM exposure⁸⁵. These veterans were treated with a subcutaneous injection of interferon- ($\text{IFN-}\gamma$) three times a week in comparison with a topical application of betamethasone-based cream every night for 30 days. All scores for atopic dermatitis index (SCORAD) were lowered in $\text{IFN-}\gamma$ -treated group. In addition, a greater quality of life was observed by the Dermatology Life Quality Index (DLQI). Side effect incidence in the different groups was similar although routes of exposure were different. Furthermore, the biochemical measures did not reveal side effects.

Cancer treatment (gene and epigenetic therapy)

Surgical resection of the tumor represents the first

therapeutic approach for melanoma. Chemotherapy, targeted therapy or immunotherapy can complete this strategy. Alternative treatment such gene therapy, appears to be a relevant option to enhance the effectiveness of currently available melanoma treatments and thus extending patient survival time⁸⁶.

Epigenetic therapy seems to be another relevant option. Indeed, SM exposure has been reported to cause epigenetic changes, such as DNA methylation increase. These alterations could explain the cancers observed years after SM exposure⁸⁷. An increase in the number of cancers, especially in skin, has been observed among SM-exposed Iranian veterans (1.1% of non-melanoma skin cancer in Iranian exposed to SM vs 0.01% in non-exposed Iranians)⁷⁷. However, there are accumulating evidence of the link between miRNAs and regulation of their expression, correlated with skin cancer occurrence⁸⁸. Therefore, it would be interesting to correlate these identified miRNAs with those found in patients with sequelae of SM exposure. Furthermore, it has been observed on Iranian veterans suffering from moderate to long-term severe complications, a modification of their miRNA expression profile. These promising biomarkers seem to be valuable therapeutic targets that deserve to be investigated⁸⁹.

To treat cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), vorinostat and romidepsin have been validated as the first epigenetic

treatments approved for clinical use by the FDA⁹⁰. Likewise, in order to improve melanomas treatment, numerous clinical trials are in progress. One strategy is based on the use of epigenetic therapies alone or in combination (decitabine and peg interferon, valproic acid and karenitecin, entinostat)⁹¹. These different approaches seem to be interesting to treat SM-induced skin cancers.

Another promising strategy would be melatonin. Indeed, melatonin could be used both as a SM scavenger in order to prevent protein and DNA alkylations, and to fight oxidative stress, and also to decrease long-term epigenetic effects³⁵. However, this last review

based on *in vitro* results must be consolidated by *in vivo* studies.

Treatment of dyspigmentation

Dyspigmentation (hyper or hypopigmentation) is a common sequela of SM-induced lesions⁷⁶ that impacts the quality of life of the patients⁹². Hyperpigmentation could be treated with laser resurfacing or pharmacologically, in combination with sunscreens, with molecules such as hydroquinone, azelaic acid, kojic acid, licorice extracts, ascorbic acid, niacinamid, N-acetylglucosamine (NAG) or retinoids^{73,92}. As compared to hyperpigmentation, hypopigmentation is more challenging

Table III: Treatments of sequelae of SM skin exposure.

GROUP	MOLECULES	REFERENCES
Treatments of pruritus and atopic dermatitis	Corticosteroids	Shohrati <i>et al</i> , 2007 ⁷⁸
	Antihistamines	Shohrati <i>et al</i> , 2007 ⁷⁸
	Aloe vera	Visuthikosol <i>et al</i> , 1995 ⁷⁹
	Aloe vera + olive oil	Panahi <i>et al</i> , 2012 ⁸⁰
	Curcumin	Panahi <i>et al</i> , 2012 ⁸¹
Interferon- γ	Interferon- γ	Panahi <i>et al</i> , 2012 ⁸⁵
Cancer treatment	Gene therapy	Menezes <i>et al</i> , 2018 ⁸⁶
	Curcumin	Kunnumakkara <i>et al</i> , 2019 ⁸² Anand <i>et al</i> , 2008 ⁸³ Vollono <i>et al</i> , 2019 ⁸⁴
	miRNA	Gharbi <i>et al</i> , 2018 ⁸⁹
	Corinostat	Rahmani <i>et al</i> , 2017 ⁹⁰
	Comidepsin	Rahmani <i>et al</i> , 2017 ⁹⁰
	Decitabine + Peg interferon	Rollins <i>et al</i> , 2016 ⁹¹
	Decitabine	Rollins <i>et al</i> , 2016 ⁹¹
	Valproic acid + karenitecin	Rollins <i>et al</i> , 2016 ⁹¹
	Entinostat + pembrolizumab	Rollins <i>et al</i> , 2016 ⁹¹
Hyperpigmentation	Laser resurfacing	Graham <i>et al</i> , 2009 ⁷³
	Hydroquinone	Graham <i>et al</i> , 2009 ⁷³ Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Azelaic acid	Graham <i>et al</i> , 2009 ⁷³ Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Kojic acid	Graham <i>et al</i> , 2009 ⁷³ Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Licorice extracts	Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Ascorbic acid	Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Niacinamids	Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	niacinamids + NAG	Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	NAG	Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Retinoids	Davis <i>et al</i> , 2010 ⁹²
	Hypopigmentation	ReCell [®]
IB-MECA		Madi <i>et al</i> , 2012 ⁹⁴
tacrolimus		Carney <i>et al</i> , 2018 ⁹⁵
		Travis <i>et al</i> , 2003 ⁹⁶

VOL.
95/1

VOL.
95/1

since less treatments are available. A possible approach to treat hypopigmentation is based on the use of Recell® device, which rapidly provides, via a spray, living allogenic skin cells, including functional melanocytes. This device is quick to set up, indeed only 30 minutes are required between donor cell collection and cell delivery⁹³. Another option is the use of small molecules that stimulate the melanogenesis, such as IB-MECA which increases the level of melanin in human skin explants⁹⁴. In addition, clinical studies report the efficacy of tacrolimus, an immunosuppressant drug, on patients suffering of vitiligo. A complete repigmentation was observed after 2 or 4 months of twice-daily topical treatment with 0.1% tacrolimus ointment^{95, 96}. These different strategies seem promising but should be tested on hypopigmentation sequelae following SM-exposure.

CONCLUSION

Chemical weapon of the last century and terrorist threat agent of the present, SM is still challenging for health services. Indeed, SM has strong contaminating power, insidious and painless penetration (delaying diagnosis and medical management), diversity of effects, disabling, slow wound healing, delayed sequelae. Presently, there is still neither antidote nor specific treatment. Therefore, the first step of medical management is the decontamination, which is critical and must be performed as soon as possible. Then victims must be considered as immunocompromised burn patients.

Numerous studies on pathophysiology, biochemistry, pharmacology and therapeutic approaches have been performed since SM first use in 1917. Due to its complex and poorly understood mechanism of action, many pathways such as oxidative stress and inflammation have been explored. In the context of SM-induced skin lesions, different therapeutic strategies emerge, as regards the delay between SM exposure and treatment: pre and early treatments, acute phase and then sequelae treatments.

Nowadays, no therapeutic consensus exists. However, some therapeutic approaches seem to emerge according to the treatment delay: melatonin as pre-treatment; antagomir and agomir for the acute phase and Recell® device for dyspigmentation sequelae.

ABSTRACT

Sulfur mustard (SM) still represents a chemical threat. Management of SM-induced lesions still represents a challenge, particularly on skin, both for the treatment of lesions in acute phase following exposure, and also for delayed effects and sequelae.

Current therapeutic strategy includes symptomatic and supportive cares, pain management and prevention of infectious complications. Several therapeutic trends aiming to prevent the apparition of skin lesions or to accelerate wound healing and to treat cutaneous

sequelae are emerging. Among the most promising treatments, melatonin could be administrated before SM exposure in order to act as a scavenger. Moreover, antagomir or agomir are promising to promote wound healing and to fight cancer. In addition, Recell® device has good results to treat hypopigmentation which is a common skin sequelae.

The treatments presented in this review would prevent SM-induced skin lesions, enhance wound healing or reduce sequelae, thus improving the quality of life of victims.

Declaration of interest:

None

List of abbreviations

CEES: 2-ChloroEthyl-Ethyl Sulfide.
COX2: CycloOxygenase 2.
CTCL: Cutaneous T-Cell Lymphoma.
CWC: Chemical Weapons Convention.
Cx43: Connexin 43.
DLQI: Dermatology Life Quality Index.
ECM: extracellular matrix.
FAAH: Fatty Acid Amide Hydrolase.
GJ: Gap Junction Proteins.
IFN-γ: Interferon-γ.
MMPs: Matrix Metallo Proteases.
MSCs: Mesenchymal Stem Cells.
NAC: N-AcetylCysteine.
NAG: N-AcetylGlucosamine.
NIH: American National Institute of Health.
PARP: Poly ADP-Ribose Polymerase.
PHD-2: Selective Proline Hydroxylase-2.
PPAR-α: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha.
ROS: Reactive Oxygen Species.
RSDL: Reactive Skin Decontamination Lotion.
SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis.
SM: Sulfur Mustard.

The author recognizes that the proposed document has not been sent simultaneously to other journals or has not been recently published under the same title.

REFERENCES

1. OPCW. Evolution of the Status of Participation in the Convention <https://www.opcw.org/evolution-status-participation-convention2018> [
2. JOHN H, KOLLER M, WOREK F, THIERMANN 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 (7): 1881-91.
3. SEZIGEN S, IVELIK K, ORTATATLI M, ALMACIOGLU M, DEMIRKASIMOGLU M, EYISON RK, et al. Victims of chemical terrorism, a family of four who were exposed to sulfur mustard. *Toxicology letters.* 2019; 303: 9-15.
4. BOLIS A, GUIBERT N, CHAPUIS N. Le risque d'attaques chimiques, « réel mais très faible ». *Le monde.* Publié le 19 novembre 2015 à 21h18 - Mis à jour le 20 novembre 2015 à 11h35.

5. DORANDEU F, PETIT M-P, NESPOULOUS O, VOLOT F, LABADIE P, JALADY A-M, et al. Actualités des réponses médicales aux menaces chimiques. *Médecine et Armées*. 2018; 46 (3): 8.
6. Françaises Mda. SECOIA - Site d'élimination de charge-ments d'objets identifiés anciens: defense.gouv.fr; 2016 [updated 24/03/2016. Available from: <https://www.defense.gouv.fr/dga/equipement/terrestre/sec-oi-a-site-d-elimination-de-charge-ments-d-objets-identifies-anciens>.
7. BATAL M, BOUDRY I, MOURET S, CLERY-BARRAUD C, WARTELE J, BERARD I, et al. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014; 278 (1): 39-44.
8. POWELL KL, BOULWARE S, THAMES H, VASQUEZ KM, MacLEOD MC. 2,6-Dithiopurine blocks toxicity and mutagenesis in human skin cells exposed to sulfur mustard analogues, 2-chloroethyl ethyl sulfide and 2-chloroethyl methyl sulfide. *Chemical research in toxicology*. 2010; 23 (3): 497-503.
9. MAHMOOD SADEGHI, BALALI-MOOD B. Chemistry of mustard compounds. In: Balali-Mood M AM, editor. Basic and clinical toxicology of mustard compounds: Springer International Publishing Switzerland; 2015. p. 1-27.
10. R. RAY, B. J. BENTON, D.R. ANDERSON, BYERS SL, PETRALI JP. Intervention of Sulfur Mustard Toxicity by Downregulation of Cell Proliferation and Metabolic Rates. *J Appl Toxicol* 2000; 20: 587-591.
11. POURSALEH Z, GHANEI M, BABAMAHOODI F, IZADI M, HARANDI AA, EMADI SE, et al. Pathogenesis and treatment of skin lesions caused by sulfur mustard. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2012; 31 (3): 241-9.
12. LIAUDET L. Rôle de la poly (ADP-ribose) polymérase dans le choc et l'ischémie-reperfusion. *Rev Med Suisse*. 2002; 2409 (2. 22471).
13. MALEKI M, LAYEGH P. Dermatologic aspects of sulfur mustard exposure. In: Balali-Mood M AM, editor. Basic and clinical toxicology of mustard compounds: Springer International Publishing Switzerland; 2015. p. 213-52.
14. SHAKARJIAN MP, HECK DE, GRAY JP, SINKO PJ, GORDON MK, CASILLAS RP, et al. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2010; 114 (1): 5-19.
15. CAVALLO JD, FUILLA C, DORANDEU F, LAROCHE P, D V. In: Montauban EX, editor. Les risques NRBC-E savoir pour agir 2^{ème} édition 2010. p. 210-11.
16. MÉRAT S, PEREZ JP, RÜTTIMANN M, BORDIER E, LIENHARD A, LENOIR B, et al. Intoxication aiguë par arme chimique vésicante: l'ypérite. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 2003; 22 (2): 108-18.
17. DAVIS KG, ASPERA G. Exposure to liquid sulfur mustard. *Ann Emerg Med*. 2001; 37 (6): 653-6.
18. OTTER J, DAWOOD A, D'ORAZIO J. Sulfur Mustard Exposure from Dredged Artillery Shell in a Commercial Clammer. *Clinical practice and cases in emergency medicine*. 2017; 1 (4): 283-6.
19. KEHE K, THIERMANN H, BALSZUWEIT F, EYER F, STEINRITZ D, ZILKER T. Acute effects of sulfur mustard injury--Munich experiences. *Toxicology*. 2009; 263 (1): 3-8.
20. HEJAZI S, SOROUSH M, MORADI A, KHALILAZAR S, MOUSAVI B, FIROOZ A, et al. Skin manifestations in sulfur mustard exposed victims with ophthalmologic complications: Association between early and late phase. *Toxicol Rep*. 2016; 3: 679-84.
21. QUENTIN B. Mémento d'emploi de l'unité médicale de décontamination des armées. Centre interarmées de concepts de doctrines et d'expérimentations Publication interarmées PIA-3.8.5_SSA N° 507169/DEF/DCSSA/PC/ERS/NP du 31 mars 2014/2014.
22. KEHE K, SZINICZ L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*. 2005; 214 (3): 198-209.
23. ANSM. Fiche Piratox n°6: Ypérite et autres moutardes vésicantes http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6d62ed6e00a5a870546dc5ebf802fba6.pdf. ANSM; 2010, maj. 17 mai 2016 [Available from: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6d62ed6e00a5a870546dc5ebf802fba6.pdf].
24. KEHE K, BALSZUWEIT F, EMMER J, KREPPPEL H, JOCHUM M, H T. Sulfur Mustard Research—Strategies for the Development of Improved Medical Therapy. *Eplasty*. 2008; 8 (32): 21.
25. RIES C, POPP T, EGEE V, KEHE K, JOCHUM M. Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: Upregulation in response to sulphur mustard. *Toxicology*. 2009; 263 (1): 26-31.
26. XIANNU J, RADHARAMAY R, PRABHATI R. Sulfur mustard-stimulated proteases and their inhibitors in a cultured normal human epidermal keratinocytes model: A potential approach for anti-vesicant drug development. *Toxicol Rep*. 2016; 3: 393-400.
27. B. LIESENFELD, M. MOL, SCHULTZ G. 2008 World Union of Wound Healing Societies: Protease Inhibitors Prevent Microvesication in Sulfur Mustard Wounds in Human Skin Explants. In: Technologies Q-M, editor. MultiStat® - Technology Platform 2008.
28. WOHLMAN IM, COMPOSTO GM, HECK DE, HEINDEL ND, LACEY CJ, GUILLON CD, et al. Mustard vesicants alter expression of the endocannabinoid system in mouse skin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2016; 303: 30-44.
29. SASSO O, PONTIS S, ARMIROTTI A, CARDINALI G, KOVACS D, MIGLIORE M, et al. Endogenous N-acyl taurines regulate skin wound healing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016; 113 (30): E4397-406.
30. STENGER B, POPP T, JOHN H, SIEGERT M, TSOUTSOULOPOULOS A, SCHMIDT A, et al. N-Acetyl-L-cysteine inhibits sulfur mustard-induced and TRPA1-dependent calcium influx. *Arch Toxicol*. 2017; 91 (5): 2179-89.
31. ACHANTA S, CHINTAGARI NR, BRACKMANN M, BALAKRISHNA S, JORDT SE. TRPA1 and CGRP antagonists counteract vesicant-induced skin injury and inflammation. *Toxicology letters*. 2018; 293: 140-8.

32. SABERI M, MAHMODABADY AZ. The Protective Effects of N-Acetyl-Cysteine, Oxo-ThiazolidineCarboxylate, Acetaminophen and Their Combinations against Sulfur Mustard Cytotoxicity on Human Skin Fibroblast Cell Line (HF2FF). *Iranian Biomedical Journal*. 2009; 14 (3): 215-21.
33. KADAR T, FISHBEINE E, MESHULAM Y, SAHAR R, CHAPMAN S, LIANI H, et al. Treatment of skin injuries induced by sulfur mustard with calmodulin antagonists, using the pig model. 2000; 20 (Suppl 1: 5).
34. KORKMAZ A, KUNAK ZI, PAREDES SD, YAREN H, TAN D-X, REITER RJ. The use of melatonin to combat mustard toxicity. *Neuroendocrinology Letters*. 2008; 28 (5): 614-9.
35. ROMERO A, GIL MARTÍN E, DE LOS RIOS C, EGEA J, RAMOS E, LÓPEZ-MUÑOZ F, et al. Impact of melatonin effects on toxicology of vesicant chemical warfare agents: When science meets reality. *Melatonin Research*. 2020; 3 (1): 101-19.
36. PITA R, MARCO-CONTELLES J, RAMOS E, DEL PINO J, ROMERO A. Toxicity induced by chemical warfare agents: insights on the protective role of melatonin. *Chemico-biological interactions*. 2013; 206 (2): 134-42.
37. PITA R, MARCO-CONTELLES J, RAMOS E, PINO JD, ROMERO A. Melatonin as potential candidate to prevent the toxicity induced by chemical warfare agents. *Arch Toxicol*. 2014; 88 (1): 3-4.
38. SHAHRIARY A, ASADI R, GHEISARI HR, MOUSAVI S. Effect of melatonin treatment on serum levels of mineral elements, total oxidant and antioxidant capacity in mustard exposed patients. *Iranian J Pharmacol Ther*. 2018; 16: 1-6.
39. POHANKA M, SOBOTKA J, JILKOVA M, STETINA R. Oxidative stress after sulfur mustard intoxication and its reduction by melatonin: efficacy of antioxidant therapy during serious intoxication. *Drug Chem Toxicol*. 2011; 34 (1): 85-91.
40. GHANEI M, POURSALEH Z, HARANDI AA, EMADI SE, EMADI SN. Acute and chronic effects of sulfur mustard on the skin: a comprehensive review. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2010; 29 (4): 269-77.
41. FIROOZ A, SADR B, DAVOUDI SM, NASSIRI-KASHANI M, PANAHY Y, DOWLATI Y. Long-term skin damage due to chemical weapon exposure. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2011; 30 (1): 64-8.
42. CHANG YC, WANG JD, HAHN RA, GORDON MK, JOSEPH LB, HECK DE, et al. Therapeutic potential of a non-steroidal bifunctional anti-inflammatory and anti-cholinergic agent against skin injury induced by sulfur mustard. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014; 280 (2): 236-44.
43. ROSAS-BALLINA M, TRACEY KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009; 265 (6): 663-79.
44. JOSEPH LB, COMPOSTO GM, PEREZ RM, KIM HD, CASILLAS RP, HEINDEL ND, et al. Sulfur mustard induced mast cell degranulation in mouse skin is inhibited by a novel anti-inflammatory and anticholinergic bifunctional prodrug. *Toxicology letters*. 2018; 293: 77-81.
45. LI J, CHEN L, WU H, LU Y, HU Z, LU B, et al. The Mixture of Salvianolic Acids from *Salvia miltiorrhiza* and Total Flavonoids from *Anemarrhena asphodeloides* Attenuate Sulfur Mustard-Induced Injury. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16 (10): 24555-73.
46. KIM S, JEONG KJ, CHO SK, PARK JW, WJ P. Caffeic acid, morin hydrate and quercetin partially attenuate sulfur mustard-induced cell death by inhibiting the lipoxygenase pathway. *Mol Med Rep*. 2016; 14 (5).
47. POHANKA M. Antioxidants countermeasures against sulfur mustard. *Mini Rev Med Chem*. 2012; 12 (8): 742-8.
48. TEWARI-SINGH N, JAIN AK, INTURI S, AGARWAL C, WHITE CW, AGARWAL R. Silibinin attenuates sulfur mustard analog-induced skin injury by targeting multiple pathways connecting oxidative stress and inflammation. *PLoS one*. 2012; 7 (9): e46149.
49. TEWARI-SINGH N, AGARWAL R. Mustard vesicating agent-induced toxicity in the skin tissue and silibinin as a potential countermeasure. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016; 1374 (1): 184-92.
50. BALSZUWEIT F, JOHN H, SCHMIDT A, KEHE K, THIERMANN H, STEINRITZ D. Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries. *Chemico-biological interactions*. 2013; 206 (3): 496-504.
51. JAIN AK, TEWARI-SINGH N, INTURI S, KUMAR D, ORLICKY DJ, AGARWAL C, et al. Flavanone silibinin treatment attenuates nitrogen mustard-induced toxic effects in mouse skin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015; 285 (1): 71-8.
52. MEDA P. Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *Médecine/sciences* 1996 12 (8-9): 12.
53. RHETT JM, JOURDAN J, GOURDIE RG. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Molecular biology of the cell*. 2011; 22 (9): 1516-28.
54. CHURKO JM, LAIRD DW. Gap junction remodeling in skin repair following wounding and disease. *Physiology*. 2013; 28 (3): 190-8.
55. WONG P, TAN T, CHAN C, LAXTON V, CHAN YW, LIU T, et al. The Role of Connexins in Wound Healing and Repair: Novel Therapeutic Approaches. *Frontiers in physiology*. 2016; 7: 596.
56. MONTGOMERY J, GHATNEKAR GS, GREK CL, MOYER KE, GOURDIE RG. Connexin 43-Based Therapeutics for Dermal Wound Healing. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19 (6).
57. ONGSTAD EL, O'QUINN MP, GHATNEKAR GS, YOST MJ, GOURDIE RG. A Connexin 43 Mimetic Peptide Promotes Regenerative Healing and Improves Mechanical Properties in Skin and Heart. *Advances in wound care*. 2013; 2 (2): 55-62.
58. RHETT JM, GHATNEKAR GS, PALATINUS JA, O'QUINN M, YOST MJ, GOURDIE RG. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends in biotechnology*. 2008; 26 (4): 173-80.
59. COUTINHO P, QIU C, FRANK S, WANG CM, BROWN T, GREEN CR, et al. Limiting burn extension by transient inhi-

- bition of Connexin 43 expression at the site of injury. *British journal of plastic surgery*. 2005; 58 (5): 658-67.
60. WANG J. Actions of the sulfur mustard analogue, nitrogen mustard, on mouse skin and post exposure treatment with connexin 43 antisense oligodeoxynucleotides. New Brunswick, New Jersey: Graduate School-New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey and The Graduate School of Biomedical Sciences, University of Medicine and Dentistry of New Jersey; 2014.
 61. SCHMIDT A, STEINRITZ D, THIERMANN H, MEINEKE V, ABEND M. Alteration of miRNA expression in early endothelial cells after exposure with sub-lethal sulfur mustard concentrations. *Toxicology letters*. 2016; 244: 88-94.
 62. VITICCHIE G, LENA AM, CIANFARANI F, ODORISIO T, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, et al. MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death Dis*. 2012; 3: e435.
 63. WEI T, ORFANIDIS K, XU N, JANSON P, STAHL M, PIVARCSI A, et al. The expression of microRNA-203 during human skin morphogenesis. *Exp Dermatol*. 2010; 19 (9): 854-6.
 64. FAHS F, BI X, YU FS, ZHOU L, MI QS. New insights into microRNAs in skin wound healing. *IUBMB Life*. 2015; 67 (12): 889-96.
 65. DEPPE J, STEINRITZ D, SANTOVITO D, EGEE V, SCHMIDT A, WEBER C, et al. Upregulation of miR-203 and miR-210 affect growth and differentiation of keratinocytes after exposure to sulfur mustard in normoxia and hypoxia. *Toxicology letters*. 2016; 244: 81-7.
 66. YE F, CHEN M, WANG J, ZHAO Y, CHENG J, ZHAO J, et al. Downregulation of miR-210 promotes sulfur mustard-induced skin wound healing. *Int J Clin Exp Med*. 2019; 12 (5): 5279-87.
 67. VALIZADEH M, MIRZAEI B, TAVALLAEI M, NOORANI MR, AMIRI M, SOROUGH MR, et al. Down-regulation of TGF- β 1, TGF- β receptor 2, and TGF- β -associated microRNAs, miR-20a and miR-21, in skin lesions of sulfur mustard-exposed Iranian war veterans. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015; 35 (6): 634-9.
 68. FRANCIS E, KEARNEY L, CLOVER J. *Int J Burn Trauma*. 9. 2019; 1: 1-12.
 69. MARANDA EL, RODRIGUEZ-MENOCAL L, BADIAVAS EV. Role of Mesenchymal Stem Cells in Dermal Repair in Burns and Diabetic Wounds. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017; 12 (1): 61-70.
 70. SCHMIDT A, SCHERER M, THIERMANN H, STEINRITZ D. Mesenchymal stem cells are highly resistant to sulfur mustard. *Chemico-biological interactions*. 2013; 206 (3): 505-11.
 71. SCHREIER C, ROTHMILLER S, SCHERER MA, RUMMEL C, STEINRITZ D, THIERMANN H, et al. Mobilization of human mesenchymal stem cells through different cytokines and growth factors after their immobilization by sulfur mustard. *Toxicology letters*. 2018; 293: 105-11.
 72. NEJAD-MOGHADDAM A, AJDARI S, TAHMASBPOUR E, GOODARZI H, PANAHY Y, GHANEI M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Airway Injuries in A Patient after Long-Term Exposure to Sulfur Mustard. *Cell journal*. 2017; 19 (1): 117-26.
 73. GRAHAM JS, STEVENSON RS, MITCHELTREE LW, HAMILTON TA, DECKERT RR, LEE RB, et al. Medical management of cutaneous sulfur mustard injuries. *Toxicology*. 2009; 263 (1): 47-58.
 74. PANAHY Y, DAVOUDI SM, SADR SB, NAGHIZADEH MM, MOHAMMADI-MOFRAD M. Impact of pruritus on quality of life in sulfur mustard-exposed Iranian veterans. *Int J Dermatol*. 2008; 47 (6): 557-61.
 75. SHOHRATI M, PEYMAN M, PEYMAN A, DAVOUDI M, GHANEI M. Cutaneous and ocular late complications of sulfur mustard in Iranian veterans. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2007; 26 (2): 73-81.
 76. MOMENI A-Z, ENSHAEIH S, MEGHDADI M, AMINDJAVAHERI M. Skin Manifestations of Mustard Gas: A Clinical Study of 535 Patients Exposed to Mustard Gas. *Arch Dermatol*. 1992; 128 (6): 775-80.
 77. EMADI SN, MORTAZAVI M, MORTAZAVI H. Late cutaneous manifestations 14 to 20 years after wartime exposure to sulfur mustard gas: a long-term investigation. *Arch Dermatol*. 2008; 144 (8): 1059-61.
 78. SHOHRATI M, DAVOUDI M, ALMASI M, SADR B, PEYMAN M. Comparative study of Unna's Boot and betamethasone cream in the treatment of sulfur mustard-related pruritus. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2007; 26 (4): 303-9.
 79. VISUTHIKOSOL V, CHOWCHUEN B, SUKWANARAT Y, SRIURAIRATANA S, BOONPUCKNAVIG V. Effect of aloe vera gel to healing of burn wound a clinical and histological study. *J Med Assoc Thai*. 1995; 78 (8): 403-9.
 80. PANAHY Y, DAVOUDI SM, SAHEBKAR A, BEIRAGHDAR F, DADJO Y, FEIZI I, et al. Efficacy of Aloe vera/olive oil cream versus betamethasone cream for chronic skin lesions following sulfur mustard exposure: a randomized double-blind clinical trial. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2012; 31 (2): 95-103.
 81. PANAHY Y, SAHEBKAR A, PARVIN S, SAADAT A. A randomized controlled trial on the anti-inflammatory effects of curcumin in patients with chronic sulphur mustard-induced cutaneous complications. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49 (Pt 6): 580-8.
 82. KUNNUMAKKARA AB, HARSHA C, BANIK K, VIKKURTHI R, SAILO BL, BORDOLOI D, et al. Is curcumin bioavailability a problem in humans: lessons from clinical trials. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019; 15 (9): 705-33.
 83. ANAND P, SUNDARAM C, JHURANI S, KUNNUMAKKARA AB, AGGARWAL BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett*. 2008; 267 (1): 133-64.
 84. VOLLONO L, FALCONI M, GAZIANO R, IACOVELLI F, DIKA E, TERRACCIANO C, et al. Potential of Curcumin in Skin Disorders. *Nutrients*. 2019; 11 (9).
 85. PANAHY Y, SAHEBKAR A, DAVOUDI SM, AMIRI M, BEIRAGHDAR F. Efficacy and safety of immunotherapy with interferon-gamma in the management of chronic sulfur mustard-induced cutaneous complications: comparison with topical betamethasone 1%. *Scientific World Journal*. 2012; 2012: 285274.

86. MENEZES ME, TALUKDAR S, WECHMAN SL, DAS SK, EMDAD L, SARKAR D, et al. Prospects of Gene Therapy to Treat Melanoma. *Adv Cancer Res.* 2018; 138: 213-37.
87. STEINRITZ D, SCHMIDT A, BALSZUWEIT F, THIERMANN H, SIMONS T, STRIEPLING E, et al. Epigenetic modulations in early endothelial cells and DNA hypermethylation in human skin after sulfur mustard exposure. *Toxicology letters.* 2016; 244: 95-102.
88. SINGHVI G, MANCHANDA P, KRISHNA RAPALLI V, KUMAR DUBEY S, GUPTA G, DUA K. MicroRNAs as biological regulators in skin disorders. *Biomed Pharmacother.* 2018; 108: 996-1004.
89. GHARBI S, KHATERI S, SOROUSH MR, SHAMSARA M, NAELI P, NAJAFI A, et al. MicroRNA expression in serum samples of sulfur mustard veterans as a diagnostic gateway to improve care. *PLoS one.* 2018; 13 (3): e0194530.
90. RAHMANI S, ABDOLLAHI M. Novel treatment opportunities for sulfur mustard-related cancers: genetic and epigenetic perspectives. *Arch Toxicol.* 2017; 91 (12): 3717-35.
91. ROLLINS RA, KIM KH, TSAO C-C. The Emerging Epigenetic Landscape in Melanoma. *Human Skin Cancer, Potential Biomarkers and Therapeutic Targets.* 2016 (Chapter 2): 9-38.
92. DAVIS EC, CALLENDER VD. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010; 3 (7): 20-31.
93. GRAHAM JS, CHILCOTT RP, RICE P, MILNER SM, HURST CG, MALINER BI. Wound healing of cutaneous sulfur mustard injuries: strategies for the development of improved therapies. *J Burns Wounds.* 2005 4: 1-45.
94. MADI L, ROSENBERG-HAGGEN B, NYSKA A, KORENSTEIN R. Enhancing pigmentation via activation of A3 adenosine receptors in B16 melanoma cells and in human skin explants. *Exp Dermatol.* 2013; 22 (1): 74-7.
95. CARNEY BC, MCKESEY JP, ROSENTHAL DS, SHUPP JW. Treatment Strategies for Hypopigmentation in the Context of Burn Hypertrophic Scars. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2018; 6 (1): e1642.
96. TRAVIS LB, WEINBERG JM, SILVERBERG NB. Successful treatment of vitiligo with 0.1% tacrolimus ointment. *Arch Dermatol.* 2003; 139 (5): 571-4; discussion 3.

I.3. Les effets cutanés de l'ypérite

I.3.1 La peau : rappels histologiques

La peau représente environ 18 % de la masse corporelle. C'est l'une des principales voies d'exposition de l'ypérite (50). La peau est composée, du plus superficiel au plus profond : de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme. La peau assure, notamment grâce à l'épiderme, une fonction barrière permettant une protection et le maintien d'une hydratation cutanée.

L'épiderme est un épithélium stratifié pavimenteux divisé en stratum : corneum, lucidum, granulosum, spinosum, et basale (Figure 10) (77). A noter que le stratum lucidum n'est présent que dans les épidermes épais (78). L'épiderme est composé en grande majorité de kératinocytes (80 à 95 % (77, 79)) mais possède également des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel. Il ne possède pas de vaisseaux sanguins ou lymphatiques mais contient des terminaisons nerveuses (78). Il est en constant renouvellement.

Les kératinocytes, issus du stratum basale, vont migrer progressivement jusqu'au stratum corneum. Cette migration dure en moyenne 3 semaines chez l'Homme (79). Au cours de cette migration, les kératinocytes perdent leur fonction de prolifération pour se différencier en cornéocytes dépourvus de noyau et aplatis (79). Les kératinocytes sont accrochés à la membrane basale, séparant le derme de l'épiderme, par des hémidesmosomes tandis que les desmosomes relient les kératinocytes entre eux. Les desmosomes du stratum corneum sont appelés corneodesmosomes (79). Les kératinocytes assurent la fonction de barrière et l'architecture de la peau en synthétisant principalement des protéines de kératine. En effet, elles peuvent représenter jusqu'à 80 % des protéines totales des cornéocytes (80). A côté de cette fonction barrière, les kératinocytes ont aussi un rôle dans l'immunité par la production de cytokines telles que les interleukines IL-1, IL-6, ou encore le TNF- α ... (79, 81). L'inflammation est une étape essentielle du processus de cicatrisation détaillé plus loin.

Les mélanocytes sont la deuxième population cellulaire de l'épiderme, à raison de 1 mélanocyte pour 10 kératinocytes dans la couche basale (82). Ils synthétisent la mélanine

donnant la coloration à la peau. On retrouve ces cellules principalement dans le stratum basale et les follicules pileux (78).

Les cellules de Langerhans (3 – 8 %) sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (78, 79) présentes dans le stratum spinosum principalement (83). Les cellules de Merkel (0,5 à 5 %) sont quant à elles des mécanorécepteurs (78, 79). Elles se situent entre les kératinocytes du stratum basale (84).

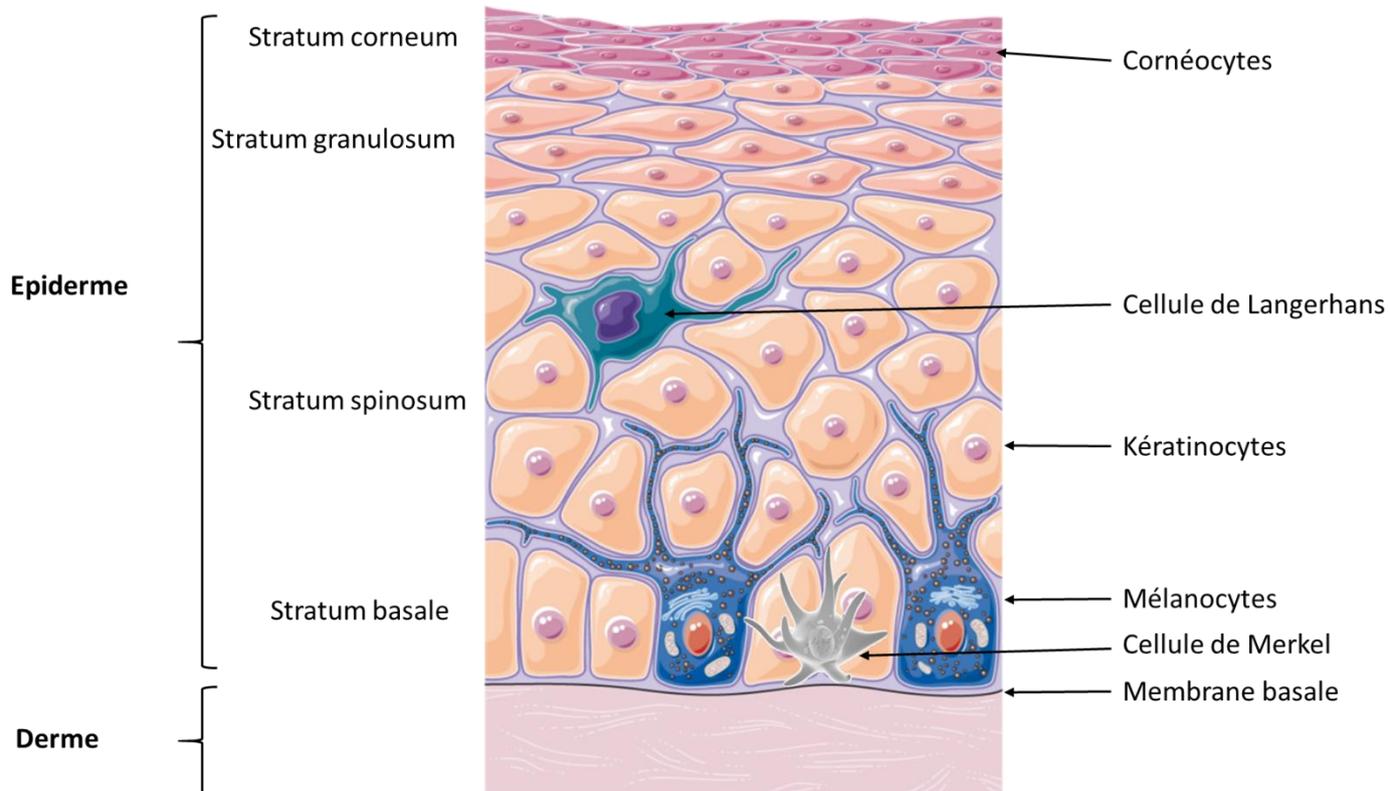


Figure 10 : Schéma d'une peau normale.

Sous la membrane basale, acellulaire, se trouve le derme (78). Le derme est un tissu conjonctif composé principalement de fibroblastes, et également d'histiocytes, de mastocytes et d'adipocytes (85). Ce tissu contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques (77), contrairement à l'épiderme, ainsi que des annexes cutanées telles que les glandes sudoripares dérivant de l'épiderme et plongeant dans le derme (85). Le derme est divisé en derme papillaire, superficiel, hautement vascularisé, et en derme réticulaire, plus dense. La couche réticulaire est la limite entre le derme et l'hypoderme (85). L'atteinte de cette couche réticulaire va induire une cicatrice pouvant nécessiter une greffe (77). Les fibroblastes synthétisent le collagène (de types I et III majoritairement (86)), les fibres d'élastine et de réticuline, ainsi que les composants de la matrice extracellulaire (79, 85). Le derme assure la structure, l'élasticité et la nutrition de la peau (87).

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est composé de cellules graisseuses ayant pour fonction d'amortir des chocs et de protéger contre le froid (79).

I.3.2 Les étapes de la cicatrisation

La cicatrisation normale est classiquement définie en 4 phases (Figure 11) (87) :

- hémostase
- inflammation
- prolifération
- maturation et remodelage

L'hémostase est la première phase de la cicatrisation qui a lieu dès les premières minutes après la lésion. Cette phase correspond à l'activation des plaquettes afin de permettre la coagulation et d'arrêter le saignement ainsi qu'à la sécrétion de nombreuses cytokines et hormones. Celles-ci vont permettre l'afflux de cellules inflammatoires au niveau de la lésion et ainsi débiter la phase suivante de la cicatrisation (77).

La seconde phase de la cicatrisation est l'inflammation. On observe un afflux de neutrophiles puis de monocytes qui se différencient en macrophages activés au niveau de la lésion. Les neutrophiles gagnent la zone lésée dans les 24 h suivant la lésion, tandis que les macrophages arrivent dans les 48 h et y demeurent jusqu'à la fin de cette phase (77). Ces cellules de l'inflammation permettent de lutter contre l'infection et de réaliser une détersion de la plaie à l'aide d'enzymes protéolytiques et d'ERO (88). Elles ont de plus un rôle dans la synthèse de la matrice extracellulaire ainsi que dans l'angiogenèse (89). Cette phase inflammatoire est cruciale et son inhibition peut entraîner un défaut de cicatrisation (77). Une prolongation de cette phase inflammatoire de plus de 3 semaines peut conduire à une plaie chronique (77). Une corrélation a été établie entre les taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) et les plaies ne cicatrisant pas (90).

La libération par les cellules de l'inflammation de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de facteurs de croissance va permettre la prolifération et la migration des fibroblastes, kératinocytes et cellules endothéliales. Cette étape commence généralement dans les 48 h suivant la lésion et peut durer 2 semaines (88). Les cellules souches contenues dans les bulbes des annexes cutanées (follicules pileux, glandes) se différencient en kératinocytes et reconstituent le stratum basale puis migrent jusqu'aux bords de la lésion. De nouveaux kératinocytes vont progresser pour former une nouvelle couche sur la précédente, afin de reconstituer l'épiderme (77). Sous ce nouvel épithélium, un tissu conjonctif transitoire appelé tissu de granulation se forme environ 4 jours après la lésion. Ce tissu, indiquant une cicatrisation optimale, est constitué de fibroblastes, de nouveaux vaisseaux sanguins et d'une forte proportion de collagène de type III (77, 90, 91).

La dernière étape est celle de remodelage et de maturation de la cicatrice qui a lieu 2 à 3 semaines après la lésion et peut durer pendant plus d'un an (88). Un remodelage de la matrice extracellulaire a lieu. Le collagène de type III est dégradé et remplacé par du collagène de type I. La majorité des vaisseaux sanguins, fibroblastes et cellules inflammatoires disparaît, notamment par apoptose (88) et le tissu de granulation involue (77). Un équilibre entre la synthèse et la dégradation permet d'assurer une bonne cicatrisation. En effet, un excès de fibrose entrainerait une cicatrice hypertrophique ou chéloïde (77).

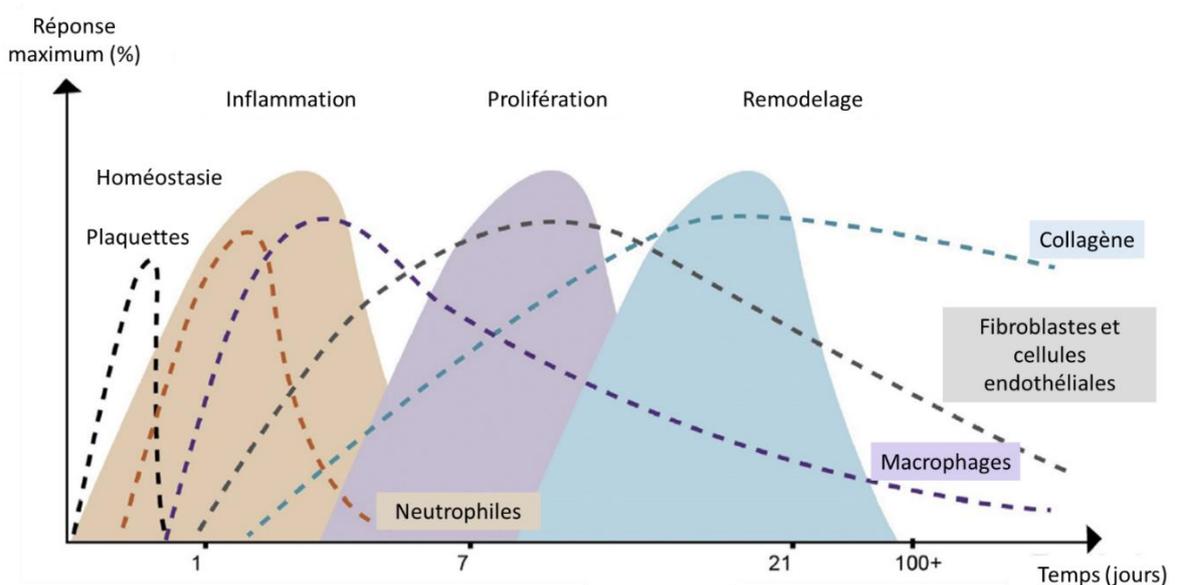


Figure 11 : Phases de la cicatrisation (homéostasie, inflammation, prolifération et remodelage).
D'après Zomer et al, 2018 (87).

On parle de plaie chronique lorsque la lésion ne traverse pas les différentes phases de cicatrisation dans l'ordre, qu'il survient une interruption entre les différentes phase ou que la plaie met plus de 6 semaines à cicatriser (77, 92).

I.3.3 Les différents types de brûlures

Les lésions de type brûlure suivent les 4 phases de cicatrisation énoncées plus haut. Cependant, quelques différences existent entre les lésions de type coupure et les brûlures. La profondeur de la lésion a un fort impact sur le processus de cicatrisation.

En effet, les brûlures sont classées en plusieurs catégories, principalement en fonction de la cause de la brûlure mais également de la sévérité et de la profondeur, afin de définir les soins qui seront à apporter.

En termes de causes de brûlures, on distingue les brûlures :

- chimiques
- thermiques
- électriques
- radiologiques

Plusieurs méthodes permettent d'estimer la surface de la brûlure afin d'en évaluer la sévérité. Pour déterminer rapidement l'étendue de la brûlure, la règle des 9 de Wallace dans laquelle un pourcentage est associé à chaque zone brûlée, peut-être appliquée (93). Le corps est divisé en 9 parties (face, thorax – abdomen antérieur, thorax - abdomen postérieur, jambe gauche et droite, bras gauche et droit, organes génitaux) (Tableau II).

Tableau II : Règle des 9 de Wallace permettant d'évaluer rapidement l'étendue de la brûlure

Zone brûlée	Pourcentage – Etendue de la brûlure
Face	1
Thorax abdomen antérieur	18
Thorax abdomen postérieur	18
Jambe	18
Bras	9
Organes génitaux	1

D'autres classifications existent telle que celle de Lund et Browder qui tient compte de l'âge de la victime (93).

Afin de déterminer un pronostic, la règle de Baux additionne l'âge de la victime et la surface brûlée. Si le résultat est égal ou supérieur à 100, le pronostic vital est engagé (93).

Les brûlures peuvent également être classées selon la profondeur de l'atteinte (Figure 12). Ainsi, on distingue les brûlures dites (

Tableau III) (94) :

- du 1^{er} degré, ou brûlures superficielles : seul l'épiderme est atteint.
- du 2^{ème} degré, ou brûlures d'épaisseur partielle : l'épiderme et le derme sont atteints.
Les annexes cutanées peuvent être intactes (si seul le derme papillaire est atteint) ou alors pour la plupart détruites si le derme réticulaire est atteint.
- du 3^{ème} degré, ou brûlures de pleine épaisseur : l'épiderme, le derme et toutes les annexes sont détruites.
- du 4^{ème} degré, ou brûlures de pleine épaisseur également : toutes la peau est atteinte (épiderme, derme, hypoderme) ainsi que le fascia, le muscle voire l'os.

Tableau III : Tableau résumant les caractéristiques des brûlures selon leur degré.

	Brûlure du 1 ^{er} degré	Brûlure du 2 nd degré	Brûlure du 3 ^{ème} degré	Brûlure du 4 ^{ème} degré
Histologie	Epiderme uniquement	Epiderme + derme +/- annexes	Epiderme + derme + annexes	Epiderme + derme + hypoderme + fascias, muscles +/- os
Apparence clinique	Erythème, sec, rouge ou rose, blanchit en appliquant une pression	Phlyctènes, humide à cireux, couleur variable, blanchit +/- en appliquant une pression selon la profondeur	Blanchâtre à noire, sèche et cartonnée, ne blanchit pas en appliquant une pression	Noire, sèche et terne
Sensation	Douloureuse	Douloureuse (derme superficiel) ou perception uniquement de pression (derme profond)	Insensible (pression profonde uniquement)	Insensible (pression profonde uniquement)
Guérison	3 à 6 jours	7 à 20 jours Ou >21 jours	Pas de guérison spontanée	Pas de guérison spontanée

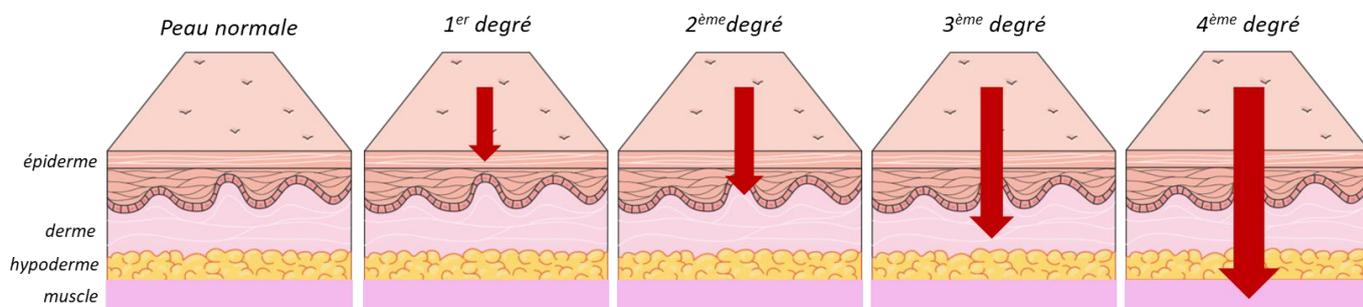


Figure 12 : Classification des brûlures selon leur profondeur.

I.3.4 Caractéristiques des lésions cutanées induites par l'ypérite

L'ypérite pénètre rapidement, en 3 à 5 minutes, à travers la peau (45). Après la pénétration cutanée, l'ypérite va réagir avec les tissus et induire des lésions dont des vésications caractéristiques qui lui ont conféré le nom d'agent vésicant. Les brûlures induites par l'ypérite diffèrent des brûlures thermiques ou chimiques par l'absence de thrombose des vaisseaux et la présence d'un œdème plus intense pouvant se développer sur une dizaine de jours. Une nécrose ainsi qu'une atteinte des vaisseaux sanguins se développe progressivement (95). Selon le site d'exposition, la dose, et selon la forme physique de l'ypérite (liquide ou gazeuse), les conditions environnementales, les symptômes vont apparaître plus ou moins rapidement. On distingue classiquement 5 phases (96) :

- latence
- érythème
- vésications
- nécrose
- guérison

Après une exposition à une faible dose d'ypérite (100 à 300 mg/min/m³ de vapeurs, ou bien de 10 à 20 µg/cm² d'ypérite liquide), un érythème associé à une démangeaison sont observés après 4 à 8 h. Pour une dose plus forte (1000 à 2000 mg/min/m³ d'ypérite sous forme vapeurs ou 40 à 100 µg/cm² d'ypérite liquide), les symptômes apparaissent en quelques minutes. Ils sont plus intenses et vont traverser les 5 phases (45, 96). Des petites vésications apparaissent environ 18 h après exposition. Ces vésications vont devenir coalescentes pour former des phlyctènes sub-épidermales contenant un liquide jaune. L'ypérite ayant déjà réagi lors des premières minutes après pénétration à travers la peau, cet exsudat ne contient pas d'ypérite active et n'est donc pas contaminant (96, 97). Une nécrose du derme supérieur et des vaisseaux sanguins ainsi qu'une forte douleur sont décrites 1 à 2 jours post-exposition (96). Au 4^{ème} jour, la nécrose se transforme en escarre qui laissera une cicatrice présentant un défaut de pigmentation (45, 97).

Certaines zones sont plus susceptibles que d'autres de développer des lésions, notamment les zones chaudes et humides, comme les zones axillaires et génitales. En effet, dans ces zones, la peau est plus fine et possède davantage de follicules pileux, augmentant ainsi la pénétration de l'ypérite (45).

Le temps de guérison varie en fonction de la profondeur de l'atteinte. Ainsi, 2 à 8 semaines pourront suffire pour les phlyctènes superficielles, tandis qu'un temps de guérison allant jusqu'à plusieurs mois pourra être nécessaire pour les atteintes plus importantes (45, 96). Lorsque les victimes ne présentent pas de vésications, la guérison sera totale sans séquelles, tandis que les vésications et lésions nécrotiques laisseront des séquelles (97).

Les principales complications observées dans une étude menée auprès de 236 vétérans iraniens, 2 ans après leur exposition, sont l'hyper-pigmentation (34 %), l'hypo-pigmentation (16 %) et la présence de cicatrices (8 %) (97). Dans une autre étude conduite auprès de 40 vétérans iraniens, 16 à 20 ans après leur exposition à l'ypérite, les trois complications les plus fréquentes sont des dyspigmentations (55 % hyperpigmentation, 25 % hypopigmentation), une éruption papuleuse érythémateuse (42,5 %) et une peau sèche (39 %) (98). De plus, les vétérans se plaignent principalement de démangeaisons, de sensation de brûlure et de desquamation (45, 97). D'autres études ont montré un lien entre l'exposition à l'ypérite et une prévalence de vitiligo, angioœdème, eczéma, psoriasis (45). Un lien entre l'exposition à l'ypérite et le développement de cancer cutané a été décrit notamment dans une étude portant sur 800 vétérans iraniens (99).

I.3.5 Les connexines

Généralités

Les connexines sont des protéines transmembranaires ubiquitaires, constitutives des jonctions communicantes « gap junctions ». Ces jonctions permettent la communication intercellulaire grâce au passage de petites molécules, d'ions, de seconds messagers jusqu'à 1000 - 1200 Da (100-102). La quasi-totalité des cellules des vertébrés synthétisent des connexines, à l'exception des cellules musculaires striées adultes, quelques neurones, les spermatozoïdes et les cellules circulantes du sang (103).

Les connexines traversent quatre fois la membrane plasmique, formant ainsi une boucle intracellulaire, deux boucles extracellulaires et quatre domaines transmembranaires (Figure 13). Leurs deux extrémités NH₂ et COOH (domaine CT pour C-terminal) sont cytoplasmiques.

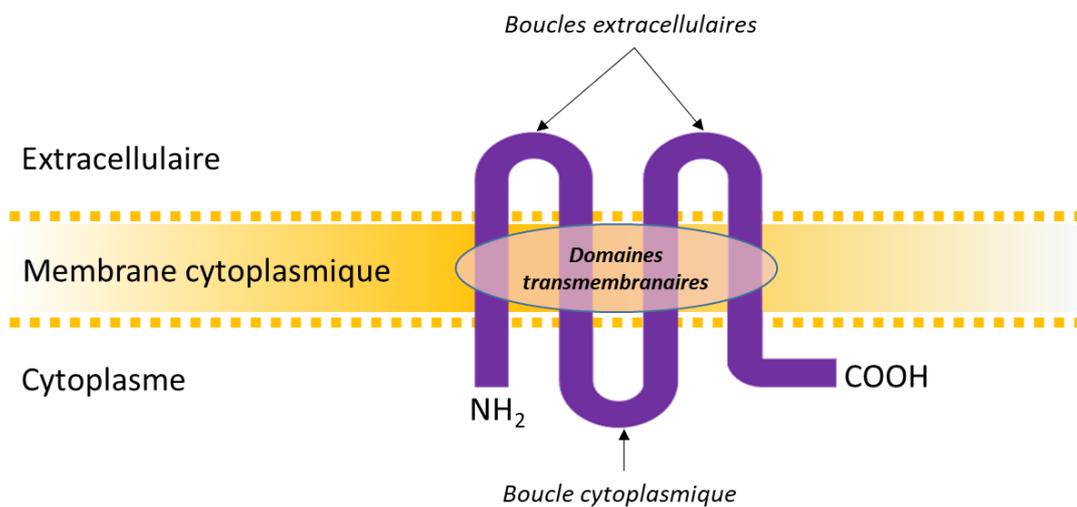
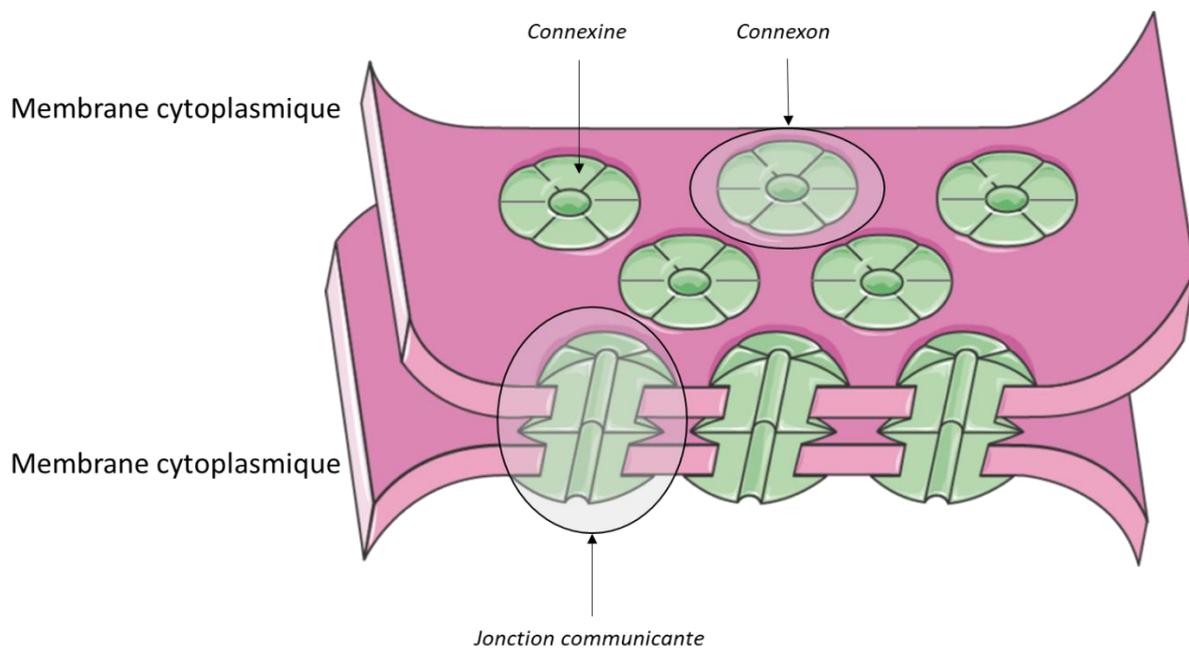


Figure 13 : Schéma d'une connexine.

Les connexines s'assemblent par six pour former un hexamère qui constitue un connexon ou héli-canal. L'association de deux connexons de deux cellules adjacentes forme une jonction communicante tubulaire, hydrophile, permettant ainsi le passage de petites molécules (Figure 14). Cette jonction communicante forme un canal de 2 à 4 nm de diamètre sur 10 nm de longueur (103). Ces jonctions ont une densité de 10^4 canaux par μm^2 de membrane, formant une plaque jonctionnelle (104).



*Figure 14 : Schéma de jonctions communicantes.
Assemblage de connexons (constitués de 6 connexines) situés dans deux cellules adjacentes.*

Il existe une vingtaine de types de connexines chez les mammifères (20 chez la souris et 21 chez l'Homme (Tableau IV) dont le nom correspond à leur poids moléculaire estimé (101, 102). Il existe également une autre classification en sous-groupes α , β et γ (dont les noms commencent par « GJ » pour Gap Junction), basée sur leur homologie génétique (105). Leur numérotation correspond à l'ordre dans lequel elles ont été découvertes. La connexine 43, correspond dans cette seconde nomenclature à GJ α 1 (GJA1) car il s'agit de la première connexine découverte dans le groupe α (106).

Tableau IV : Dénominations des connexines murines et humaines selon les deux nomenclatures (102, 106) et correspondance entre les connexines et leurs gènes associés.

Connexines murines			Connexines humaines		
Cx	GJ	chromosome	Cx	GJ	chromosome
mCx23		10	hCx23		6
			hCx25		6
mCx26	Gjb2	14	hCx26	GJB2	13
mCx29	Gje1	5	hCx30.2 (hCx31.3)	GJE1	7
mCx30	Gjb6	14	hCx30	GJB6	13
mCx30.2	Gja11	11	hCx31.9	GJA11	17
mCx30.3	Gjb4	4	hCx30.3	GJB4	1
mCx31	Gjb3	4	hCx31	GJB3	1
mCx31.1	Gjb5	4	hCx31.1	GJB5	1
mCx32	Gjb1	X	hCx32	GJB1	X
mCx33	Gja6	X			
mCx36	Gja9	2	hCx36	GJA9	15
mCx37	Gja4	4	hCx37	GJA4	1
mCx39		18	hCx40.1		10
mCx40	Gja5	3	hCx40	GJA5	1
mCx43	Gja1	10	hCx43	GJA1	6
mCx45	Gja7	11	hCx45	GJA7	17
mCx46	Gja3	14	hCx46	GJA3	13
mCx47	Gja12	11	hCx47	GJA12	1
mCx50	Gja8	3	hCx50	GJA8	1
			hCx59	GJA10	1
mCx57	Gja10	4	hCx62		6

Lorsque les connexons des deux héli-canaux de la jonction sont formés d'un seul type de connexine, on parle de jonction communicante homotypique. Lorsque les connexons sont composés de 6 connexines identiques mais que les deux hémicanaux ne comportent pas le même type de connexines, alors il s'agit d'une jonction communicante hétérotypique. La troisième possibilité est la jonction communicante hétérotypique dont les connexons sont hétéromériques, composés plusieurs types de connexines (107) (Figure 15).

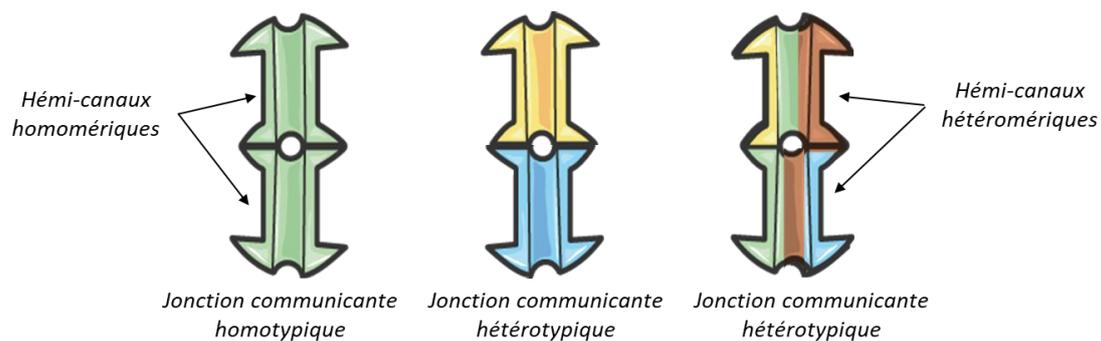


Figure 15 : Types de jonctions communicantes selon leur composition en connexines.
(Vues en coupes frontales)

Selon le type de jonction communicante, leur sensibilité et leur cinétique d'ouverture vont varier. Par exemple, les jonctions communicantes homotypiques de Cx43 ont une sélectivité pour les ions monovalents, par ordre décroissant : $K^+ > Na^+ > Li^+$ > chlorure de tétraméthylammonium (TMACl) > chlorure de tétraéthylammonium (TEACl) (107, 108). Ainsi, la composition de la jonction permet de sélectionner les molécules qui pourront la traverser (109).

Localisation

De nombreuses connexines sont présentes dans la peau (Figure 16). Ainsi, la Cx-43 est la plus représentée puisqu'elle est exprimée dans toutes les strates (du stratum granulosum jusqu'au stratum basale) tandis que les Cx-26 et -30 sont exprimées uniquement dans certaines strates (110). Par ailleurs, leurs localisations sont modifiées lors de remodelages cutanés.

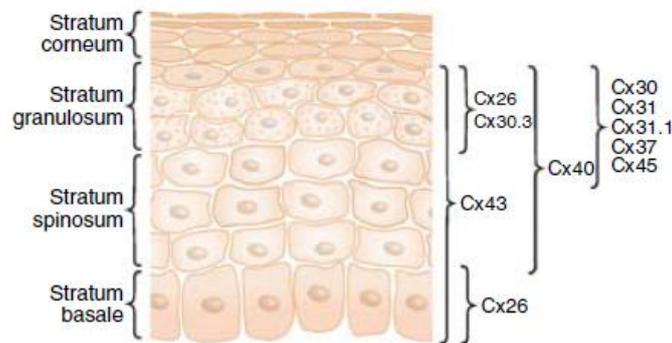


Figure 16 : Localisation des connexines dans l'épiderme (105).

Régulation

L'oligomérisation des connexines a pour particularité, par rapport aux autres protéines membranaires intégrales, de se produire après la sortie du réticulum endoplasmique, dans le transport trans-golgien (111). Les connexons sont ensuite transportés vers la membrane plasmique via des vésicules à l'aide de microtubules (105). Ceux-ci pourront s'agréger pour former une plaque jonctionnelle. Les connexines ont une courte demi-vie (1,5 – 5 h) (112). Deux voies protéolytiques sont connues pour être impliquées dans leur dégradation : la voie lysosomale et la voie protéosomale (105, 112). La dynamique de synthèse continue et de dégradation des connexines permet de s'adapter rapidement aux modifications de conditions environnementales (105).

La plaque jonctionnelle permettant les échanges entre deux cellules accolées va s'internaliser dans une seule des deux cellules en formant une jonction annulaire également appelée connexosome (113). Cette internalisation de la plaque jonctionnelle permet de dégrader les connexines mais également de les recycler à la surface de la cellule sous forme fonctionnelle (109, 113).

La communication intercellulaire est régulée à plusieurs niveaux, à la fois par la composition des canaux (*cf supra*), mais également par les modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la nitrosylation, la sumoylation et l'ubiquitination (109). Ces modifications agissent directement ou indirectement sur les canaux en les bloquant, modifiant leur accrétion, dégradation... Avec 21 sites de phosphorylation décrits sur le domaine C-terminal de la connexine 43, celui-ci est le principal domaine de régulation. Ces 21 sites de phosphorylation sont régulés par une dizaine de kinases et phosphatases dont des protéines kinases C et A (PKC et PKA), des MAPK (Mitogene Activated Protein Kinases), Src kinases et la protéine phosphatase 2A (PP2A) (109). Ces phosphorylations régulent ainsi l'activité du canal et également tout le cycle de vie de la connexine.

La connexine-43 interagit avec de nombreuses protéines dont les Zonula Occludens 1 et 2 (ZO-1 et ZO-2), guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK). A l'état quiescent, Cx-43 se lie préférentiellement à ZO-1, contribuant ainsi à la stabilité de la jonction. Il a également été démontré que l'interaction de Cx-43 avec ZO-1, permet de contrôler la taille des canaux (102, 114). Cette interaction régule négativement la taille de la jonction (115). Ainsi, l'expression de la connexine 43 et son état de phosphorylation varient durant le processus de cicatrisation. Contrairement aux autres connexines, la Cx-26 ne possède pas de site de phosphorylation dans sa partie C-terminale, mais présente de nombreuses modifications post-traductionnelles (110).

Dans le cas d'une plaie aiguë, une diminution de l'expression de toutes les connexines est observée dans les premières heures suivant la lésion, puis l'évolution des Cx-26, 30 et 43 va différer (116). Les Cx-26 et 30 vont évoluer de la même façon, différemment de la Cx-43 (110, 116). Ainsi, dans les 24 h suivant la lésion, une diminution de l'expression de la Cx-43 dans les cellules épidermiques est observée aux bords de la plaie et également dans le derme

entier, tandis que les Cx-26 et 30 sont augmentées dans les cellules différenciées de l'épiderme (116-119). Plusieurs jours après la lésion (5-6 jours), les Cx-26 et -30 restent fortement augmentées, tandis que la Cx-43 reste diminuée par rapport à son niveau initial (116, 120).

Pour conclure, dans le cadre d'une plaie aigüe, l'expression des Cx-26 et 30 est rapidement augmentée après la lésion, tandis que la Cx-43 est fortement diminuée jusqu'à plusieurs jours (116). Ces changements ont plusieurs conséquences dont la migration cellulaire au niveau de la lésion cutanée (115), une diminution de l'inflammation, une augmentation de la vascularisation tissulaire, une diminution de la fibrose. Ces effets permettent la cicatrisation cutanée (121) (Figure 17).

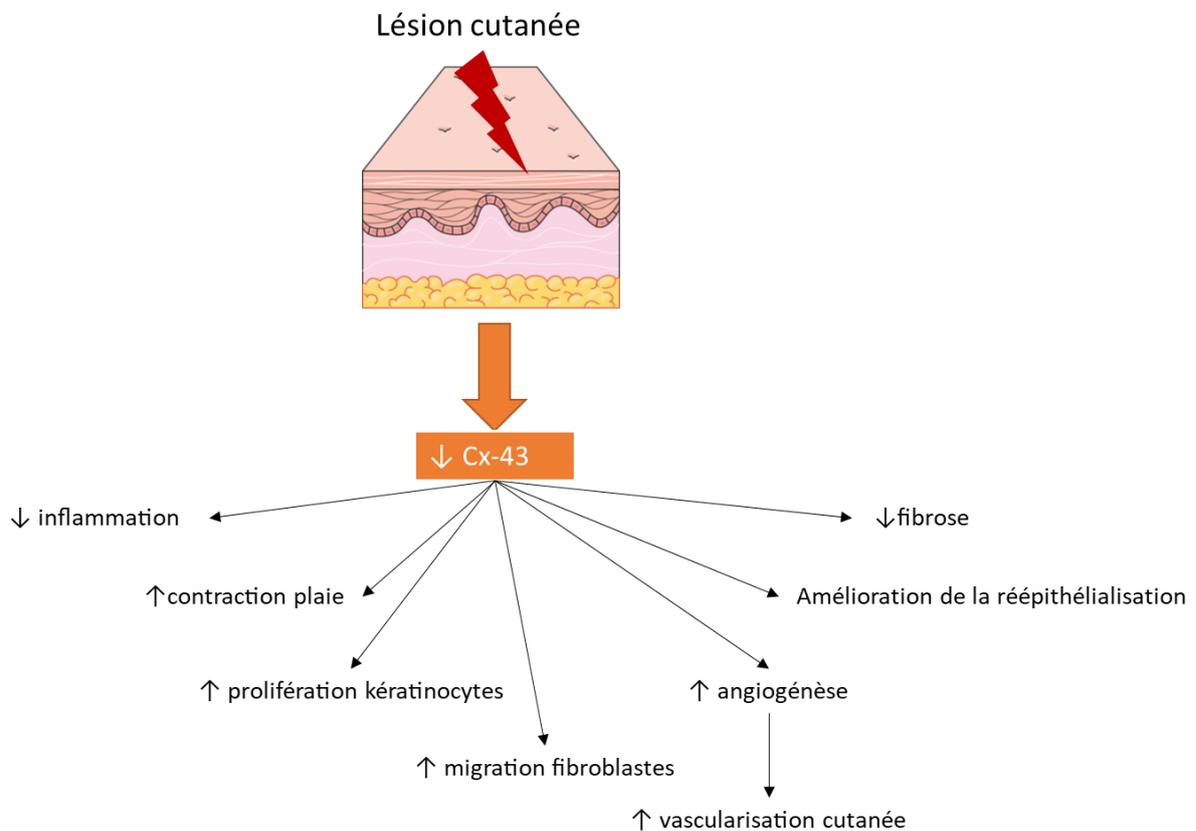


Figure 17 : Principales conséquences de la diminution de la Cx-43 dans le cas de la cicatrisation d'une plaie aigüe, d'après Wong et al., 2016 (121).

Dans le cas d'une plaie chronique, c'est-à-dire une plaie mettant plus de 6 semaines à cicatriser, ou qui ne traverse pas correctement les phases de cicatrisation (92), une modification de l'expression des connexines est observée (Tableau V). Ainsi, des études conduites sur des biopsies issues de plaies chroniques (pieds diabétiques et ulcères veineux de jambes) ont montré que la Cx-43 était surexprimée aux bords de la lésion ainsi que dans tout le derme (119, 122). Les Cx-26 et 30 sont quant à elles augmentées dans l'épiderme (110, 120, 122). La diminution de la Cx-43 apparaît comme une étape importante dans la cicatrisation cutanée.

Tableau V : Evolution des connexines-43, 26 et 30 dans le cas d'une plaie aigüe et chronique

Type de plaie	Cx-43	Cx-26	Cx-30
Plaie aigüe	↓	↑	↑
Plaie chronique	↑	↑	↑

Des thérapeutiques visant à réguler négativement la Cx-43 ont ainsi été développées pour accélérer le processus de cicatrisation (123, 124). Les principales thérapeutiques testées sont un peptide mimétique de la partie C-terminale de la Cx-43 (Alpha connexin Carboxyl Terminus 1 ou α CT1, ou encore ACT1) et un oligonucléotide antisens (ASODN) de la Cx-43 (124, 125). Le peptide ACT1 vise ainsi à diminuer l'interaction de la Cx-43 avec ZO-1 (Figure 18). Une étude clinique a évalué l'efficacité de ce peptide appliqué immédiatement et 24 h après des incisions chez l'Homme. Après 9 mois, les lésions traitées ont présenté de meilleurs scores de cicatrisation (126). Ce peptide a également été testé en clinique dans le cadre de traitement du pied diabétique et a permis une fermeture des plaies plus rapide que le traitement standard contrôle (127).

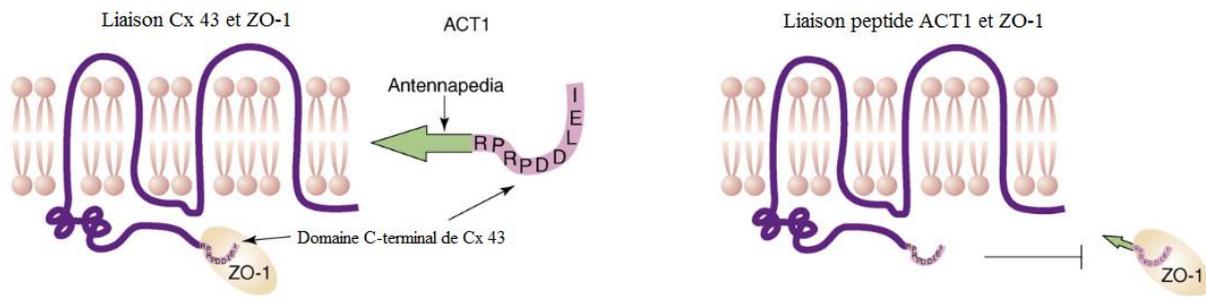


Figure 18 : Peptide ACT1.

Le peptide ACT1 correspond à la partie C-terminale de la Cx-43 associée à la séquence d'internalisation antennapedia. Ce peptide agit comme un inhibiteur compétitif pour ZO-1, d'après Rhett et al., 2008 (128)

Des essais cliniques ont évalué l'efficacité d'oligonucléotides antisens (ASODN) de la Cx-43 dans le cadre de traitement d'ulcères veineux et de pieds diabétiques (études NCT01199588, NCT00820196 et NCT00820703). Ces ASODN ont pour but de diminuer l'expression de la Cx-43 en ciblant son ARNm. Les résultats de l'essai clinique NCT00820196 montreraient notamment une réduction de 69 % de la taille de l'ulcère veineux en 4 semaines, d'après Laird and Lampe, 2018 (102).

Par ailleurs, d'autres études cliniques évaluent le peptide ACT1 et l'ASODN afin de réduire les cicatrices ainsi que sur les lésions cornéennes (102).

Plusieurs mois sont nécessaires à la cicatrisation des lésions cutanées induites par l'ypérite. Celles-ci rentrent donc dans la définition des plaies chroniques (50). Ainsi, dans cette thèse, nous avons étudié l'évolution des Cx après une exposition cutanée à l'ypérite et à son analogue le CEES. Il s'agissait de déterminer si ces deux agents vésicants avaient un impact sur les Cx-43, 26 et 30, susceptibles d'expliquer la chronicité des lésions. En fonction des résultats obtenus, des thérapeutiques agissant sur ces Cx visant à accélérer la cicatrisation pourraient être évaluées.

I.4. Les effets cérébraux induits par l'ypérite

I.4.1 Principaux effets comportementaux de l'ypérite décrits chez l'Homme

Quelle que soit la voie d'exposition, l'ypérite diffuse dans tout l'organisme et atteint de nombreux organes via la circulation générale. Cette distribution s'opère rapidement puisque Yue et al., 2015, ont détecté la présence, notamment dans le cerveau, d'adduits de l'ypérite à l'ADN dès 10 minutes après l'exposition (129). De plus, Batal et al., 2015, ont détecté, après exposition cutanée, des adduits de l'ypérite avec l'ADN et le glutathion, non seulement dans la peau, mais également dans de nombreux organes, tels que le cerveau, les poumons, les reins et la rate. Le cerveau a été décrit comme étant l'organe concentrant le plus d'adduits (130). Par ailleurs, le cerveau est un organe particulièrement sensible au stress oxydatif (131). Or, l'ypérite induit un stress oxydatif important y compris dans des organes distants du site d'exposition. Ainsi, après une injection d'ypérite par voie intrapéritonéale (i.p.) chez des rats, un stress oxydatif cérébral accompagné d'une perturbation de leur système de défense antioxydant ont été observés (déplétion du glutathion, diminution de la superoxyde dismutase) (132). De plus, un lien entre l'anxiété et le stress oxydatif a été décrit (133, 134). Du fait du stress oxydatif et de la présence d'adduits cérébraux induits par l'ypérite, nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle l'ypérite induirait des effets cognitifs et/ou émotionnels.

Bien que quelques publications aient montré que l'ypérite induit des effets biochimiques sur le cerveau (stress oxydatif et présence d'adduits notamment), ses effets cognitifs n'ont été cependant que peu étudiés. La plupart des études sont rétrospectives, portant sur les effets à long terme chez des vétérans Iraniens exposés à l'ypérite lors de la guerre Iran-Irak (1980-1988). Ainsi, une étude conduite entre 2005 et 2006 auprès de 136 vétérans iraniens exposés à l'ypérite décrit, en plus des complications à long terme (cutanées, oculaires et pulmonaires), des complications neurologiques : 26,86 % des patients présentent des maux de tête, 16,42 % de l'épilepsie, 11,94 % des vertiges et 4,48 % des tremblements (135). L'étude de Darchini-Maragheh et al., 2012, décrit également des complications

neurologiques chez des vétérans iraniens, telles que 65,1 % de perte de concentration, 58,1 % de perte de mémoire, 44,1 % de dépression, 27,9 % d'anxiété (136). Cependant, il est à noter que ces vétérans ont été exposés à de l'ypérite ainsi qu'à du tabun (agent neurotoxique organophosphoré). Les effets décrits ne peuvent donc pas être attribués à la seule ypérite. En 2014, Razavi et al. ont publié une revue de la littérature rapportant de nombreux cas de troubles cognitifs et émotionnels : de 18 à 65 % d'anxiété, de 6 à 46 % de dépression sévère, 98 % de troubles émotionnels, 80 % de comportements anormaux, 80 % de trouble de la mémoire, 3 % de psychose, de 8 à 59 % de stress post-traumatique (PTSD) ... (137). Par ailleurs, une autre publication compare la survenue d'anxiété, de dépression et de PTSD chez des civils iraniens vivant dans 3 villes, dont une où de l'ypérite aurait été utilisée. La première ville, Sardasht, a été le théâtre d'utilisation d'armes de guerre à haute intensité ainsi que d'armes chimiques. En effet, en juin 1987, un bombardement avec 4 ogives de 250 kg contenant de l'ypérite a eu lieu dans cette ville, exposant ainsi environ 4500 habitants. Des symptômes caractéristiques de l'ypérite ont été observés tels que des brûlures cutanées et oculaires ainsi que des symptômes respiratoires. La seconde ville est Rabat. Dans cette ville, seul de l'armement conventionnel a été utilisé, à haute intensité également. La troisième ville, Oshnaviyeh, a été exposée à des armes conventionnelles de basse intensité. Les auteurs de cette publication ont comparé la survenue d'effets cognitifs chez 153 victimes civiles issues de ces 3 villes. Les résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau VI ci-dessous (138). Ils montrent que l'utilisation d'ypérite, indépendamment de l'intensité des combats, induirait une augmentation de la survenue de troubles anxieux, dépressifs et de stress post-traumatique (138). Il a par ailleurs été montré que tous ces effets neuropsychiatriques décrits se sont traduits par un retentissement sur la qualité de vie des victimes (137).

Tableau VI : Comparaison des troubles cognitifs observés chez 153 civils lors de la guerre Iran-Irak selon l'intensité des combats et l'exposition à l'ypérite. N=51 par ville.

D'après Hashemian et al., 2006 (138).

Ville	Sardasht	Rabat	Oshnavieh
Exposition	Haute intensité : conventionnelle + chimique	Haute intensité conventionnelle	Faible intensité conventionnelle
Anxiété sévère	65 %	26 %	18 %
Dépression sévère	41 %	12 %	6 %
PTSD à vie (full lifetime PTSD)	24 %	6 %	0 %

Par ailleurs, une étude chinoise rapporte également un lien entre des complications neuropsychologiques et une exposition à un agent vésicant (139). En effet, 44 victimes ont été exposées en août 2003 à Qiqihar en Chine, à un mélange de deux agents vésicants, l'ypérite et la lewisite, en manipulant 5 fûts chimiques abandonnés par l'armée impériale japonaise lors de la seconde guerre mondiale (139). Parmi les 44 victimes recensées, 26 ont été en contact direct avec le toxique. L'une d'elles décéda 17 jours après l'accident. 18 sujets ont été victimes d'un transfert de contamination via le sol contaminé sur 8 sites distincts. Entre 2006 et 2014, 6 bilans ont été réalisés sur ces victimes. Les auteurs de cette étude ont conclu à la présence de troubles des facultés visuospatiales, de la mémoire à court terme, ainsi que de PTSD et de dépression suite à cette exposition à un mélange d'ypérite et de lewisite (139).

Bien que certaines études, dont celle de Hashemian et al., 2006 (138), tentent de distinguer les effets du stress de guerre des effets propres de l'ypérite, il subsiste des incertitudes concernant la nature de l'agent, la dose reçue par les victimes ainsi que la voie d'exposition (cutanée, pulmonaire, oculaire,...). Dans le but d'attribuer à l'ypérite les effets cognitifs et émotionnels décrits chez les victimes iraniennes et chinoises, des études *in vivo* conduites en laboratoire sur modèle animal se sont avérées nécessaires afin de s'affranchir des effets neuropathologiques imputables au stress de guerre, permettant ainsi de confirmer la toxicité propre de l'ypérite sur le système nerveux central.

I.4.2 Anxiété et mémoire de travail : rappels bibliographiques

Parmi les troubles émotionnels et cognitifs décrits chez les vétérans exposés à l'ypérite, l'anxiété et un déficit de la mémoire de travail sont souvent cités (137).

De nombreuses définitions et classifications de l'anxiété existent. En 2009, Craske propose une définition de l'anxiété basée sur les concepts de Barlow : « l'anxiété est un état d'esprit orienté vers l'avenir, associé à la préparation possible d'évènements négatifs à venir » (140). En outre, selon le DSM-IV (manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux), des symptômes somatiques sont associés aux symptômes psychiques (141-144). Pour certains auteurs, la peur et l'anxiété ne sont pas distinctes (145). Cependant, d'autres auteurs distinguent la peur comme étant une réponse à un danger présent ou imminent (140, 144). Une autre distinction proposée est liée au fait de connaître ou non le danger (anxiété : danger inconnu, peur : danger connu) (145). Ainsi, l'anxiété peut être décrite comme une peur plus élaborée permettant à l'individu d'augmenter sa capacité d'adaptation (145). Bien qu'une distinction entre la peur et l'anxiété puisse être faite, il existe une similarité dans leurs mécanismes comportementaux (145). L'expression de l'anxiété et de la peur sera dans les deux cas la préparation de l'organisme à se défendre, à échapper à une situation de danger (145). Les manifestations de l'anxiété peuvent être cognitives, comportementales et physiologiques (146). Les manifestations somatiques peuvent être une tension musculaire, des cervicalgies, des céphalées, des douleurs rachidiennes, des troubles du sommeil et des symptômes digestifs (147). Les troubles cognitifs associés sont des troubles de la concentration, de l'attention ainsi que de la mémoire (141, 142).

Principales structures impliquées dans le mécanisme de la peur et de l'anxiété

Les principales structures impliquées dans le mécanisme de l'anxiété et de la peur sont l'amygdale, le thalamus, l'hippocampe et le cortex préfrontal (Figure 19).

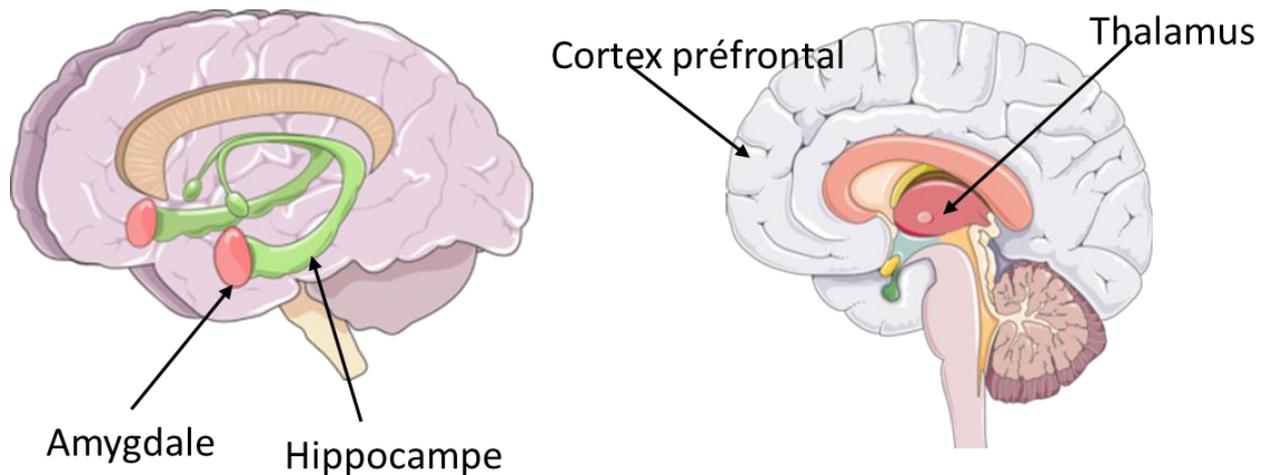


Figure 19 : Principales structures cérébrales impliquées dans le circuit de la peur et de l'anxiété.

L'amygdale

L'amygdale est une structure particulièrement impliquée dans le mécanisme de la peur. Cette structure bilatérale, composée de plusieurs noyaux interconnectés, tire son nom de sa forme en amande (148). Elle est localisée dans les profondeurs du lobe temporal, dans la partie antéro-inférieure (149). Elle se situe en avant de l'hippocampe et fait partie du système limbique. Le système limbique est un ensemble structures cérébrales contrôlant le comportement affectif, la motivation et certaines formes de mémoire (150). De par ses nombreuses connexions, (notamment avec l'hippocampe, le thalamus et le cortex), l'amygdale joue un rôle essentiel dans les émotions, la récompense, la motivation, l'apprentissage, la mémoire et l'attention (148, 151, 152). L'amygdale est ainsi impliquée dans la réponse aux stimuli, au conditionnement. Il a été démontré le rôle fondamental de l'amygdale dans les

études de peur conditionnée chez l'animal, par l'association d'un stimulus neutre (son, environnement spatial) à un stimulus intrinsèquement aversif (choc électrique), ou encore dans des études d'apprentissage de stimulus-récompense (association d'un stimulus neutre avec une récompense) (148, 153, 154). En effet, les animaux dont l'amygdale avait été retirée ou lésée, présentaient des perturbations d'apprentissage stimulus-réponses (148), et d'association stimulus-réponse de défense (154). Dans le circuit de la peur, suite à la réception des informations provenant de ses différentes connexions, l'amygdale va agir sur des structures responsables des réactions somatiques de la peur (tachycardie, sudation...) (155). En effet, l'amygdale est connectée avec tous les cortex sensoriels (155).

Le thalamus

Le thalamus est une structure du diencephale principalement constituée de matière grise, située au-dessus de l'hypothalamus (150, 156). C'est un ensemble de noyaux ayant chacun un rôle, depuis le relai des informations sensorielles et motrices afférentes jusqu'à la régulation de la conscience et de la vigilance (156). En effet, une des principales fonctions du thalamus est de jouer un rôle d'interface, de relai, puisqu'il reçoit des informations depuis tous les systèmes sensoriels, puis les intègre et les transmet vers l'aire corticale appropriée (157, 158). Une représentation générale proposée consiste en une division des noyaux thalamiques en trois secteurs : médian, latéral et antérieur (150). Les noyaux antérieurs sont connectés aux structures du système limbique, impliquant ainsi le thalamus dans l'apprentissage et la mémoire épisodique (156). Dans la schématisation du circuit de la peur, le thalamus intervient dans le circuit court, en relation directe avec l'amygdale, et également dans le circuit long, en passant par le cortex préfrontal. En effet, dans le circuit long, le thalamus va transmettre les informations au cortex qui pourra analyser finement l'information (155).

L'hippocampe

L'hippocampe fait également partie du système limbique. Cette structure bilatérale se situe dans le lobe temporal médian, en prolongement de l'amygdale avec de nombreuses projections réciproques (159). L'hippocampe joue un rôle important dans le « contrôle des comportements spécifiques des espèces ainsi que dans la mémoire et la navigation spatiale » (150, 160-164). Une différenciation fonctionnelle de l'hippocampe, antérieur et postérieur (respectivement ventral et dorsal chez les rongeurs), a été mise en évidence par des études comportementales (165-167). Ainsi, la partie postérieure (dorsale) de l'hippocampe joue un rôle préférentiel dans l'apprentissage et la mémoire (spatiale notamment), tandis que la partie antérieure (ventrale) est associée aux émotions (159, 165). Cette dernière est liée principalement à l'amygdale et à l'hypothalamus, tandis que la partie dorsale (postérieure) est principalement liée au néocortex (168, 169). Cependant, l'hippocampe ventral (antérieur) est également impliqué dans l'acquisition de la mémoire spatiale et le rappel de cette mémoire engage l'axe dorsoventral de l'hippocampe (170). L'hippocampe intervient dans le circuit long de la peur. Il apporte le contexte dans lequel s'inscrit le stimulus, en faisant appel aux souvenirs pour ainsi freiner la réponse de l'amygdale.

Le cortex préfrontal

Le cortex préfrontal permet le contrôle des fonctions exécutives et du comportement au contexte environnemental (150). Il reçoit des informations provenant de nombreuses structures telles que l'amygdale, le thalamus, le cortex sensoriel associatif. La région préfrontale inférieure envoie des projections sur l'amygdale et l'hypothalamus (150). L'hypothalamus est une structure du diencephale permettant la régulation de la température, de la faim, de la soif et du comportement sexuel (150). Il est activé par le thalamus qui relaie des informations sensorielles internes (155). L'hypothalamus est relié avec l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal. L'interaction de l'hypothalamus avec ces structures permet de générer des comportements émotionnels et motivés (150).

Dans le circuit de la peur, le cortex préfrontal reçoit les informations via le thalamus. Le cortex préfrontal a pour rôle d'analyser des stimulus et des situations complexes et de contrôler les réponses émotionnelles (145). Ainsi, le cortex préfrontal va maintenir ou freiner l'amygdale en fonction de son analyse de la situation.

Les circuits de la peur

Les structures impliquées dans la peur et de l'anxiété s'articulent en deux circuits : le circuit court (voie ventrale), passant du thalamus à l'amygdale, et le circuit long (voie dorsale) impliquant de plus le cortex préfrontal et l'hippocampe (Figure 20).

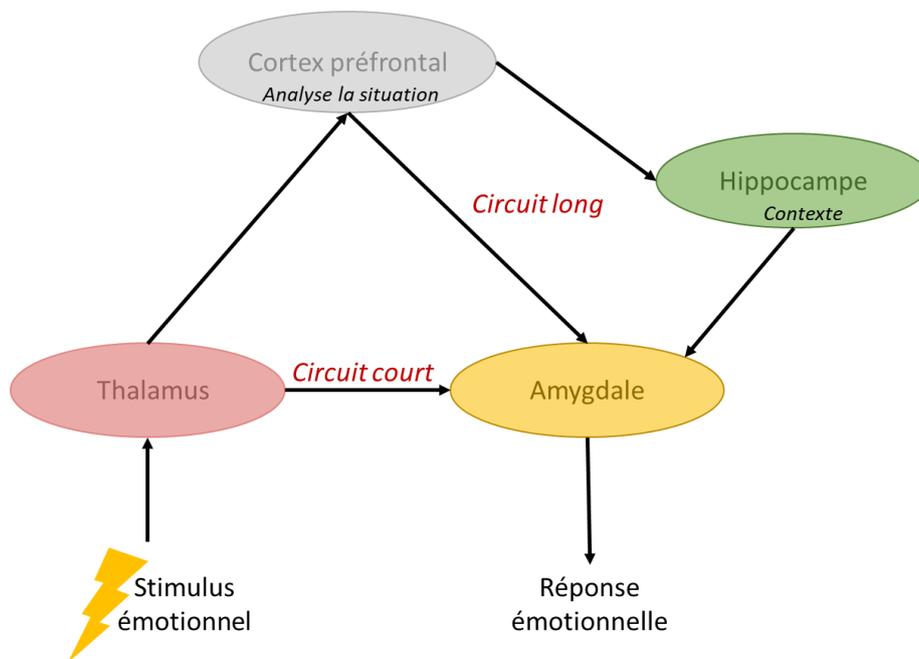


Figure 20 : Circuits de la peur.

Le circuit court transmet l'information du thalamus vers l'amygdale qui activera rapidement les réponses émotionnelles. Le circuit long passera par le cortex préfrontal et l'hippocampe qui pourront analyser l'information et contextualiser le danger, et ainsi freiner l'amygdale dans sa réponse émotionnelle.

Les deux circuits de la peur (court et long) coexistent. La mise en œuvre de la voie courte, du thalamus à l'amygdale, nécessite quelques millisecondes (12 ms chez le rat pour une stimulation acoustique), tandis que la voie longue (incluant le cortex et l'hippocampe) nécessite deux fois plus de temps (155). En effet, dans la voie longue, le cortex va analyser l'information tandis que l'hippocampe va mémoriser le contexte associé au stimulus. Le cortex et l'hippocampe maintiendront ou freineront l'action de l'amygdale (151, 155, 163, 171). La voie courte, plus rapide, a ainsi un rôle dans la survie, tandis que la voie longue permet de rationaliser le danger potentiel grâce à une analyse de la situation. Un hyperfonctionnement amygdalien ou un hypofonctionnement hippocampique peuvent ainsi induire un état d'anxiété (172). La mémoire et les émotions sont interdépendantes compte tenu des nombreuses connexions entre l'amygdale et l'hippocampe. Il a été démontré que l'amygdale joue un rôle essentiel dans la « mémoire émotionnelle » puisqu'une lésion de l'amygdale abolit ce type de mémoire (150, 173). Ainsi les événements liés à des émotions fortes seront plus facilement mémorisés notamment grâce aux glucocorticoïdes passant au niveau du système nerveux central (164, 174-176). En effet, une étude conduite chez des souris a montré un passage rapide et transitoire de glucocorticoïdes dans l'hippocampe après un stress aigu et une inversion de la mémoire sérielle (177). Un contexte associé à un événement traumatisant pourra être source d'anxiété. En outre, une réduction du volume de l'hippocampe de 6 à 8 % a été observée chez des vétérans souffrant de stress post-traumatique (178). Chez l'animal, il a été observé que le stress chronique induit également une dégénérescence de l'hippocampe via un taux anormalement et durablement élevé de glucocorticoïdes (150, 178). De même, dans le cas de pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, une dégénérescence des neurones hippocampiques en lien avec une altération de l'homéostasie des glucocorticoïdes a été observée (179, 180).

L'interaction entre toutes les structures du circuit de la peur dépend de neurotransmetteurs et d'hormones. Lors d'un stress, deux types de réponses sont mises en place, une réponse rapide et une lente (150). La première réponse consiste en la transmission d'un message nerveux par l'hypothalamus, via la moelle épinière, jusqu'aux glandes surrénales (partie médullaire) afin de libérer des catécholamines, l'adrénaline en particulier (150). Cette première réponse, très rapide, de l'ordre de la seconde, permet à l'organisme d'être en état

d'alerte avec une vigilance augmentée (150, 181). En parallèle de cette première réponse rapide, la stimulation de l'amygdale va conduire à la synthèse du peptide corticolibérine (ou CRH pour corticotropin releasing hormone) dans l'hypothalamus vers l'hypophyse qui libère de la corticotropine (ou ACTH pour adrenocorticotropin hormone), conduisant à la synthèse et à la libération de glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le rongeur) par le cortex des glandes surrénales (150, 181). Les glucocorticoïdes vont permettre à l'organisme de concentrer les dépenses énergétiques au niveau des muscles et du cerveau et de réduire les autres dépenses énergétiques afin de le préparer à la fuite ou à la survie. Cette voie du cortisol est activée en quelques minutes ou quelques heures (150). Ainsi, l'association des deux séquences de réponses va permettre de préparer l'organisme à la survie ou la fuite de façon rapide, et de concentrer les ressources nécessaires via la réponse plus lente (Figure 21) (150).

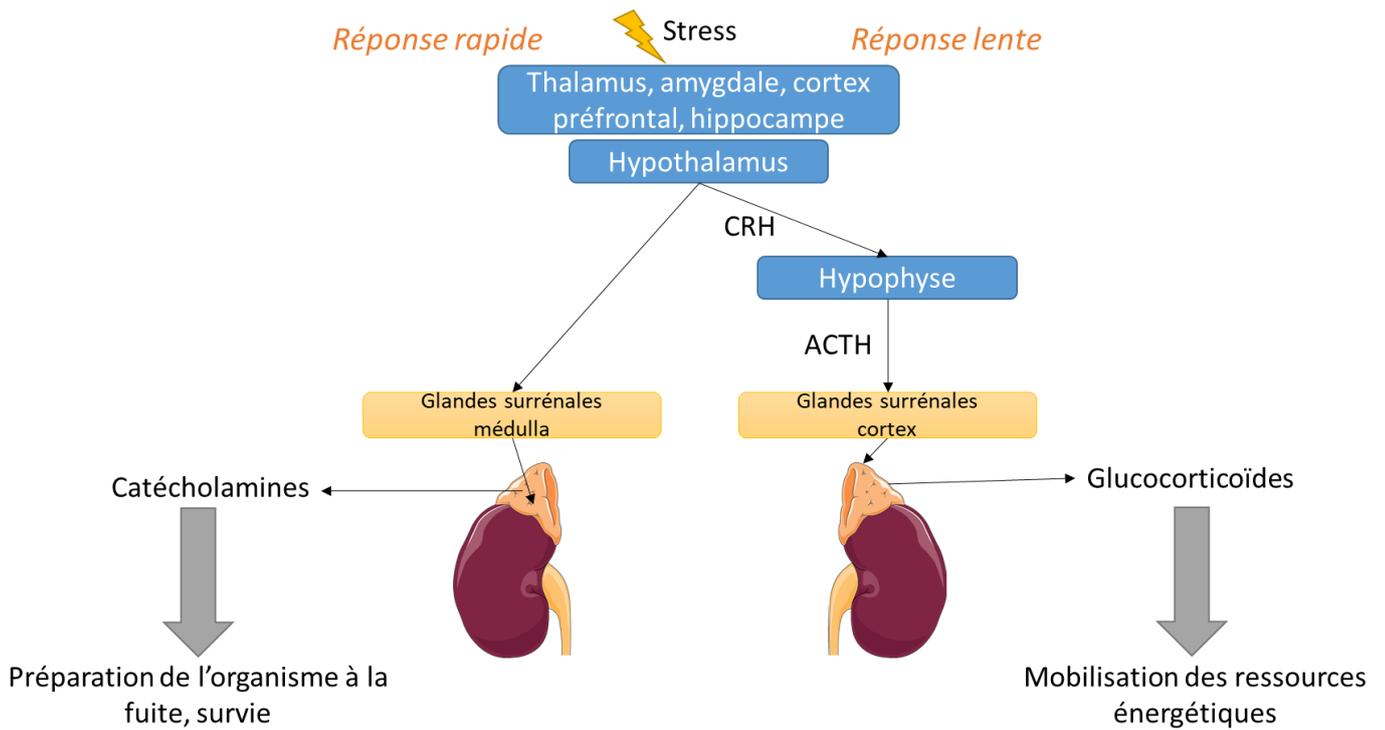


Figure 21 : Réponse de l'organisme face à un stress.

Après analyse de la situation par le thalamus, l'amygdale, le cortex préfrontal et l'hippocampe, l'hypothalamus va dans un premier temps envoyer rapidement un message nerveux aux glandes surrénales (partie médullaire) afin de libérer des catécholamines pour préparer l'organisme à la fuite et à la survie. Dans un second temps, l'hypothalamus va également synthétiser le peptide CRH à destination de l'hypophyse qui va libérer de l'ACTH. L'ACTH va agir sur la partie corticale des glandes surrénales conduisant à la libération de glucocorticoïdes qui permettront la mobilisation des ressources énergétiques.

Classification des systèmes de mémoire

En 1992, Squire a proposé une classification dichotomique de la mémoire basée sur des observations menées chez l'Homme et l'animal (160, 182). Ainsi, la mémoire peut être divisée en deux systèmes : la mémoire déclarative (explicite) et la mémoire non-déclarative (implicite) (157).

La mémoire déclarative ou explicite correspond aux informations stockées, accessibles à la conscience, tandis que la mémoire non déclarative, ou implicite, est généralement non accessible à la conscience. Ainsi, dans la mémoire déclarative, seront stockés les épisodes de la vie quotidienne (mémoire autobiographique), et la mémoire sémantique stockant les connaissances générales (182). La mémoire déclarative permet de récupérer de façon consciente les informations (numéro de téléphone, paroles de chanson...) (157). La mémoire déclarative est essentiellement sous-tendue par le diencephale et le lobe temporal médian (160, 182), contenant l'hippocampe, le cortex et l'amygdale (183).

A l'inverse, dans la mémoire non déclarative, ou implicite, le rappel des souvenirs s'effectue de manière inconsciente sans le contexte associé. Cette mémoire concerne ainsi les habiletés motrices, cognitives et perceptives, les associations et indices d'amorçage et le conditionnement classique (157, 182, 184, 185). La mémoire non déclarative dépend essentiellement du striatum, du néocortex, de l'amygdale et du cervelet (160, 182).

Les mémoires déclarative et non déclarative font toutes deux partie de la mémoire à long-terme. En effet, une notion de durée peut être ajoutée à cette classification (Figure 22). Ainsi, 3 types de mémoires peuvent être distingués en fonction de leur durée : la mémoire immédiate (moins d'une seconde), la mémoire de travail ou à court-terme (de quelques secondes à quelques minutes) et la mémoire à long terme (plusieurs jours à années) (157). Par un mécanisme de consolidation du souvenir, des informations de la mémoire à court-terme peuvent être encodées dans la mémoire à long-terme (157). La mémoire de travail, à court-terme, est généralement étudiée dans le contexte de la mémoire déclarative (157).

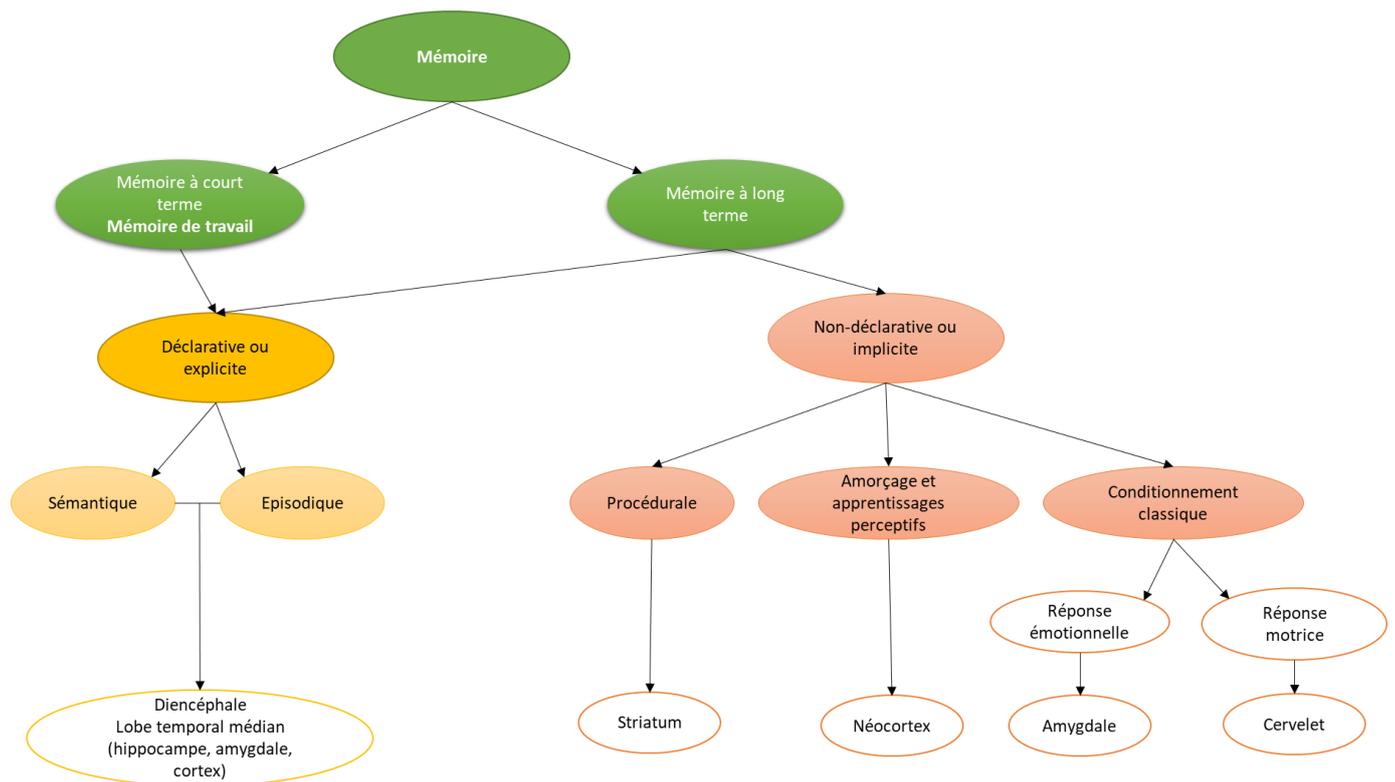


Figure 22 : Classification dichotomique de la mémoire chez l'Homme.

Ce modèle distingue la mémoire à court-terme et à long-terme, la mémoire déclarative (explicite) de la mémoire non déclarative (implicite). Adapté de Squire et al., 1992 (182) et de Jaffard 2011 (185).

Un autre modèle de classification de la mémoire est celui proposé par Tulving en 1995. Dans son modèle, les mémoires sémantique et épisodique appartiennent à deux systèmes différents. La mémoire sémantique est la mémoire des connaissances générales, tandis que la mémoire épisodique répond aux trois questions « what », « where » et « when », c'est-à-dire, quoi, où et quand (186). Les souvenirs en mémoire épisodique impliquent donc une composante temporelle. La mémoire épisodique est sous-tendue par le cortex préfrontal pour l'encodage et le rappel (187). La mémoire épisodique a été décrite comme étant uniquement présente chez l'Homme, cependant des travaux conduits par Clayton et Dickinson en 1998 sur des geais, ont montré que ces animaux présentaient une mémoire de type épisodique (episodic-like memory) lorsqu'ils devaient retrouver des aliments qu'ils avaient cachés, en fonction de leur caractère périssable ou non (187, 188). Dans le modèle de Tulving, la mémoire épisodique est représentée au-dessus des autres systèmes de mémoire. Son modèle est dit

Sérial, Parallèle et Indépendant (SPI). Dans le modèle de Tulving, l'encodage des informations est sériel et dépend des systèmes de mémoire précédents à partir du système de représentations perceptives jusqu'à la mémoire épisodique (Figure 23). Le stockage des informations se fait de façon parallèle dans les systèmes de mémoire, et le rappel des informations d'un système de mémoire est indépendant des autres systèmes (189). L'une des limites de ce modèle est la relation entre la mémoire procédurale et les autres systèmes. Un modèle intégrant la notion de buffer épisodique proposée par Baddeley, permettrait de faire le lien entre la mémoire de travail, procédurale, et les autres systèmes de mémoire (189).

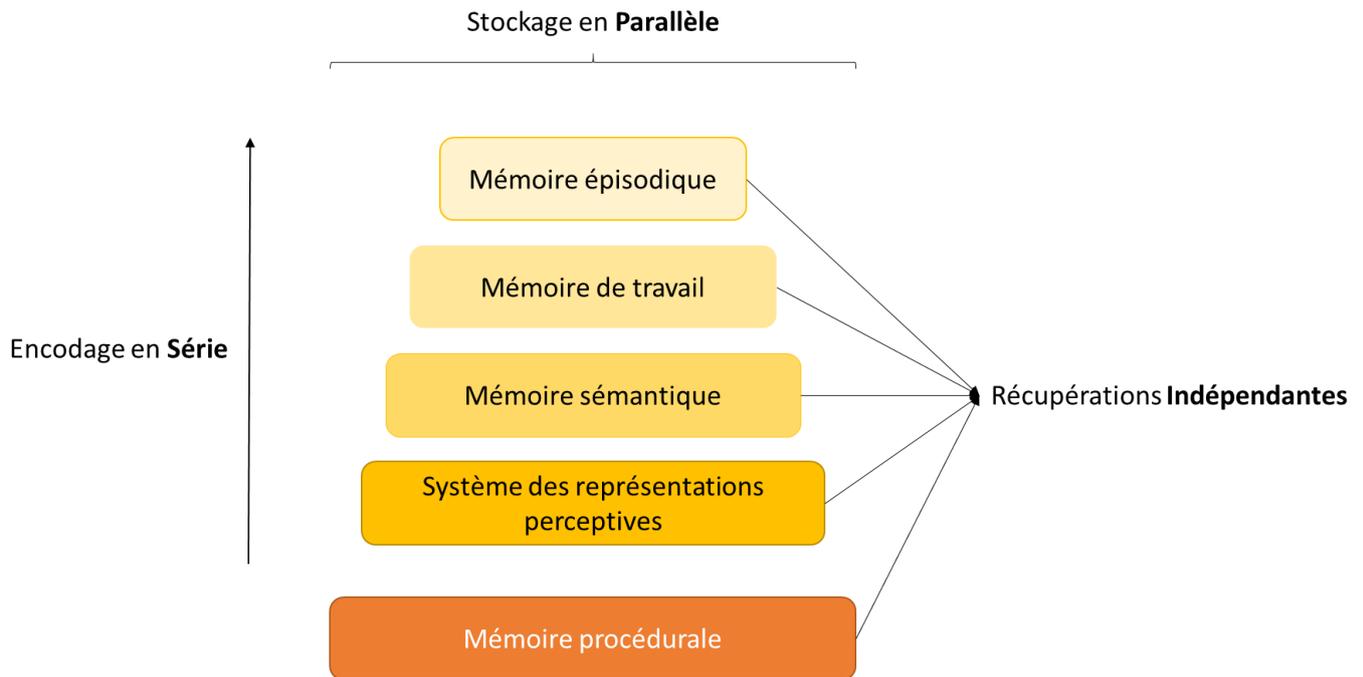


Figure 23 : Modèle de Tulving SPI (sériel, parallèle et indépendant).

Dans ce modèle, la mémoire épisodique est placée au-dessus des autres systèmes de mémoire. L'encodage des informations se fait en série (du système des représentations perceptives à la mémoire épisodique(189)), le stockage des informations est effectué en parallèle dans les différents systèmes. Le rappel des informations est indépendant, c'est-à-dire que seul le rappel s'effectue dans le système le plus approprié, indépendamment des autres systèmes.

La mémoire de travail

La mémoire de travail se réfère à un système cérébral qui permet un stockage temporaire et une manipulation des informations nécessaires pour des tâches cognitives complexes telles que la compréhension du langage, l'apprentissage et le raisonnement (190). Elle implique le stockage et le traitement simultané des informations (190). La région du cortex préfrontal est connue pour jouer un rôle crucial dans la mémoire de travail (155, 191, 192). Le modèle de mémoire de travail de Baddeley et Hitch (1974) distingue un centre exécutif et deux sous-systèmes dits « esclaves » : la boucle phonologique et le calepin visuospatial (193, 194). Le centre exécutif coordonne et supervise les deux sous-systèmes permettant de stocker et de traiter simultanément des informations (189, 195). Il alloue l'espace de mémoire en fonction des besoins des sous-systèmes en augmentant la mémoire de l'un et diminuant la mémoire de l'autre (193). La boucle phonologique retient les informations verbales entendues ou lues tandis que le calepin visuospatial retient les informations visuospatiales et permet la formation et la manipulation d'images mentales (189, 194). La durée de stockage dans la boucle phonologique est très brève, de l'ordre de deux secondes. Ainsi, pour augmenter la durée de rétention d'une information entendue ou lue, il est nécessaire de la répéter par un mécanisme de récapitulation articulatoire (196). Le calepin visuospatial est moins bien décrit, mais il contiendrait lui aussi un espace de stockage et ferait également intervenir un mécanisme pour récapituler les informations contenues dans l'espace de stockage (196). En 2000, Baddeley a ajouté à son modèle en trois compartiments le buffer épisodique qui est un espace de stockage temporaire (197) capable d'intégrer des informations provenant de différentes sources (189). Une fois la tâche réalisée, l'information est effacée s'il n'y a pas de consolidation. Ainsi, une caractéristique de la mémoire de travail est un stockage de l'information durant un temps court, suivi de son effacement, ce qui nécessite une flexibilité cognitive.

L'anxiété aurait des effets sur la mémoire de travail en affectant le centre exécutif par mobilisation des ressources attentionnelles, augmentant ainsi la charge mentale (198, 199). La personne anxieuse devra traiter à la fois les informations liées à son anxiété en plus des informations pertinentes rencontrées dans son quotidien (142, 200). En effet, une des théories souvent reprise, est qu'il existerait une compétition entre les processus liés à l'anxiété et ceux liés aux tâches. Ainsi, lors des ruminations verbales du sujet anxieux, il se produirait une interférence avec la boucle phonologique (198, 200). De plus, comme il a été décrit plus haut, un stress va induire des effets biochimiques et biologiques afin de préparer l'organisme à lutter ou fuir. Cependant, lorsque le stress devient chronique, ces modifications vont conduire à des perturbations neurochimiques et neurobiologiques affectant le fonctionnement de structures cérébrales, notamment celles impliquées dans la mémoire de travail et l'attention (150, 173).

Afin d'étudier les effets cognitifs et émotionnels propres à l'ypérite, la seconde partie de cette thèse s'attachera à explorer, chez l'animal, l'anxiété et les troubles de la mémoire de travail après exposition à un analogue de l'ypérite, le CEES. Ces résultats permettront ainsi d'étudier les effets d'un agent vésicant après une exposition cutanée, sans le biais induit par le stress de guerre chez l'Homme. En effet, les études décrivant les effets comportementaux de l'ypérite ont été conduites auprès de victimes dont l'exposition au toxique, non quantifiable, a pu être multiple, via plusieurs voies d'exposition (pulmonaire, oculaire, cutanée...), sous forme liquide et/ou vapeurs, dans des conditions thermiques non définies (la chaleur et l'humidité modifiant la volatilité et la pénétration de l'ypérite). A ces variables, s'ajoute le stress de guerre qui est par ailleurs connu comme pouvant induire à lui seul des troubles cognitifs et émotionnels (201-203).

II. OBJECTIFS

II.1. Première partie : effets cutanés

La première partie de cette thèse porte sur les effets cutanés et visait à évaluer la pertinence et les limites du CEES, analogue de l'ypérite. En effet, du fait des restrictions légales d'utilisation de l'ypérite, de nombreux laboratoires se tournent vers cet analogue. Cependant, très peu d'études ont comparé les lésions induites par le CEES avec celles induites par l'ypérite. Après la mise au point d'un modèle d'exposition au CEES, les lésions obtenues avec le CEES d'une part et l'ypérite d'autre part ont été comparées. La finalité de cette partie était l'évaluation de deux molécules à visée thérapeutique agissant sur la Cx-43 afin d'accélérer la cicatrisation cutanée après une exposition au CEES.

Objectif 1 : mise au point des brûlures cutanées au CEES et à l'ypérite

Cet objectif a consisté à mettre au point les modèles d'exposition aux vapeurs saturantes de CEES et d'ypérite afin de créer des lésions cutanées, bien définies, reproductibles et non létales.

Objectif 2 : comparaison des lésions induites par l'ypérite et le CEES, d'un point de macroscopique, histologique et moléculaire

Cet objectif a consisté à comparer les lésions cutanées obtenues avec le CEES et l'ypérite, à partir des modèles et protocoles validés dans l'objectif 1. Cette comparaison avait pour but d'évaluer la pertinence de l'utilisation du CEES comme analogue de l'ypérite.

Objectif 3 : évaluation de l'efficacité de molécules modulatrices des connexines 43 sur les lésions induites par le CEES

Le troisième objectif de la partie cutanée était un objectif à visée thérapeutique. Des molécules candidates agissant sur la Cx-43 ont été appliquées sur des lésions cutanées induites par le CEES dans le but d'accélérer le processus de cicatrisation.

II.2. Seconde partie : effets cérébraux

La seconde partie de cette thèse porte sur les effets cérébraux de l'ypérite. Cette partie trouve son origine dans des publications, principalement iraniennes, décrivant des effets psychiques chez des victimes ayant été exposées à l'ypérite (137). Cependant, il est difficile d'attribuer ces effets à l'ypérite en elle-même, principalement à cause du contexte belliqueux dans lequel se sont inscrites ces expositions. Nous avons donc voulu évaluer en laboratoire les effets cognitifs et émotionnels du CEES et avons recherché la présence de ses adduits cérébraux.

Objectif 1 : évaluation de la réponse émotionnelle et cognitive suite à une exposition cutanée à un agent vésicant

Cet objectif avait pour but d'évaluer, grâce à des tests comportementaux, la réponse émotionnelle et cognitive de souris exposées au CEES par voie cutanée. Cet objectif a été réalisé en collaboration avec l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INICIA, UMR 5287, CNRS - Université de Bordeaux).

Objectif 2 : recherche d'adduits cérébraux du CEES après une exposition cutanée

Ce second objectif de la partie cérébrale a consisté à rechercher la présence d'adduits cérébraux après une exposition cutanée au CEES et à étudier leur persistance. Cet objectif a fait l'objet d'une collaboration avec le Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives (CEA – IRIG/DIESE/SyMMES/CIBEST, UMR 5819 CEA-CNRS-UGA) de Grenoble.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Partie cutanée

Agents vésicants : l'ypérite et le CEES

L'ypérite (HD) a été fournie par DGA maîtrise NRBC (Vert-le-Petit). Cet établissement est le seul habilité en France par l'OIAC à synthétiser « à des fins médicales, pharmaceutiques, de recherche ou de protection » des agents chimiques réglementés inscrits au tableau 1. Les expérimentations ont eu lieu à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) au sein du Laboratoire de Toxicologie du bâtiment confiné, habilité à héberger des recherches avec de l'ypérite. L'ypérite a été utilisée pure.

Du fait de la restriction d'utilisation de l'ypérite, de nombreux laboratoires travaillant sur cet agent sont contraints de la substituer par un de ses analogues (Figure 24) (204, 205). L'ypérite, possède de nombreux analogues plus ou moins proches structurellement. Parmi eux, le CEES (2-chloroéthyle éthyle sulfide) est le plus proche puisqu'il ne diffère de l'ypérite que par un atome de chlore. Il est également appelé « half-mustard » en anglais ou hémimoutarde. Les autres principaux analogues sont représentés sur la Figure 24 ci-dessous (205).

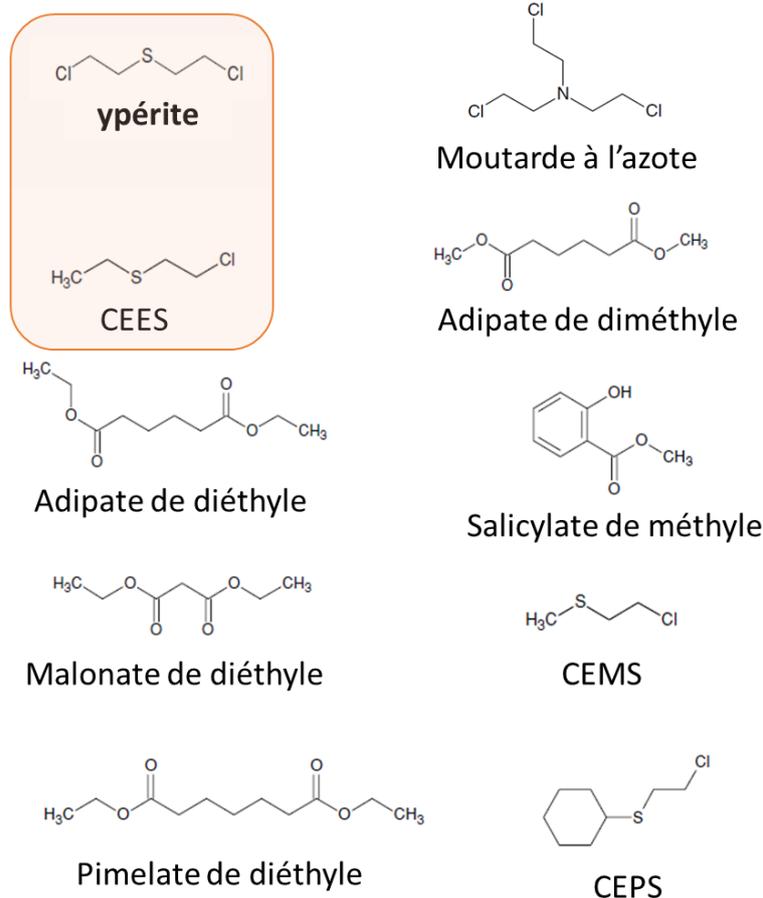


Figure 24 : Analogues de l'ypérite, dont le CEES (2-chloroéthylethylsulfide), structurellement très proche.

Un groupement méthyl remplace un des atomes de chlore de l'ypérite. Adapté de Bartelt-Hunt, et al., 2008 (206)

Le CEES, qui n'est pas inscrit au tableau I de la CIAC, a été acheté chez Sigma Aldrich (référence 242640). Tout comme l'ypérite, le CEES est sous forme liquide et émet des vapeurs à température ambiante. Sa volatilité est de 16 570 mg/m³ à 20 °C (207) tandis que celle de l'ypérite est de 610 mg/m³ à 20 °C (208). Ainsi, il est donc possible de mimer des lésions induites par l'ypérite avec du CEES, à la fois par une exposition liquide et également par une exposition vapeur. Les propriétés physico-chimiques du CEES sont proches de celles de l'ypérite. Le CEES semble donc être l'analogue le plus pertinent de l'ypérite, que ce soit dans le cadre d'études d'adsorption, d'hydrolyse et de biodégradabilité (205).

Cependant, la toxicité du CEES est inférieure à celle de l'HD puisque les Doses Létales 50 (LD50) de l'HD sont de 19,3 mg/kg et 9,7 mg/kg (respectivement voies sous-cutanée et percutanée chez la souris) tandis que pour le CEES, elles sont de 566 mg/kg et 1 425 mg/kg (respectivement voies s.c. et p.c.) (205, 209) (Tableau VII).

*Tableau VII : Comparaison de l'ypérite et du CEES.
DL50 : dose létale 50, s.c. : sous-cutané, p.c. : per cutané, i.p. : intrapéritonéal*

	Formule	Masse molaire (g/mol)	Densité de vapeurs	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur (mm Hg, 25°C)	Solubilité (mg/L, 25°C)	Log K _{ow}	Volatilité (mg/m ³ , 20°C)	DL50 souris (mg/kg)
Ypérite	C ₄ H ₈ Cl ₂ S	150,07	5,4	218	0,11	684	2,41-2,55	610	19,3 (s.c.) 9,7 (p.c.) 4,8 (i.p.)
CEES	C ₄ H ₉ ClS	124,63	4,27	156,5	3,4	1062	2,2	16570	566 (s.c.) 1425 (p.c.) 17,7 (i.p.)

Les mêmes précautions de manipulation ont été prises pour l'ypérite et pour le CEES, à savoir :

- Equipements de Protection Individuels (EPI) : gants butyle, tablier et manchettes Tychem® 6000 F, Appareil Normal de Protection (ANP) avec des cartouches filtrantes A2B2P3 à proximité.
- Equipements de protection collective : manipulation sous hotte chimique, Appareil Portatif de Contrôle de Contamination à 4 Canaux (AP4C) afin de contrôler l'ambiance chimique.

Les consommables ayant été en contact avec le CEES ou l'ypérite ont été neutralisés par trempage durant 7 jours dans de la soude alcoolique (2,86 M de soude) préparée avant les expositions. Tous les instruments manipulés lors de l'exposition (pinces, pipettes...) ont été décontaminés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 2,6 %.

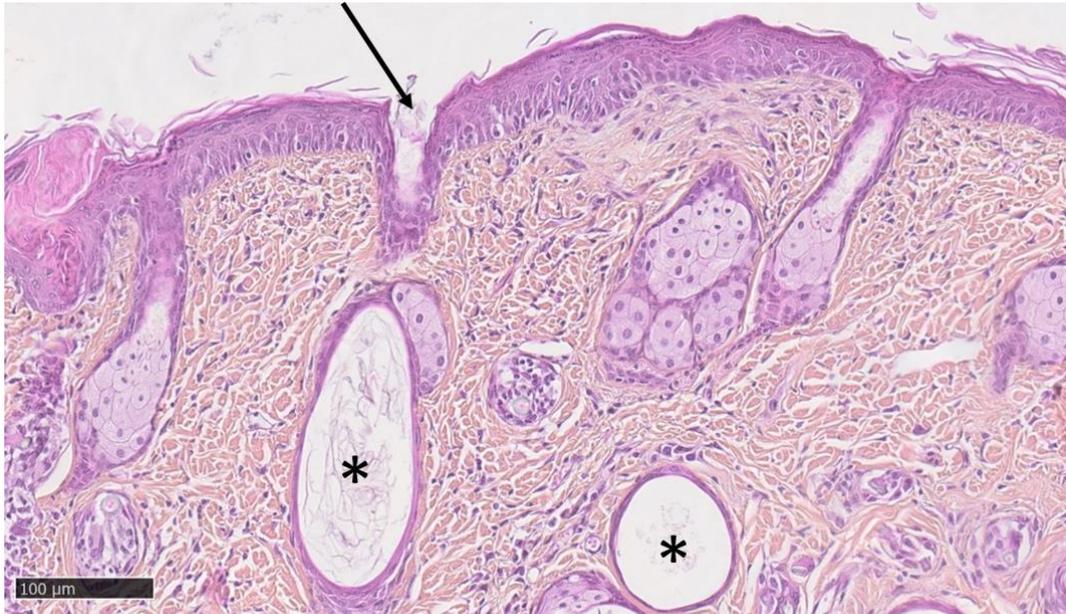
Modèle animal : la souris SKH-1

Comme il a été décrit précédemment, l'ypérite touche de nombreuses cibles cellulaires et moléculaires, rendant notamment la cicatrisation complexe et retardée. Pour étudier l'effet cicatrisant de molécules candidates, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal en l'absence de modèle alternatif pertinent pour étudier la cicatrisation des lésions induites par les vésicants. Le modèle animal choisi est la souris sans poils SKH-1 provenant de Charles River© (Crl:SKH1Hr^{hr}, fonds génétique albinos (210)) (Figure 25).



Figure 25 : Souris SKH-1 (Charles River©)

Cette souche, non consanguine, a l'avantage d'être sans poils tout en étant immunocompétente. Il n'est ainsi pas nécessaire de la raser ou d'appliquer une crème dépilatoire évitant ainsi de créer des microlésions ou des brûlures chimiques. Ce modèle a de plus l'avantage d'être documenté et classiquement utilisé pour étudier les effets cutanés des lésions à l'ypérite ainsi que pour les recherches dermatologiques plus générales (211, 212). Cependant, la peau de la souris SKH-1 est plus fine que celle de l'Homme et possède des annexes différentes telles que les utricules et les kystes dermiques (211) (Figure 26).



*Figure 26 : Coupe histologique de peau de souris SKH-1.
Coloration Hémalun, Phloxine, Safran (HPS), objectif x20 : astérisques : kystes dermiques, flèche
noire : utricule connecté à la surface de la peau*

L'épaisseur de la peau de la souris SKH-1 est de $22 \pm 2 \mu\text{m}$ pour l'épiderme et de $140 \pm 10 \mu\text{m}$ pour le derme (chez des femelles) (213). L'épaisseur de l'épiderme est identique entre les mâles et les femelles, tandis que le derme est plus épais chez le mâle et l'hypoderme plus mince que chez la femelle (211). Pour cette thèse, seules des souris mâles ont été utilisées pour avoir une homogénéité des coupes de peau et s'affranchir des fluctuations hormonales.

Les souris SKH-1 ont été reçues à un âge de 5 semaines, puis utilisées après une semaine de quarantaine et de stabulation. Les animaux ont été hébergés par 4 en cages collectives jusqu'au jour de l'exposition. Après exposition, les souris ont été placées en cages individuelles jusqu'à la fin de la procédure afin de réduire le risque de lésions cutanées par griffures et morsures entre congénères. Un cycle éclairage/obscurité de 12 h a été mis en place (éclairage de 7 h - 19 h) avec une température comprise entre 20 et 21 °C.

En fin de procédure, les souris ont été euthanasiées par une injection de pentobarbital (Doléthal®) à 150 mg/kg en i.p. suivie d'une dislocation cervicale. Des prélèvements de peau, de sang et du cerveau ont ensuite été réalisés.

Suivi des animaux

Suivi macroscopique

Afin de suivre l'évolution de la lésion et sa cicatrisation, de nombreux paramètres cutanés ont été évalués quotidiennement. Pour cela, l'unité Vésicants s'est dotée d'un plateau technique d'ingénierie cutanée permettant de mesurer de nombreux paramètres de façon non invasive. Toutes ces mesures ont été effectuées sur l'animal anesthésié par voie gazeuse (isoflurane dans l'air médical). L'anesthésie est induite dans une boîte (isoflurane à 4-5 %, débit 2 L/min) puis l'anesthésie est maintenue au masque après réduction de la concentration d'isoflurane et du débit gazeux (isoflurane 2-2,5 %, débit 0,2 L/min). L'appareil d'anesthésie utilisé était le modèle miniHUB V3 de Temsega® (Figure 27). Durant toute l'anesthésie, les souris ont été placées sur un plateau chauffant pour prévenir l'hypothermie engendrée par l'anesthésie.



Figure 27 : Poste d'anesthésie gazeuse MiniHUB V3 de Temsega®.

Surface des lésions

Le premier paramètre mesuré était la surface des lésions afin de comparer leur taille. Dans ce but, les lésions ont été photographiées quotidiennement à l'aide d'un appareil photo Nikon® D40X avec un objectif Sigma© 17-70 mmf/2,8-4 DC Macro. Grâce à un système de fixation de l'appareil réalisé sur mesure dans les ateliers de l'IRBA, la distance entre l'objectif et l'animal restait constante (Figure 28). De plus, des étiquettes portant l'identifiant de l'animal, la date, ainsi qu'un repère de 2 cm étaient placées à côté de chaque animal afin de calibrer l'échelle de mesure pour le calcul des surfaces de lésions. Plusieurs éclairages étaient positionnés autour de l'animal afin d'illuminer les lésions de façon homogène. Les photographies ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ImageJ afin de calculer la surface des lésions. Pour cela, l'échelle de mesure a été calibrée puis l'image a été séparée selon les canaux Red Green et Blue. Seule l'image dans le canal Blue est analysée. Le seuil (threshold) est ensuite ajusté afin de mettre en surbrillance les zones lésées. Les surfaces de ces zones sont ensuite calculées.



Figure 28 : Dispositif de prise de vue des lésions cutanées sur souris anesthésiées

Perte insensible en eau (PIE)

Nous avons mesuré la perte insensible en eau c'est-à-dire l'évaporation de l'eau à travers la peau, exprimée en $\text{g/m}^2\text{h}$. Ce paramètre reflète la fonction barrière de la peau, paramètre important de la cicatrisation (214). Il existe deux catégories d'appareils pour mesurer la PIE : les appareils à chambre ouverte (Monaderm® - Tewameter) et ceux à chambre fermée (Delfin technologies® - Vapometer) (215). L'avantage des systèmes à chambre fermée tel que le Vapometer est de fournir des mesures non perturbées par le flux d'air ambiant. Dans les laboratoires de l'IRBA, les flux d'air générés par les ventilations étaient importants et perturbaient les mesures réalisées avec le Tewameter. Nous nous sommes donc équipés du Vapometer pour réaliser cette thèse (Figure 29). L'appareil est muni d'un adaptateur de 4,5 mm de diamètre afin de ne recouvrir que la zone exposée. Le Vapometer est posé à la surface de la zone cutanée à mesurer, et enregistre l'augmentation de l'humidité relative dans la chambre de mesure par comparaison avec l'humidité ambiante. La mesure est obtenue au bout d'une période de quelques secondes. Toutes nos mesures ont été effectuées dans une même salle d'expérimentation, à un endroit défini et constant. Les paramètres d'hygrométrie de la salle d'hébergement ont été relevés quotidiennement.



*Figure 29 : Vapometer (Delfin Technologies®).
Appareil permettant de mesurer la perte insensible en eau.*

Hydratation cutanée (HC)

L'hydratation cutanée (HC) a été mesurée à l'aide du MoistureMeterD (Delfin technologies®) (Figure 30). Cet appareil mesure la constante diélectrique de la peau et des tissus sous-cutanés de manière non-invasive, en appliquant la sonde sur la peau de l'animal. Le résultat s'affiche sur l'écran au bout de quelques secondes. La constante diélectrique de la peau est proportionnelle à son taux d'hydratation. Ainsi, plus la valeur est élevée, plus le tissu contient de l'eau. À l'inverse, une valeur faible signera une déshydratation. Plusieurs sondes existent en fonction de l'épaisseur de la peau à mesurer (216). Nous avons opté pour la sonde de 10 mm de diamètre permettant de mesurer l'hydratation jusqu'à 500 μm de profondeur, qui est ainsi adaptée à l'épaisseur de la peau des souris. En effet, nos mesures ont montré que l'épaisseur moyenne de la peau des souris SKH-1 (de l'épiderme jusqu'à la partie dorsale de la couche musculaire) était comprise entre 550 et 650 μm .



Figure 30 : MoistureMeterD (Delfin technologies®) équipé de la sonde permettant de mesurer l'hydratation cutanée chez la souris.

Couleur de la peau

La couleur de la peau a été mesurée par l'appareil SkinColorCatch (Delfin technologies®) (Figure 31). Celui-ci permet de mesurer en quelques secondes plusieurs paramètres tels que les valeurs RGB (Red, Green, Blue), le taux de mélanine, l'Individual Typology Angle (ITA) qui classifie la teinte de la peau entre -90° et $+90^\circ$. L'ITA est calculé à partir de la clarté de la zone allant du noir au blanc (de 0 à 100) et de la couleur allant du bleu au jaune (- 128 à + 127). Plus la peau est claire, plus l'ITA est élevé et inversement (

Tableau VIII). Les souris de notre étude avaient toutes le même phototype (couleur de peau), leur ITA initial était donc identique. Ainsi, lorsque la souris présente une lésion, la valeur de l'ITA est basse. Plus la croûte à la surface de la lésion est foncée, plus l'ITA diminue. Cette mesure permet également d'apprécier la qualité de la cicatrisation en termes de pigmentation (si la peau retrouve sa coloration initiale). En effet, cette mesure est intéressante dans le cadre des lésions induites par l'ypérite qui laissent souvent des séquelles de type dyspigmentation (hypo ou hyper). La surface de la zone mesurée avec cet appareil est de 0,3 cm².



*Figure 31 : Skin Color Catcher (Delfin Technologies®).
Appareil permettant d'estimer la couleur de la peau grâce à la mesure de l'Individual Typology Angle (ITA).*

Tableau VIII : Classification de la teinte de la peau en fonction du degré ITA (selon la notice de Delfin Technologies®)

ITA (°)	Classification de la teinte de la peau
55 – 90	Très claire
41 – 54	Claire
28 – 40	Intermédiaire
10 – 27	Bronzée
-30 – 9	Marron
-90 – -29	Foncée

Score combiné lésionnel

Afin de compiler les différents paramètres de cicatrisation mesurés lors du suivi macroscopique (surface de la lésion, ITA, PIE et hydratation cutanée), un score a été établi. Ce score est composé de ces différentes valeurs, toutes normalisées entre 0 et 100, afin que les paramètres aient la même incidence sur le score final. L'expression du score combiné lésionnel est la suivante :

$$\text{Score combiné lésionnel} = (S + PIE) - (HC + ITA)$$

D'après la formule ci-dessus, plus la surface de la lésion (S) et la perte insensible en eau (PIE) sont faibles, plus le score lésionnel sera bas, traduisant une lésion en voie de cicatrisation. Au contraire, plus l'ITA et le taux d'hydratation diminuent, plus le score combiné lésionnel sera élevé et la peau sera lésée.

Ce score, exprimé en pourcentage, permet ainsi de quantifier la lésion en prenant en compte les paramètres cutanés mesurés de façon non invasive.

Analyses histologiques

Prélèvement de biopsies

Lors du sacrifice des animaux, un repère est tracé au niveau de la nuque de l'animal puis la peau du dos est découpée et déposée sur un plateau en inox désinfecté entre chaque prélèvement (Figure 32). Des biopsies de peau des zones exposées et témoins sont ensuite prélevées à l'aide de punchs stériles de 8 mm de diamètre. Les biopsies de peau sont ensuite placées sur un morceau de polystyrène et maintenues à l'aide d'aiguilles. Les biopsies sont immergées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) (Cliniscience ref : AR1068PFA) pendant 24 h, puis transférées dans du PBS 1X pendant 24 à 48 h. Elles sont ensuite placées dans des cassettes d'inclusion puis disposées dans les paniers de l'automate Excelsior AS (MM® France) afin de les déshydrater sous vide. Sur la table d'inclusion, de la paraffine liquide est ensuite coulée sur les biopsies orientées selon le plan de coupe souhaité. En refroidissant, la paraffine durcit et forme un bloc contenant la biopsie.



Figure 32 : Schéma de prélèvement de biopsies cutanées.

Préparation des lames et coloration

Les blocs de paraffine sont ensuite taillés puis coupés au microtome Leica® Multicut R afin d'obtenir des coupes de 5 µm, posées sur des lames SuperFrost® Plus Gold (réf : 045795). Une coloration Hémalum, Phloxine, Safran (HPS) est ensuite réalisée à l'aide de l'automate Leica® ST5020, puis après des bains successifs d'éthanol et de xylène pour déshydrater les coupes, les lames sont montées avec de l'Eukitt®. Les lames ont ensuite été scannées et analysées à l'aide du scanner de lames NanoZommer (Hamamatsu®) et du logiciel NDP view®. La coloration HPS permet de colorer les noyaux par l'hémalum (tons violets), le cytoplasme par la phloxine (tons roses), et le collagène par le safran (tons orangés). Les coupes représentées dans les résultats ont été observées avec un objectif x10.

Immunomarquage de la connexine 43

Le protocole d'immunomarquage est détaillé en Annexe I.

Brièvement, les lames sont tout d'abord déparaffinées par passages successifs dans plusieurs bains : xylène, éthanol 100 %, éthanol 95 %, eau. Un démasquage des sites antigéniques est ensuite réalisé en autocuiseur dans une solution de citrate pH6. Ce démasquage est nécessaire pour la fixation ultérieure des anticorps. En effet, la fixation des biopsies de peau au PFA a créé des liaisons covalentes entre les protéines qui empêchent la fixation des anticorps. Après le démasquage, une perméabilisation des cellules est réalisée au Triton 0,1 %. Cette étape permet aux anticorps d'accéder aux épitopes intracytoplasmiques. Les sites non spécifiques sont ensuite saturés avec de l'Emerald (ref 936B-08 Cell marque) avant l'incubation avec l'anticorps primaire dilué dans de l'Emerald (ref 936B-08 de Cell marque®). Afin de visualiser l'expression de la connexine 43 dans les coupes de peau, l'anticorps primaire utilisé avait pour cible la connexine 43 (ref ab117843, Abcam). Il s'agit d'un anticorps polyclonal produit chez le lapin réagissant avec la souris. L'incubation avec l'anticorps dure toute une nuit. Un contrôle négatif est systématiquement réalisé sur chaque lame avec de l'Emerald seul. Ce contrôle permettra de visualiser le bruit de fond du marquage.

La peroxydase endogène est ensuite bloquée par de l'eau oxygénée avant incubation avec l'anticorps secondaire, ImmPress® HRP antiRabbit IgG polymer detection kit (ref MP-7451, Vector). Cet anticorps, issu de la chèvre, est couplé à l'HRP (horseradish peroxidase), enzyme peroxydase du raifort. La DAB, ou 3,3'-Diaminobenzidine (ref SK-4100, Vector), est le substrat de la peroxydase. Son ajout permet ainsi le marquage des sites d'intérêt. Avant la déshydratation puis le montage des lames, une contre-coloration à l'hémalun permet de marquer les noyaux.

Analyses en biologie moléculaire

Prélèvement des biopsies

En vue de la réalisation des analyses de biologie moléculaire, des biopsies de peau des zones exposées et témoins sont prélevées à l'aide de punchs stériles de 8 mm de diamètre. Les biopsies sont ensuite coupées à l'aide d'un bistouri stérile en quatre morceaux puis plongées dans du RNAlater™ (ref AM7021 Thermofisher scientific®) afin de préserver les ARN. Les biopsies sont conservées 24 h à 4 °C puis stockées à -20 °C dans l'attente de l'extraction des ARN.

Broyage et extraction

Le kit d'extraction utilisé est le RNeasy® Plus Universal Mini Kit de Qiagen© (référence 73404). Ce kit permet d'extraire les ARN totaux à partir des tissus riches en lipides grâce à une lyse par du phénol/sels de guanidine suivie d'une purification sur membrane (Annexe II). Les biopsies sont broyées au moyen de l'homogénéisateur à billes Omni© Bead Ruptor. Dans ce but, les biopsies sont transférées dans tubes de 2 mL renforcés (exemptes de DNase et de RNase) et pré-remplis de billes en céramique de 2,8 mm de diamètre (réf 078106 Dustcher) et de tampon de lyse (Qiazol©). Un programme de 2 fois 20 secondes séparées d'une pause de

40 secondes à 7 m/s est lancé. Du chloroforme est ensuite ajouté à l'homogénat obtenu afin de séparer les ARN de l'ADN, des protéines et des débris cellulaires à l'aide d'une centrifugation. Deux phases, aqueuse et organique, sont ainsi obtenues. Les ARN se trouvent dans la phase supérieure, aqueuse ; les ADN à l'interphase ; les protéines et les débris cellulaires dans la phase organique inférieure. Les ARN sont ensuite récupérés, puis de l'éthanol est ajouté pour obtenir les conditions optimales de liaison de l'ARN sur la membrane filtrante des colonnes. Après différents rinçages, permettant l'élimination du phénol et de tout autre contaminant, les molécules d'ARN sont éluées par ajout d'eau exempte de RNase. Les ARN extraits sont ensuite dosés au Nanodrop One (ThermoFisher®) par mesure de la densité optique (DO) afin de quantifier la quantité extraite et de vérifier l'absence de contamination. En effet, le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} permet de déterminer l'absence de contamination par des protéines puisque les acides nucléiques absorbent à 260 nm tandis que les protéines à 280 nm. Le rapport DO_{260nm}/DO_{230nm} permet de mettre en avant une contamination par des composés organiques qui absorbent à 230 nm. Ces rapports doivent être compris entre 2 et 2,2 pour que l'échantillon soit considéré comme pur.

La qualité des ARN est vérifiée par l'Agilent RNA tapestation® en utilisant le kit Agilent RNA 6000 Nano Kit (ref 5067-1511). Cet appareil sépare les ARN par électrophorèse sur des micropuces puis détecte leur fluorescence induite par un laser. Le logiciel de l'appareil génère automatiquement le rapport ribosomal 18S sur 28S et calcule le RNA Integrity Number (RIN) permettant d'évaluer le degré de dégradation des échantillons. Un RIN de 10 signifie que les ARN ne sont pas dégradés (Tableau IX). Seuls les échantillons présentant des RIN supérieurs à 5 ont été utilisés.

Tableau IX : Evaluation de la qualité des ARN selon leur RIN

RIN	Qualité	Utilisation ?
>7	Bonne	oui
5-7	Moyenne	oui
<5	Mauvaise	non

RT-qPCR

Afin d'évaluer l'expression des gènes d'intérêt, nous avons réalisé des RT-qPCR (Reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction). Cette technique nous permet de quantifier les ARNm de gènes d'intérêt contenus dans nos échantillons. Une étape de transcription inverse est tout d'abord nécessaire afin de rétrotranscrire les ARNm en ADNc (Annexe III). Pour cela, nous avons utilisé le kit Rt² First Strand Kit de Qiagen® (330401). Brièvement, les ARN sont dilués dans l'eau « RNase free » pour obtenir une quantité d'ARN constante (0,5 µg) puis le « genomic DNA elimination mix » est ajouté. Les échantillons sont incubés 5 minutes à 42 °C puis placés sur glace pendant au moins 1 minute. Un « reverse-transcription mix » contenant une transcriptase inverse est préparé. 10 µL de ce mélange sont ajoutés aux échantillons précédents. Une incubation à 42 °C pendant 15 minutes permet l'activation de l'enzyme puis la réaction est stoppée par une incubation à 95 °C pendant 5 minutes. De l'eau « RNase free » est ajoutée puis les échantillons sont congelés à -20 °C dans l'attente de l'étape de PCR.

Les gènes d'intérêt portaient sur l'inflammation, le remodelage cutané et les connexines. Les gènes étudiés ainsi que les gènes de référence (HG pour "housekeeping genes") utilisés étaient (Tableau X) :

Tableau X : Liste des gènes étudiés et des gènes de référence (Housekeeping Genes ou H)

Nom	Description		Code
Mmp1a	Matrix metallopeptidase 1a (interstitial collagenase)	Remodelage cutané	NM_032006
Mmp9	Matrix metallopeptidase 9		NM_013599
Gja1	Gap junction protein, alpha 1	Connexines 43, 26 et 30	NM_010288
Gjb2	Gap junction protein, beta 2		NM_008125
Gjb6	Gap junction protein, beta 6		NM_008128
Tnfa	Tumor necrosis factor alpha	Inflammation	NM_013693
Il6	Interleukin 6		NM_001314054
Il1b	Interleukin 1 beta		NM_008361
Krt1	Keratin 1	Kératine	NM_008473
Cdc73	Cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	HG	NM_145991
Rplp0	Ribosomal protein, large, P0		NM_007475
Ccna2	Cyclin A2		NM_009828

La PCR en temps réel a été réalisée sur des plaques 384 puits pré-revêtues des amorces des gènes d'intérêt et la lecture effectuée sur des LightCycler® 480 de Roche® (LC480) (Annexe IV). Brièvement l'eau de grade PCR a été ajouté au mélange enzymatique du kit RT² SYBR® Green qPCR Master Mix (ref 330509, Qiagen) contenant la Taq DNA Polymérase, les nucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et le fluorophore SYBR Green qui se fixe sur l'ADN. Les échantillons d'ADNc sont ensuite distribués selon le plan de plaque défini. Le complexe ADN double brin/SYBR Green absorbe la lumière bleue ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) et émet de la lumière verte ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Ainsi, la fluorescence émise permet de déterminer la quantité d'ADN présente. Toutes les manipulations sont réalisées sur glace et à l'abri de la lumière puisque l'enzyme est photosensible. Les plaques sont scellées puis centrifugées rapidement avant d'être placées dans le lecteur LC480. Le programme avec les paramètres définis de dénaturation, d'amplification, de fusion et de refroidissement a ensuite été lancé. Le LC480 mesure la fluorescence émise à chaque cycle, permettant ainsi d'obtenir les cycles de sorties (Ct pour cycle threshold). Ces Ct correspondent au croisement de la courbe PCR avec le seuil. Un Ct élevé signifie donc un nombre de cycles important pour détecter une fluorescence, et donc une quantité faible d'ARNm. Nous avons considéré que les Ct supérieurs à 35 ne seraient pas pris en compte. Des contrôles internes ont été réalisés afin de s'assurer du bon déroulement de la PCR, à la fois au sein d'une même plaque mais également entre les plaques puisqu'il ne devait pas y avoir plus de deux cycles d'écart entre les contrôles positifs de chaque plaque. Les delta Ct (ΔCt) ont été calculés ($\text{Ct}_{\text{gène d'intérêt}} - \text{Ct}_{\text{moyen des HG}}$) après analyse avec le logiciel geNorm® pour déterminer quels HG étaient les plus stables et allaient être utilisés pour la normalisation. Les HG retenus étaient Cdc73 et Rplp0 pour le calcul de leur moyenne géométrique. Ensuite le Delta Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{exp}} - \Delta\text{Ct}_{\text{contrôle}}$) puis le Fold Change (FC, également appelé RQ pour Relative Quantification) ont été calculés par rapport au groupe contrôle : $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Ainsi, si le FC est supérieur à 1, alors le gène est régulé positivement, tandis que si le FC est inférieur à 1, alors le gène est régulé négativement.

Molécules thérapeutiques

Pour le troisième objectif de la partie cutanée, deux molécules ont été testées : le peptide ACT1 et un ASODN de la connexine-43 afin de la réguler négativement. Les molécules ont été appliquées à T+4h (immédiatement après la décontamination) puis à J1, J2 et J3. Selon les groupes expérimentaux, les souris ont été sacrifiées à J1, J3, J7 et J14 post-exposition afin de réaliser des biopsies cutanées.

Oligonucléotide antisens de la connexine 43

La séquence utilisée est l'ID numéro 2 : GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC dont la séquence correspond à 100 % avec le génome de la souris pour le gène de la connexine 43 (GJA1) d'après le logiciel Blast©. Cet antisens de 9 649 g/mol a été obtenu chez Sigma©. L'aliquot reçu a été centrifugé puis remis en suspension dans du tampon Tris-EDTA (TE Buffer) pour obtenir une solution à une concentration de 100 µM, conservée à -20 °C. Cette solution a été dosée au Nanodrop® afin de vérifier la concentration obtenue. Cette solution mère a ensuite été diluée extemporanément à 20 µM dans du gel pluronic© F-127 avant l'application sur les lésions. 40 µL ont ensuite été appliqués sur les zones exposées à l'aide d'une pipette dont les cônes ont été maintenus sur glace afin de maintenir la solution sous forme liquide.

Peptide ACT1

La séquence du peptide ACT1 utilisée était RQPKIWFPNRRKPWKKRPRPDDLEI. Cette séquence correspond à la partie C-terminale de la connexine 43 (RPRPDDLEI) associée à une séquence d'internalisation antennapedia RQPKIWFPNRRKPWKK. Cette séquence issue de *Drosophila antennapedia* est responsable de l'internalisation cellulaire. Elle est capable de traverser la membrane plasmique et peut ainsi atteindre le cytosol et le noyau (217). Ce peptide de 3 257 Da a été synthétisé à la demande par Sigma©. Le peptide a été centrifugé

puis remis en suspension dans du TE Buffer à 10,3 mM et stocké à – 20 °C. Puis les jours d'application du traitement, le peptide a été dilué extemporanément dans du gel Pluronic© F-127 à 200 µM. 40 µL ont ensuite été appliqués sur les zones exposées à l'aide d'une pipette dont les cônes ont été maintenus sur glace afin de maintenir la solution sous forme liquide.

III.2. Partie cérébrale

Agent vésicant : le CEES

Cette étude a été menée au sein du laboratoire INCIA (UMR CNRS 5287 – Université de Bordeaux ; Dr Béracochéa). Les expérimentations ayant eu lieu dans les laboratoires de l'INCIA, nous ne pouvions donc pas utiliser d'ypérite pour des raisons réglementaires. Nous nous sommes donc tournés vers le CEES, analogue de l'ypérite dont l'utilisation n'est pas réglementée par l'OIAC. Il est ainsi possible de se le procurer auprès de fournisseurs de produits chimiques classiques tel que Sigma Aldrich (réf : 242640), et peut être manipulé dans des laboratoires standards sous réserve d'utiliser les équipements de protection individuels (EPI) et collectifs adéquats.

Modèle animal : souris C57/Bl6 et SKH-1

Objectif 1 : Pour l'étude comportementale, le modèle utilisé était la souris mâle consanguine C57/Bl6J. En effet, aucun modèle alternatif ne permettait d'étudier les effets cognitifs de l'agent vésicant. Le profil cognitif et émotionnel de cette souche de souris est particulièrement bien documenté (218-220). En particulier, le laboratoire INCIA, collaborateur de cette étude, possède une grande expérience sur cette souche (176, 218, 221-224). Les souris C57/Bl6J, fournies par Janvier, étaient âgées de 4 mois au moment des tests. Les animaux ont été hébergés dans une pièce de stabulation maintenue à une température constante de 22 °C ± 1 °C). Un cycle jour-nuit de 12 h (lumière 8 h – 20 h) a été mis en place. Les animaux ont été hébergés en cages collectives dès leur arrivée à l'animalerie, puis placés en cages individuelles 10 jours avant leur exposition. Cet isolement est une condition nécessaire pour assurer la fiabilité des tests comportementaux qui pourraient être biaisés par des phénomènes d'interaction sociale. Les animaux ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum* durant toute la durée de l'étude.

Objectif 2 : Cet objectif a été réalisé en collaboration avec le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Grenoble. Pour la recherche d'adduits cérébraux du CEES, le modèle animal utilisé était la souris SKH-1 mâle, comme pour les études cutanées décrites dans cette thèse. En effet, dans le cadre de l'étude sur la diffusion du CEES, cette souche est plus pertinente puisque ce modèle sans poils permet de réaliser l'exposition sans nécessité de raser ou de dépiler les animaux. De plus, dans un souci de raffinement et de réduction du nombre d'animaux, les souris utilisées pour la recherche d'adduits cérébraux étaient des souris ayant participé à l'étude cutanée. Les souris SKH-1, fournies par Charles River, ont été reçues à l'âge de 6 semaines puis utilisées après une semaine de quarantaine et de stabulation. Les souris ont été hébergées en cages collectives, par 4, jusqu'au jour de l'exposition. Après exposition, les souris ont été placées en cages individuelles jusqu'à la fin de la procédure afin de réduire le risque de lésions cutanées par griffures et morsures entre congénères. Un cycle éclairage/obscurité de 12 h a été mis en place (éclairage de 7 h - 19 h) avec une température de la pièce comprise entre 20 et 21 °C. Les animaux ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum* durant toute la durée de l'étude.

Protocoles d'exposition

Objectif 1 : L'exposition des souris de cet objectif a été réalisée au sein des locaux de l'INCIA. Celles-ci ont été rasées sur le haut du dos sur une surface d'environ 9 cm² puis exposées au CEES sous hotte et sous anesthésie fixe par un mélange de kétamine et xylazine (Imalgène® 100 mg/kg et Rompun® 10 mg/kg respectivement). Un groupe de souris rasées non-exposées a servi de contrôles, tandis que 3 groupes d'exposition ont été réalisés par dépôt sur la zone rasée de 10 µL soit de CEES pur, soit de CEES dilué dans de l'acétone (4 mg de CEES dans 200 µL d'acétone) pour favoriser la pénétration du CEES, soit d'acide chlorhydrique (20 % v/v) afin de constituer un groupe de souris comparatif « brûlure chimique ». En effet, afin d'étudier spécifiquement l'effet de l'agent vésicant et non l'effet brûlure, nous avons ajouté un groupe comparatif de brûlure chimique HCl afin que la

performance aux tests ne soit pas biaisée par la gêne ou la douleur ressentie sur la zone lésée. L'exposition se faisant par voie liquide, une décontamination des animaux à l'hypochlorite de sodium (5 %) a été choisie afin de permettre leur manipulation sans risque par la suite. Cette décontamination a été effectuée 1,5 h (souris CEES pur) ou 2,5 h après exposition (groupes CEES dilué et acide chlorhydrique). Ce délai différent est dû à un aléa expérimental. Les souris ont ensuite été remises en stabulation pendant quelques jours afin de leur permettre de se remettre du protocole d'exposition. Les tests ont ensuite eu lieu à J3, J4 et J5. En fin de procédure, les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale.

Objectif 2 : Au sein de l'IRBA, les souris de l'étude de recherche d'adduits cérébraux du CEES ont été exposées et sacrifiées selon le protocole mis au point dans la partie cutanée (exposition aux vapeurs de CEES). Ce protocole est décrit dans l'objectif 1 de la partie cutanée.

Prélèvements et analyses des échantillons cérébraux

En fin de procédure, à J1, J3, J7 ou J14, les souris SKH-1 de l'étude de recherche d'adduits du CEES ont été sacrifiées puis leurs cerveaux ont été prélevés intégralement (du cervelet jusqu'aux lobes frontaux) puis congelés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Les cerveaux ont ensuite été transmis au Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives (CEA de Grenoble) afin qu'ils puissent être analysés. Le détail des protocoles de broyage et d'extraction de l'ADN figure dans la publication de Gilardoni et al., en Annexe IX. Brièvement, afin d'extraire l'ADN cérébral, la moitié de chaque cerveau a tout d'abord été broyée dans un tampon, puis l'ADN a été extrait des noyaux à l'aide d'un autre un tampon. L'ADN a ensuite été hydrolysé en deux étapes impliquant chacune un cocktail enzymatique. A la fin de ces étapes, une dépurination des adduits à l'ADN a été réalisée en chauffant les échantillons à 90 °C pendant 20 minutes. Les bases normales ont été quantifiées par un détecteur UV placé en amont du spectromètre de masse. Les adduits à l'ADN (N7Gua-CEES) ont été quantifiés par spectrométrie de masse (66).

Un quart des cerveaux a été homogénéisé dans un mélange de chloroforme et de méthanol puis d'eau afin d'extraire les métabolites du CEES. Les surnageants contenant les métabolites polaires d'intérêt ont été recueillis : cystéine-CEES (Cys-CEES), glutathion-CEES (GSH-CEES) et N-acétylcystéine-CEES (NAC-CEES). Ces métabolites ont ensuite été analysés et quantifiés par chromatographie liquide à ultra haute performance associée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) avec une extraction sur phase solide en ligne (on-line SPE).

Tests comportementaux

De nombreux troubles psychiques, dont l'anxiété et des troubles mnésiques, ont été décrits chez les victimes exposées à l'ypérite (137, 139). Pour cette thèse, nous avons donc cherché à évaluer dans un premier temps l'anxiété et la mémoire de travail, grâce à trois tests comportementaux, mettant en jeu plusieurs structures cérébrales, notamment l'amygdale, l'hippocampe, le thalamus et le cortex frontal et préfrontal.

Labyrinthe en croix surélevé

A J3 post-exposition, le test du labyrinthe en croix surélevé été mis en œuvre (225-227). Comme son nom l'indique, ce test forme une croix surélevée par rapport au niveau du sol, composée de deux bras ouverts aversifs et deux bras fermés dans lesquels la souris peut se cacher (Figure 33). Les souris ont une aversion naturelle pour les espaces ouverts et surélevés tels que les bras ouverts du labyrinthe (228). Le comportement phylogénétique d'exploration de la souris dans les bras ouverts est contrebalancé par le caractère sécuritaire des bras fermés. Ainsi, plus les souris sont anxieuses, plus elles seront enclines à passer du temps dans les bras fermés et exploreront donc moins les bras ouverts. Ce test est largement utilisé afin de mettre en évidence les propriétés anxiolytiques de molécules candidates (229).

Les souris sont tout d'abord déposées au centre du labyrinthe, puis elles sont laissées libres d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes. Durant ces 5 minutes, le temps passé dans les bras ouverts est mesuré ainsi que les nombres d'entrées dans les bras ouverts et fermés.

L'état anxieux de l'animal peut être estimé par le calcul des rapports de temps et d'entrées selon les formules suivantes :

$$\text{Rapport de temps} = \frac{\text{temps passé dans les bras ouverts}}{\text{temps total}} \times 100$$

$$\text{Rapport d'entrées} = \frac{\text{nombre d'entrées dans les bras ouverts}}{\text{nombre total d'entrées}} \times 100$$

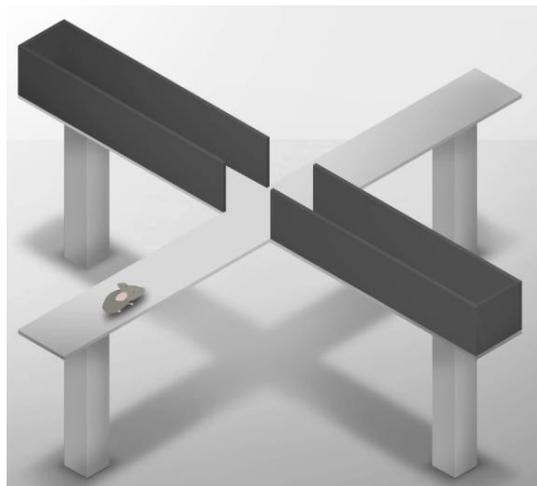


Figure 33 : Test du labyrinthe en croix surélevé constitué de 2 bras ouverts et de 2 bras fermés. Les rapports d'entrées et de temps passés dans les bras ouverts sont calculés afin d'estimer le statut anxieux de l'animal. Image issue de la vidéo de Maze Engineers (230)

Open-field

Le test de l'open-field a été mis en œuvre à J4 post-exposition (231). Ce test est constitué par une enceinte circulaire de 100 cm de diamètre entourée d'une paroi de 10 cm de hauteur (Figure 34). Des sections sont tracées sur le sol de l'enceinte afin de délimiter des zones. Les souris sont tout d'abord placées dans un tube opaque pendant 30 secondes (permettant un départ aléatoire) au centre de l'enceinte, puis sont laissées libres d'explorer durant 5 minutes. La zone centrale de l'enceinte est plus aversive que la périphérie. En effet, la périphérie, moins éclairée et protégée par des parois, est plus sécurisante pour les souris. Plus une souris est anxieuse, plus elle restera en périphérie, proche de la paroi et moins elle cherchera à se déplacer vers le centre de l'enceinte. Ainsi, la réduction de son activité d'exploration sera en conflit avec son comportement phylogénique. Le nombre de sections traversées pendant 5 minutes est mesuré, ainsi que le temps mis pour aller du centre vers la périphérie et de la périphérie vers le centre. Ces mesures permettent ainsi de quantifier le statut anxieux et l'activité locomotrice des souris.

Le test de l'open-field est complémentaire du test du labyrinthe en croix surélevé décrit plus haut, puisqu'il permet de plus la quantification de l'activité locomotrice de la souris par vidéo-tracking. Pour cette étude nous n'avons pas utilisé le système de video-tracking. Cependant, il est possible, grâce à ce test, d'évaluer l'impact des brûlures chimiques provoquées par le CEES et par l'acide chlorhydrique vs témoins non brûlés sur l'activité locomotrice des souris.

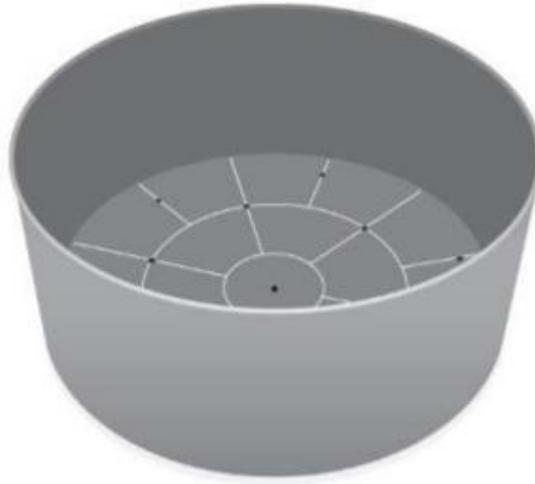


Figure 34 : Open-field. Le plancher de l'enceinte circulaire est divisé en sections. Le nombre de sections traversées en 5 minutes ainsi que les temps mis par la souris pour aller du centre vers la périphérie et de la périphérie vers le centre sont mesurés. Illustration issue de Khoomsab et al., 2019 (232)

Labyrinthe en T

Le test du labyrinthe en T a pour but d'évaluer la mémoire de travail des souris. Le dispositif est formé de deux bras perpendiculaires en forme de T (233). Les souris sont placées dans le compartiment de départ situé à la base du T puis laissées libres d'explorer le dispositif. Spontanément, les souris alternent entre les bras d'arrivée gauche et droit du T d'un essai à l'autre. Il s'agit d'un comportement phylogénétique d'exploration car le test n'est pas récompensé. Le pourcentage d'alternance gauche-droite est calculé au cours des essais successifs. Ainsi, 100 % d'alternance correspond à la performance maximale de la souris, c'est-à-dire l'alternance parfaite d'un bras à l'autre au cours de la phase de test. Le seuil de hasard est de 50 % (choix d'un bras parmi 2). Le pourcentage d'alternance est un reflet de la performance en mémoire de travail spatiale, hippocampe dépendante. En effet, la mémoire de travail est par définition une mémoire flexible, à court-terme, mise à jour en permanence. Ce pourcentage d'alternance décroît en fonction de l'augmentation de l'intervalle inter-essais (ITI) et de la répétition du nombre d'essais (augmentation de l'interférence).

Ce test nécessite une flexibilité cognitive et met en œuvre les principales caractéristiques de la mémoire de travail : maintien de l'information pertinente lors de l'essai en cours, et effacement de cette même information devenue non-pertinente lors de l'essai suivant.

Si la souris présente un défaut d'alternance, alors la mémoire de travail est affectée. Avant de réaliser ce test, les souris ont suivi une session d'habituation de 10 minutes durant 2 jours consécutifs, 3 jours avant l'exposition. Cette habituation a consisté à placer la souris dans le compartiment de départ (base du T) durant 30 secondes, puis elle a été laissée libre d'explorer les 2 bras d'arrivée. Une fois dans le bras choisi, la porte du compartiment d'arrivée se referme, maintenant la souris dans le compartiment d'arrivée durant 30 secondes. Cette habituation familiarise la souris avec la fermeture des portes (sons et mouvements). Au bout de ce délai de 30 secondes, la souris est à nouveau placée dans le compartiment de départ. Un nouvel essai démarre, la laissant libre d'explorer l'un des deux bras. Lors de la phase de test, 7 essais consécutifs ont été réalisés avec un intervalle inter-essais (ITI) de 90 secondes. Chaque choix de bras exploré par la souris a été enregistré. Un 8^{ème} essai de contrôle a été ajouté après une période de latence dans le compartiment de départ réduite à 30 secondes. Cette diminution de l'ITI de 90 à 30 secondes, a pour but de s'assurer que les résultats observés ne sont pas biaisés par un manque de motivation de la souris à explorer. En effet, la réduction de l'ITI séparant le 7^{ème} du 8^{ème} essai a pour but de faciliter la mémorisation du choix effectué lors de l'essai précédent (c'est-à-dire le 7^{ème} essai). Si la motivation à alterner est intacte, alors les souris présentent un taux d'alternance élevé au 8^{ème} essai. La Figure 35 résume le principe test du labyrinthe en T.

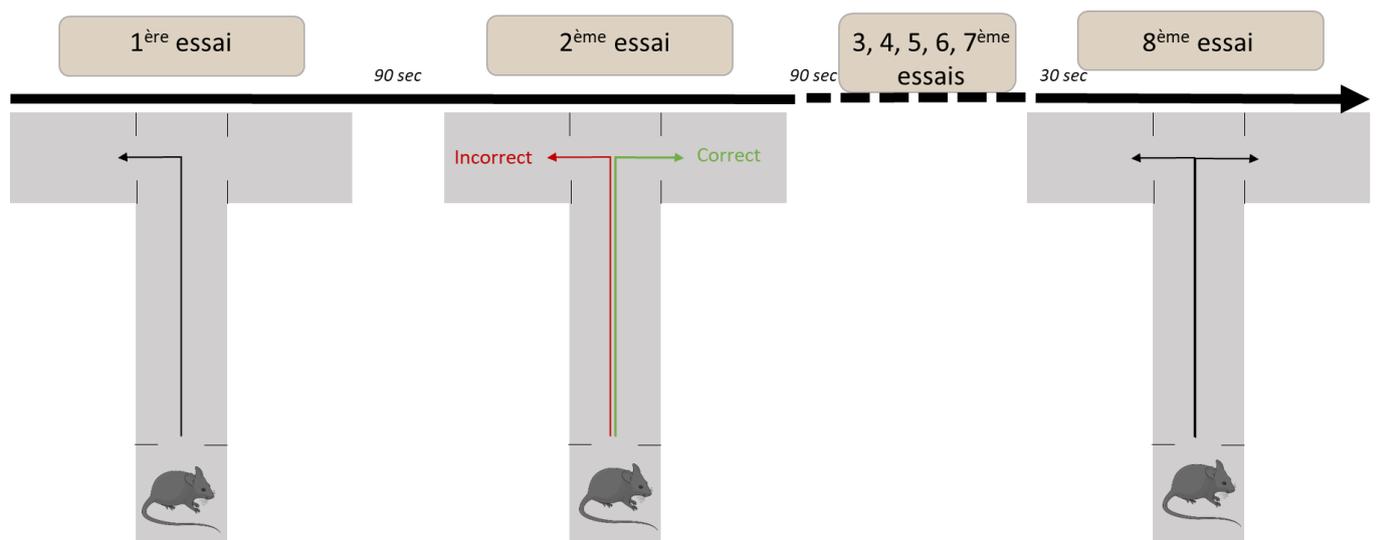


Figure 35 : Schéma du principe du test du labyrinthe en T.

Des intervalles inter-essais (ITI) de 90 secondes séparent les 7 premiers essais. L'ITI est réduit à 30 secondes entre le 7^{ème} et le 8^{ème} essai. Le pourcentage d'alternance entre le bras gauche et droit est calculé sur les 7 premiers essais. Le 8^{ème} essai a pour but de s'assurer du maintien de la motivation des souris à alterner en réduisant l'ITI.

III.3. Statistiques

Paramètres cliniques

Des comparaisons multiples entre les différents groupes (CEES, HD, contrôle, traités) ont été réalisées par analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs. Les paramètres de poids corporel, ITA, PIE, hydratation et taille des lésions ont ainsi été comparés. Ces comparaisons sont représentées sur des graphiques en fonction du temps post-exposition. Le seuil de significativité, valeur de p (p-value) du test de Fisher (F-test) est 0,05. Les valeurs représentées pour tous les paramètres sont les moyennes \pm SEM.

Biologie moléculaire

Pour les études de RT-qPCR, des tests statistiques ont été réalisés pour comparer l'expression des gènes d'intérêt, au cours du temps pour le CEES et l'HD et également entre les deux agents. Les valeurs p ont été calculées en utilisant le test de Student sur les $2^{-\Delta Ct}$ pour chaque gène des groupes contrôles et exposés au CEES et HD. La valeur de p utilisée est basée sur une distribution paramétrique à deux échantillons non appariés à variance égale et à deux queues. Le seuil de significativité de la valeur de p est de 0,05. Une correction par la méthode de Benjamini-Hochberg a ensuite été appliquée. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme représentant la quantité relative (Fold Change - FC) par rapport au contrôle pour chaque délai post-exposition.

Tests cognitifs

Des comparaisons entre les groupes par ANOVA à un facteur ont été réalisées, suivies d'une comparaison post-hoc par le test de Bonferroni-Dunn. Afin de mettre en évidence uniquement les différences majeures, le seuil de significativité a été placé à $p < 0,01$ pour les comparaisons appariées entre les groupes. Les valeurs représentées pour tous les tests sont les moyennes \pm SEM.

IV. RESULTATS

IV.1.Première partie : effets cutanés

IV.1.1 Résultats objectif 1 : Mise au point des brûlures cutanées au CEES et à l'ypérite

Modèle d'exposition aux vapeurs de CEES

Nous avons choisi d'adapter le modèle d'exposition aux vapeurs d'ypérite (234) avec les vapeurs de CEES, de telle façon que les deux modèles soient comparables et reproductibles. Les animaux ont été anesthésiés par un mélange de kétamine et de xylazine (Imalgène® 90 mg/kg et Rompun® 10 mg/kg respectivement) par voie intrapéritonéale, puis placés sur plaque chauffante pour éviter l'hypothermie induite par l'anesthésie.

Sous hotte chimique, 10 µL de CEES ont été déposés sur une rondelle de papier filtre disposée au fond d'un bouchon HPLC de 8 mm de diamètre. Le bouchon est ensuite retourné et fixé sur le dos de la souris. Trois systèmes de fixation ont été testés : du sparadrap recouvrant les bouchons, un adhésif double-face, percé en son centre, pour laisser passer les vapeurs de CEES et enfin du gel Pluronic® F-127 sur le pourtour du bouchon afin de l'étanchéifier au contact de la peau. Plusieurs temps d'exposition ont été testés durant une étude préliminaire allant de 8 minutes (temps de référence pour l'ypérite) jusqu'à 45 minutes. Cinq bouchons au maximum peuvent être fixés simultanément sur le dos de l'animal, permettant ainsi d'obtenir plusieurs biopsies, y compris des zones de peau non exposées, après sacrifice de l'animal.

Après leur réveil, les animaux ont été placés en cages individuelles, toujours sous hotte chimique, en attendant d'être décontaminés, 4 heures après exposition, à l'aide de deux compresses imbibées d'eau savonneuse puis d'eau (Figure 36). De la buprénorphine (Buprécare® 0,05 mg/kg) est injectée par voie sous-cutanée à l'occasion de cette décontamination. Les souris sont alors remises en stabulation dans des cages individuelles sans précautions particulières. En effet, il est indispensable que les souris soient hébergées en cages individuelles afin de limiter les grattages entre congénères. De la codéine (Néo-codion®

1 mg/mL) est ajoutée à l'eau de boisson à la dose de 4 mL pour 100 mL afin de limiter la douleur liée à l'exposition au CEES tout au long de leur stabulation.

Pour cette mise au point, les souris sont suivies durant 7 jours maximum et des biopsies sont prélevées à J1, J3 et J7 après injection de pentobarbital (Doléthal® 150 mg/kg) en i.p.

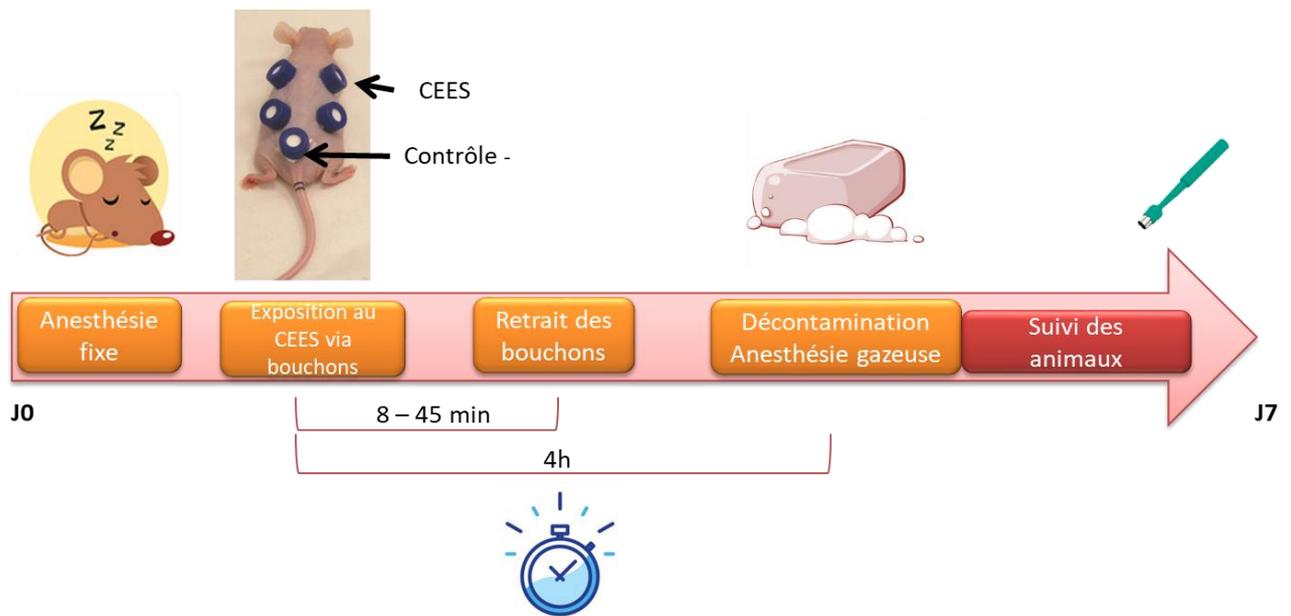


Figure 36 : Protocole d'exposition aux vapeurs de CEES

Choix du temps d'exposition au CEES : plusieurs temps de contact ont été testés : 8 minutes (temps de référence de l'exposition aux vapeurs d'ypérite), 15, 30 et 45 minutes. Ces durées ont été testées sur les hanches et les épaules des souris, afin de s'assurer que les lésions obtenues étaient les mêmes entre ces zones d'exposition. Il est apparu que le temps optimal pour obtenir des lésions présentant le même aspect que les brûlures induites par l'ypérite était de 30 minutes. Ce temps d'exposition a permis d'obtenir des lésions reproductibles évoluant vers la nécrose entre 48 et 72 h (235). D'autre part, nous avons testé un temps de décontamination précoce (1 h post-exposition) et un temps de décontamination différé de l'ypérite (4 h post-exposition), ce dernier ayant été décrit dans les précédentes publications de l'IRBA (212, 236). Les résultats montrent que les lésions décontaminées à 1 h évoluent moins vite que celles décontaminées à 4 h (Figure 37). Cependant, à partir du troisième jour post-exposition, les lésions sont nécrotiques pour les deux délais de décontamination. La décontamination précoce retarde donc uniquement la survenue de la lésion mais ne l'atténue pas.

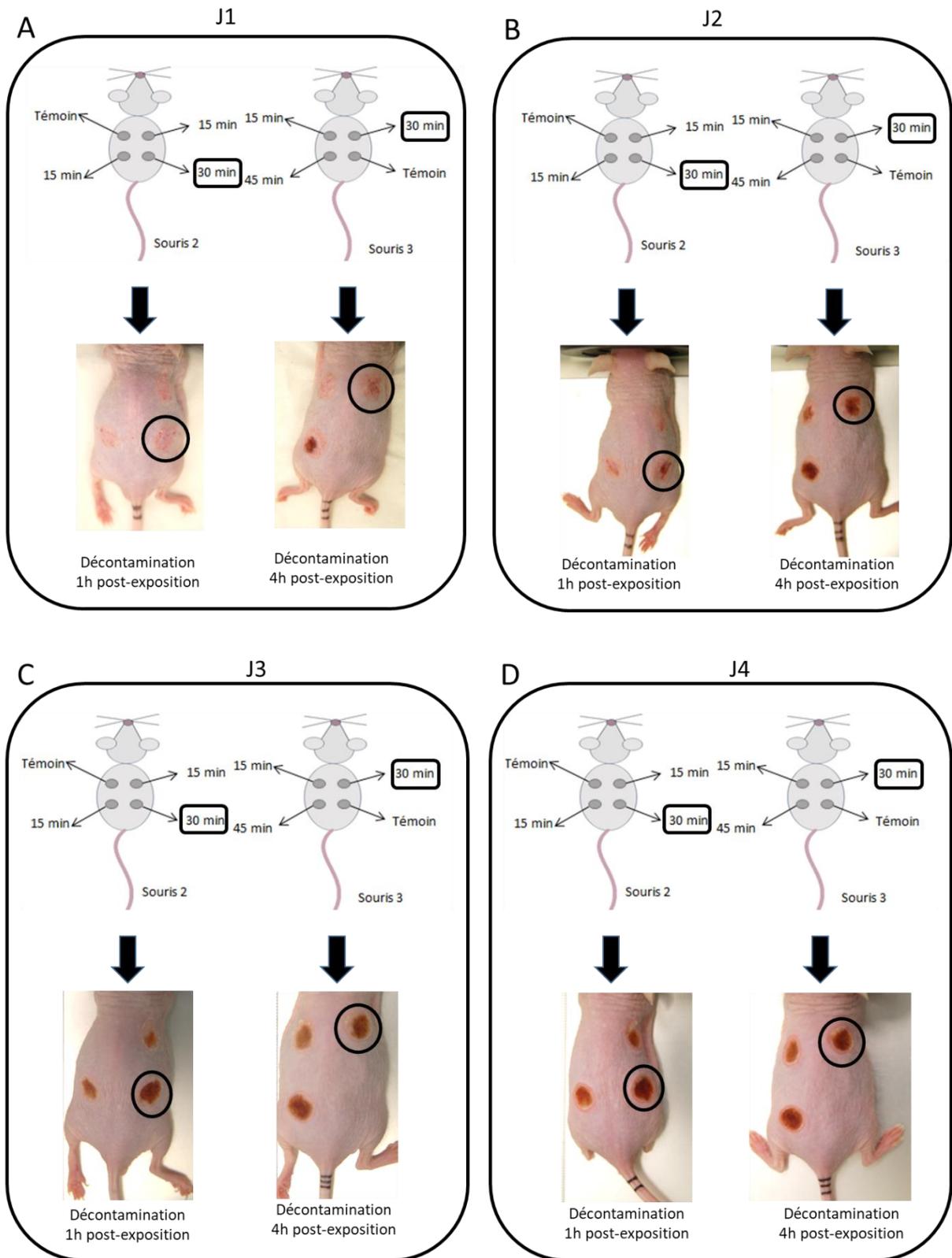


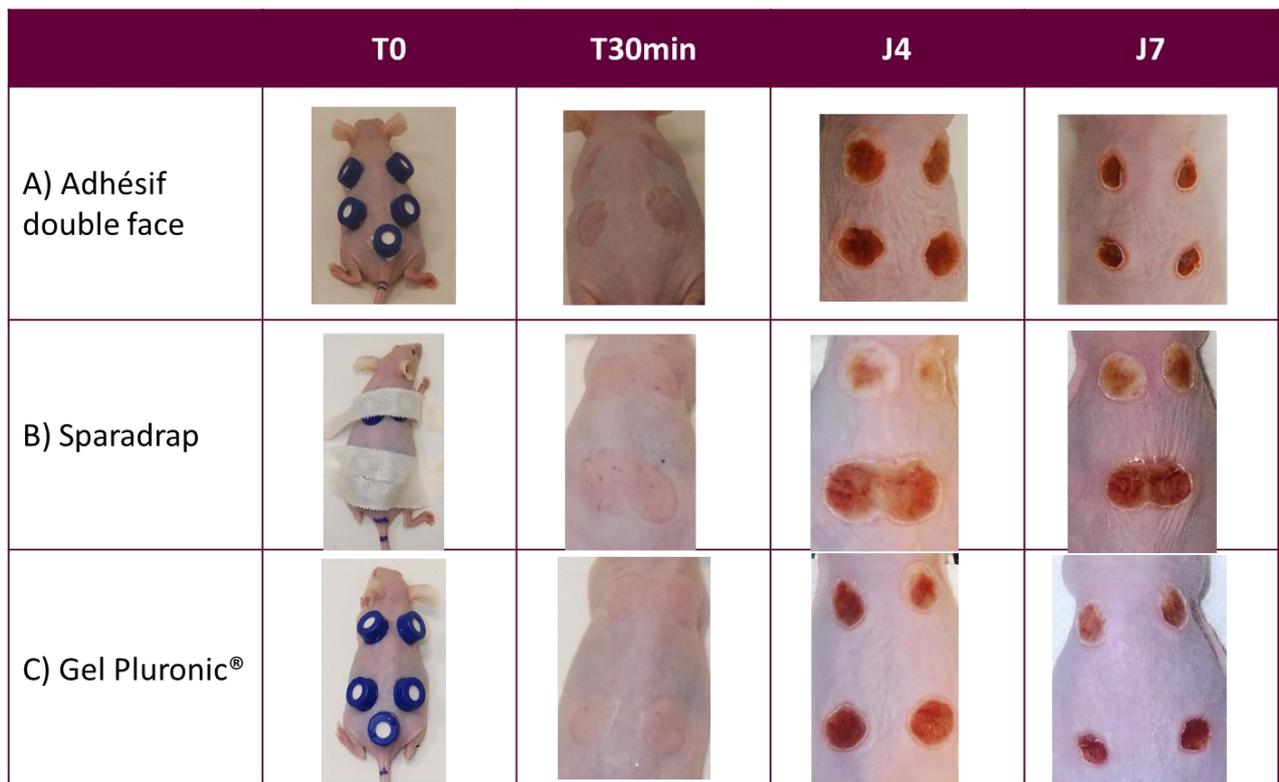
Figure 37 : Comparaison des temps d'exposition et des délais de décontamination.
 A : J1 post-exposition. B : J2 post-exposition, C : J3 post-exposition, D : J4 post-exposition

Le temps d'exposition retenu pour le CEES est de 30 minutes. Ce temps permet d'obtenir des lésions évoluant vers la nécrose sans pour autant être létales. Le délai de décontamination retenu est de 4 h post-exposition. Les lésions aboutissent à un même stade lésionnel (nécrose) après 3 jours, que ce soit pour une décontamination à 1 h ou 4 h. En effet, nous avons préféré opter pour la situation la plus critique qui serait l'impossibilité de décontaminer précocement une victime.

Choix du système de fixation : afin de déterminer le système de fixation le plus pertinent, nous avons comparé plusieurs critères : l'homogénéité des lésions entre les différentes zones exposées, la bonne délimitation des lésions et le temps de mise en œuvre par l'expérimentateur. Le dispositif le moins rapide à mettre en œuvre est celui de l'adhésif double face puisqu'il faut le prédécouper auparavant aux dimensions des bouchons, puis les perforer. Par ailleurs, les bouchons ne peuvent pas être préparés plusieurs jours à l'avance car l'adhésif perd son pouvoir collant. Il faut donc les préparer la veille de l'expérimentation, rallongeant ainsi la mise en œuvre en fonction du nombre de souris. De plus, le jour de l'expérimentation, il faut décoller le feuillet de protection de l'adhésif, or la manipulation des bouchons se fait avec des gants butyle épais, diminuant fortement la préhension. En outre, une fois les feuillets protecteurs ôtés, les bouchons peuvent se coller entre eux ce qui complique leur manipulation. Ce dispositif de fixation a néanmoins l'avantage de permettre une bonne étanchéité des bouchons sur la peau, et ainsi d'obtenir des lésions bien définies et reproductibles.

Le système de fixation utilisant le sparadrap est quant à lui très rapide à mettre en œuvre. En effet, les sparadraps sont découpés lors de l'expérimentation puis les bouchons sont retournés et fixés sur le sparadrap avant d'être lui-même fixé sur le dos de l'animal. Cependant, ce système n'est pas suffisamment étanche et doit être repositionné ou maintenu par des pinces durant toute la durée de l'exposition. Les zones sont d'ailleurs moins bien définies et reproductibles avec ce système de fixation.

Le dernier système de fixation consistant à utiliser du gel thermoréversible Pluronic® F-127 est rapide à mettre en œuvre. En effet, le gel peut être préparé la veille et maintenu à + 4 °C afin de rester liquide. Ce gel thermoréversible est liquide à + 4 °C tandis qu'à + 37 °C il se gélifie. Les bords des bouchons sont trempés dans le gel encore liquide, puis ils sont retournés et posés sur la peau de l'animal. Au contact de la peau, le Pluronic® se gélifie, permettant ainsi d'assurer une étanchéité et une fixation optimales des bouchons. De ce fait, les lésions étaient bien définies et reproductibles (Figure 38).



	Temps de préparation	Temps par souris	Zones homogènes et bien définies
A) Adhésif double face	Heures	30 min/souris	++
B) Sparadrap	5 min	5 min/souris	0
C) Gel Pluronic®	5 min	< 1 min/souris	++

Figure 38 : Comparaisons de trois modes de fixation des bouchons de CEES.
A) fixation par adhésif double-face, B) fixation par sparadrap, C) fixation par du gel Pluronic® F-127.

Au vu de ces résultats, il est apparu que le dispositif par gel Pluronic® était le plus rapide à mettre en œuvre et permettait une bonne reproductibilité des lésions entre les zones qui étaient par ailleurs homogènes et bien définies. Nous avons donc conservé par la suite ce mode de fixation des bouchons (237).

Modèle d'exposition aux vapeurs d'ypérite

En se basant sur le modèle d'exposition aux vapeurs d'ypérite mis au point par l'ancienne unité (234) ainsi que sur le modèle d'exposition aux vapeurs de CEES précédemment mis au point (*cf supra*), différents temps d'exposition et différents volumes d'ypérite ont été testés.

Les souris ont été anesthésiées par un mélange de kétamine et de xylazine (Imalgène® 90 mg/kg et Rompun® 10 mg/kg respectivement) par voie intrapéritonéale puis placées sur plaque chauffante pour éviter l'hypothermie induite par l'anesthésie.

Sous hotte chimique, les bords du bouchon HPLC de 8 mm de diamètre ont été recouverts de Pluronic® F-127 puis de l'ypérite a été déposée sur une rondelle de papier filtre disposée au fond du bouchon. Seule cette méthode de fixation du bouchon a été retenue pour cette mise au point. Deux volumes d'ypérite ont été testés : 6 et 10 µL.

Deux temps d'exposition ont été évalués durant cette étude préliminaire : 6 et 8 minutes. Jusqu'à 5 bouchons peuvent être fixés simultanément sur le dos de l'animal, permettant ainsi de prélever, après sacrifice, plusieurs biopsies pour un même animal, y compris des zones de peau non exposées.

A leur réveil, les animaux ont été placés dans en cages individuelles toujours sous hotte chimique, en attendant d'être décontaminés 4 heures après exposition, à l'aide de deux compresses imbibées d'eau savonneuse puis d'eau (Figure 39). De la buprénorphine (Buprécare® 0,05 mg/kg) est injectée par voie sous-cutanée à l'occasion de cette décontamination.

Les souris sont alors remises en stabulation dans des cages individuelles, afin de limiter les grattages entre congénères. De la codéine (Néo-codion® 1 mg/mL) est ajoutée à l'eau de boisson à la dose de 4 mL pour 100 mL, *ad libitum*, afin de limiter la douleur liée à l'exposition à l'ypérite tout au long de leur stabulation.

En fin de procédure, les animaux sont sacrifiés par une injection de pentobarbital (Doléthal®) à 150 mg/kg, i.p.

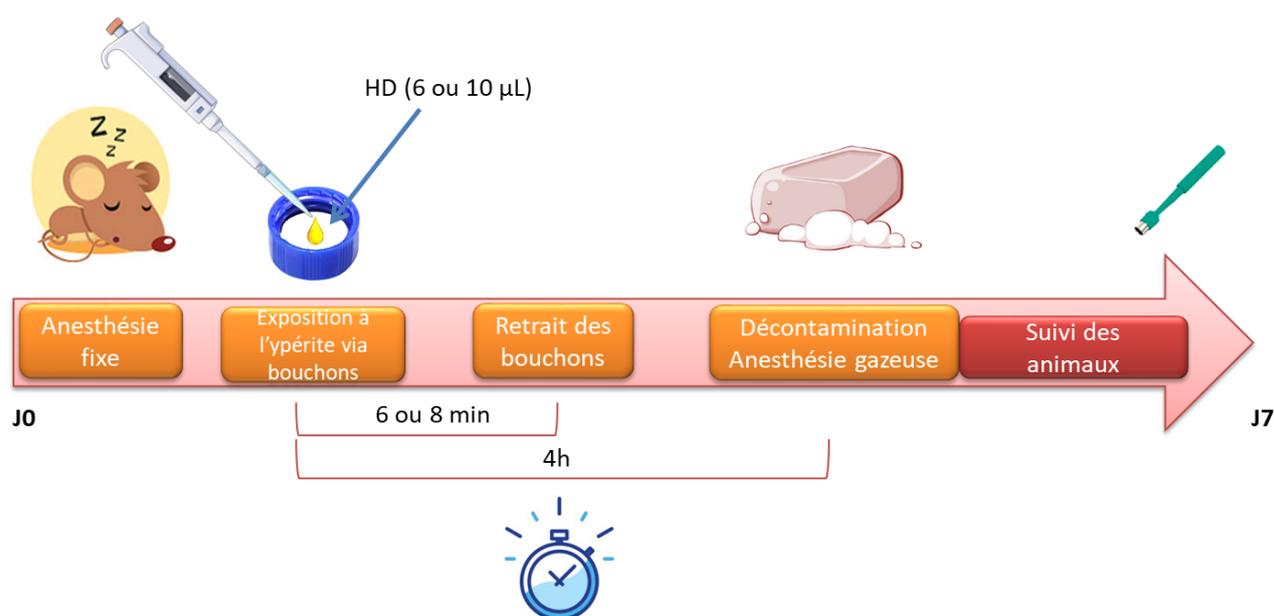


Figure 39 : Protocole d'exposition aux vapeurs d'ypérite.

Toutes les conditions testées ont conduit à une nécrose de la zone exposée (Figure 40). Cependant, la nécrose est apparue plus rapidement, dès J1, dans la condition expérimentale 8 minutes/10 µL. En comparant les conditions 6 min/6 µL vs 8 min/6 µL, un effet temps est observé. En effet, pour un même volume d'ypérite, l'augmentation de temps d'exposition a induit des lésions plus prononcées à J1. De même, un effet dose (volume) est observé puisque la condition 8 min/10 µL a induit des lésions plus importantes qu'avec la condition 8 min/6 µL. Les lésions obtenues avec la condition 8 min/10 µL sont plus importantes de J1 à J14. A noter qu'il n'y a pas eu de mortalité induite par l'ypérite.

HD	J1	J3	J7
6 minutes/6 μ L			
8 minutes/6 μ L			
8 minutes/10 μ L			

Figure 40 : Comparaisons des temps d'exposition et du volume d'ypérite en fonction du délai post-exposition.

La condition 10 μ L d'ypérite pendant 8 minutes d'exposition permet d'obtenir un début de nécrose dès le J1. Au J3, la zone exposée est entièrement nécrosée. L'association 8 min/10 μ L a été retenue pour les expérimentations ultérieures.

Discussion objectif 1 : Mise au point des brûlures cutanées au CEES et à l'ypérite

Pour cet objectif de mise au point des protocoles d'exposition aux vapeurs de CEES et d'ypérite, nous nous sommes appuyés uniquement sur des critères visuels puisque nous ne disposons pas des appareils de mesures des paramètres cutanés listés plus haut. Ainsi, nous avons évalué l'aspect des lésions, leur délai de survenue, leur reproductibilité et l'état de cicatrisation au bout d'une semaine J7.

En ce qui concerne le CEES, aucune méthode d'exposition vapeur par voie cutanée n'avait été décrite dans la littérature. Afin de se rapprocher du modèle d'exposition aux vapeurs d'ypérite dans le but de comparer les lésions, plusieurs conditions ont été testées (durée d'exposition, délais de décontamination, méthode de fixation des bouchons). Les paramètres retenus pour l'exposition cutanée aux vapeurs de CEES ont été : i) un volume de 10 μ L, ii) fixation des bouchons à l'aide du gel Pluronic® F-127, iii) durée d'exposition 30

minutes, iv) décontamination 4h post-exposition. Ces conditions n'ont pas entraîné de mortalité et ont permis d'obtenir des lésions évoluant vers la nécrose en quelques jours.

En ce qui concerne l'ypérite, le protocole d'exposition vapeurs par voie cutanée anciennement décrit a été remis en œuvre, après avoir vérifié les paramètres de volume et de durée d'exposition. Les paramètres temps et volume (8 min/10 µL) ont ainsi été validés. De même que pour l'exposition au CEES, les bouchons ont été fixés par du gel Pluronic® F-127 au lieu de l'adhésif double-face classiquement utilisé. La décontamination a été réalisée selon le même protocole que le CEES. La décontamination à 4 h post-exposition n'entrave pas l'apparition des lésions. Par ailleurs, ces conditions expérimentales n'ont pas entraîné de mortalité.

Il est difficile de déterminer la durée à partir de laquelle la concentration saturante est atteinte du fait de l'absorption cutanée des vapeurs des toxiques. En effet, la vitesse pour atteindre la concentration saturante dépend de nombreux facteurs tels que le modèle (explants, peau de cochon, peau de souris,...), la surface d'exposition, le volume du bouchon. La concentration de vapeurs lors d'une exposition est ainsi plus faible que la concentration saturante (238). Dalton et al., 2006, ont déterminé, *in vitro* sur des explants de peau de cochon, qu'une concentration constante de vapeurs d'ypérite est atteinte dans les 2 minutes après exposition (238). Notre durée d'exposition aux vapeurs d'ypérite était de 8 minutes, nous étions donc principalement sous concentration constante. Pour le CEES, aucune étude n'a déterminé la durée nécessaire pour obtenir une concentration constante en vapeurs. Néanmoins, le CEES étant plus volatile que l'ypérite (respectivement 3,4 vs 0,11 mmHg) et notre durée d'exposition étant de 30 minutes, nous pouvons donc supposer que l'exposition était principalement sous concentration constante.

Deux modes opératoires fixant les paramètres d'exposition aux vapeurs de CEES et d'ypérite ont été rédigés et enregistrés dans le système de gestion documentaire qualité de l'IRBA.

IV.1.2 Résultats objectif 2 : comparaison ypérite vs CEES

Article n° 3 : *Is CEES a good analog of sulfur mustard? Macroscopic aspect, histology, and molecular biology comparisons between sulfur mustard and CEES-induced skin lesions*

La comparaison des lésions induites par l'ypérite et le CEES a fait l'objet d'une publication intitulée « ***Is CEES a good analog of sulfur mustard? Macroscopic aspect, histology, and molecular biology comparisons between sulfur mustard and CEES-induced skin lesions*** », par Gros-Désormeaux et al., dans Toxicology Letters, Volume 361, 15 May 2022, Pages 21-28.

L'ypérite est une arme chimique dont l'utilisation, la détention et la synthèse sont prohibées par la CIAC. Du fait de ces restrictions d'utilisation, une substitution de l'ypérite par un de ses analogues s'avère nécessaire pour les laboratoires non habilités à la manipuler. Parmi les analogues de l'ypérite, le CEES est un analogue non réglementé par l'OIAC et très proche structurellement de l'ypérite (seul un atome de chlore diffère). Le CEES peut ainsi être acheté et manipulé dans des laboratoires civils. Cet analogue est souvent utilisé dans des études portant sur l'ypérite (204, 239, 240). Cependant, peu d'études ont comparé les lésions induites par l'ypérite de celles induites par le CEES (241). Afin d'évaluer la pertinence de cet analogue, nous avons comparé les lésions induites par le CEES et l'ypérite sous plusieurs aspects (macroscopique, histologique et en biologie moléculaire).

Des souris SKH-1 ont été exposées, selon les modes d'exposition décrits plus haut, aux vapeurs de CEES (30 min) ou d'ypérite (8 min). Les animaux ont été sacrifiés à différents délais post-exposition (J1, J3, J7 et J14). Afin d'évaluer les lésions, des mesures cutanées non invasives ont été réalisées. Après sacrifice, des biopsies cutanées ont été prélevées pour analyses histologiques ou de biologie moléculaire (RT qPCR).

Sur le plan physiologique, les souris exposées au CEES et à l'ypérite ne présentent pas de différence d'évolution pondérale (résultats non publiés, voir Annexe V). En terme de cinétique d'apparition des lésions, un œdème est visible dès les minutes suivant le retrait des bouchons pour les souris ypérite et à partir des 4 h post-exposition pour les souris CEES (résultats non publiés, voir Annexe VI). L'ypérite induit une nécrose profonde dès J1 après exposition, tandis que la nécrose profonde apparaît à J3 avec le CEES. Cependant, les lésions aboutissent à un même état lésionnel en fin de procédure (J14) avec le décollement des bords de la croûte formée. Concernant les paramètres cutanés mesurés, les valeurs d'ITA, de PIE, et d'hydratation sont inférieures dans le groupe CEES par rapport au groupe HD à J1. La surface des lésions est inférieure à J1 dans le groupe exposé au CEES, cependant à J3 celle-ci devient supérieure chez les souris CEES. A partir de J7, les surfaces sont similaires entre les deux groupes. Le score combiné lésionnel reflète ces observations.

Les lésions apparaissent plus rapidement avec l'ypérite qu'avec le CEES. Cela se traduit visuellement mais également de façon objective par les mesures des différents paramètres cutanés. Cependant, en fin de procédure, l'aspect lésionnel et les paramètres cutanés sont similaires.

Sur le plan histologique, l'ypérite induit une nécrose profonde dès J1, accompagnée de microvésications intradermiques, tandis que celles-ci sont observées à partir de J3 pour le CEES. A J7, les nécroses induites par les deux agents sont de profondeurs similaires et à J14 un début de réépithélialisation et de décollement de la croûte est observé (des résultats complémentaires pour J3 et J7 figurent en Annexe VII).

L'analyse histologique confirme l'apparition de nécrose profonde plus précoce avec l'ypérite (dès J1). A partir de J7, les lésions induites par l'ypérite et le CEES évoluent de la même manière jusqu'à J14 (fin de l'étude).

L'analyse par biologie moléculaire montre une inflammation plus marquée et plus précoce avec l'ypérite (TNF α , IL-1 β , IL-6). Une chute de KRT1 (kératine 1) est observée dès J1 après exposition aux deux agents. Une réépithélialisation est ensuite observée en fin de procédure (J14). Une diminution de MMP1a est observée à J1 après exposition à l'ypérite, tandis que le taux reste au niveau contrôle pour le groupe CEES. Cependant, à J14, les taux sont similaires entre les groupes exposés (CEES et HD) et le groupe contrôle. Concernant MMP9, une augmentation est observée plus tardivement avec le CEES qu'avec l'ypérite (J3 vs J1). Cette augmentation se poursuit jusqu'à J14 sans différence significative entre le groupe CEES et HD. GJB2 et GJB6 (connexines-26 et 30) évoluent de la même manière avec une augmentation progressive de J3 à J14, avec une augmentation plus importante dans le groupe HD. Pour GBA1 (connexine-43), une augmentation est observée à J1 pour le CEES et de J3 à J14 pour HD.

L'analyse en biologie moléculaire montre une inflammation plus précoce et plus importante après exposition à l'ypérite. GJA1 (Cx-43) est augmentée avec le CEES et l'ypérite, alors qu'une diminution de celle-ci est nécessaire à la cicatrisation.

La comparaison de l'ypérite avec son analogue CEES montre des lésions histologiquement similaires avec une cinétique d'apparition plus rapide pour l'ypérite que pour le CEES. De plus, l'intensité de l'inflammation est supérieure avec HD. Cependant, en fin d'étude (J14), les lésions aboutissent à un même état lésionnel. Le CEES semble donc être un bon analogue de l'ypérite pour évaluer des contre-mesures médicales par exemple. Du fait du délai d'apparition des lésions supérieur avec le CEES, il sera toutefois nécessaire de le prendre en compte afin d'optimiser les délais d'observation et les durées d'étude.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.journals.elsevier.com/toxicology-letters

Is CEES a good analog of sulfur mustard? Macroscopic aspect, histology, and molecular biology comparisons between sulfur mustard and CEES-induced skin lesions

Fanny Gros-Désormeaux^{a,*}, Fanny Caffin^a, Alexandre Igert^a, Nathalie Guatto^b,
Christophe Piérard^a

^a Département de Toxicologie et Risques Chimiques – Unité Vésicants, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), 1 place du Général Valérie André, 91220 Brétigny sur Orge, France

^b Département des Plateformes et Recherches Technologiques – Unité Imagerie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), 1 place du Général Valérie André, 91220 Brétigny sur Orge, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Sulfur Mustard (SM)
2-chloroethyl ethylsulfide (CEES)
Analog
Skin lesions
Pathophysiology

ABSTRACT

Sulfur mustard (SM) is a chemical blistering warfare agent affecting multiple organs. SM is an ongoing chemical threat in addition to the accidental risk associated with World War I buried shells. As no specific treatments are available, only symptomatic therapies can be used.

To test new medical countermeasures in standard laboratories, analogs such as 2-chloroethyl ethylsulfide (CEES) are currently used, although only a few studies compare its clinical effects with SM. In the present paper, skin lesions induced by SM and CEES are compared in terms of their macroscopic aspects, histology, and molecular biology to evaluate the pertinence of CEES as a SM analog. For this purpose, an *in vivo* model of CEES vapor exposure, similar to that of SM, is described in this paper.

Results: showed similar skin lesions with CEES and SM but with slight differences in the apparition delay and intensity of the lesions. Indeed, SM induced earlier, deeper, and stronger lesions. However, the same healing status was observed at the end of the study period (14 days).

In conclusion, CEES appears a relevant analog of SM, leading to similar skin lesions. The CEES vapor exposure model therefore seems suitable for testing new medical countermeasures.

1. Introduction

Sulfur mustard (SM) or bis(2-chloroethyl) sulfide, also known as mustard gas, is a chemical warfare agent that was used for the first time in 1917 at Ypres (Belgium). Despite being prohibited by the Chemical Weapons Convention ratified since 1997, SM is still a chemical terrorist threat, as it is easy to synthesize (Paromov et al., 2007). SM also represents an accidental risk for farmers, workers, and militia collectors on account of unexploded buried shells from World War I (Mérat et al., 2003). For this reason, public and military health services are concerned by SM. As soon as SM penetrates the organism, it is cyclized by the loss of a chlorine atom to form the highly reactive episulfonium ion. This ion attacks many biological targets and generates adducts with proteins and nucleic acids (Paromov et al., 2007).

SM diffuses throughout the whole organism and affects all organs

such as the skin, lungs, and eyes. Decontamination after the first few minutes of exposure is crucial to prevent contamination transfers and limit the occurrence and severity of the lesions. More than a century after its first military use, there is still no antidote. Treatment is only symptomatic, aiming to prevent infection and relieve pain (Rose et al., 2018). As chronic wounds, SM skin lesions take a long time to heal and often leave sequelae such as dyspigmentation (Rowell et al., 2009; Graham and Schoneboom, 2013). Research on SM countermeasures is thus crucial. As SM is regulated by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, only a few laboratories worldwide are allowed to manipulate this agent. Thus, some laboratories studying vesicant agents use SM analogs such as nitrogen mustard (NM) or 2-chloroethyl ethylsulfide (CEES). Indeed, these analogs are commercially available and are not classified in Table I of the Chemical Weapons Convention. Nevertheless, NM is not as chemically similar to SM as CEES is (Fig. 1A, B, C).

* Correspondence to: IRBA, 1 place du Général Valérie André, 91220 Brétigny sur Orge, France.
E-mail address: fanny.gros-desormeaux@def.gouv.fr (F. Gros-Désormeaux).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.03.008>

Received 17 November 2021; Received in revised form 22 February 2022; Accepted 22 March 2022

Available online 24 March 2022

0378-4274/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

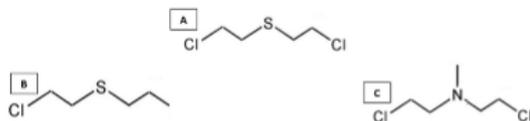


Fig. 1. Chemical formula of (A) sulfur mustard (SM), (B) 2-chloroethyl ethylsulfide (CEES), and (C) nitrogen mustard (NM). Compared to SM, a chlorine atom is replaced by a hydrogen atom in CEES, whereas sulfur is replaced by NCH₃ in NM.

Indeed, only one chlorine atom makes SM different from CEES; SM is thus a bi-alkylating agent and CEES a mono-alkylating agent (Jowsey et al., 2009).

It was previously described that like SM, CEES induces oxidative stress, DNA damage, and glutathione depletion (Paromov et al., 2007; Swetha Inturi et al., 2011; Tewari-Singh et al., 2011). However, few studies have compared the clinical effects of CEES to SM (Sawyer, 2020). Here we developed an animal model of skin intoxication by CEES vapors. Indeed, CEES exposure is usually performed with liquid CEES diluted in acetone to ensure skin penetration (Jain et al., 2011; Tewari-Singh et al., 2009). However, to be as close as possible to SM intoxication of the skin, we decided to develop a model using CEES vapors (Vallet et al., 2012; Smith et al., 1997; Dorandeu et al., 2011). These vapor models have the advantage of inducing a well-defined exposure area that is reproducible and non-lethal.

Thus, the aim of the present paper is to evaluate the relevance of the CEES and SM analogs regarding their macroscopic aspects, histology, and molecular biology.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Many metabolic pathways are affected by vesicants. So to compare the clinical effects of CEES and SM, animal models are essential. For this purpose, we used male SKH-1 mice provided by Charles River laboratories. This mice strain is outbred, hairless, and immunocompetent. Five-week-old mice were taken to the animal facility and subjected to 1 week of quarantine and 1 week of adaptation. Mice were then exposed to vesicant agents at the age of 7 weeks. Groups of four mice were kept in collective cages until exposure and then placed in individual cages after CEES or SM skin exposure to prevent them from scratching each other. The cage environment was enriched throughout the procedure. Animals were sacrificed by lethal intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg) after a maximum of 14 days post-exposure. This work was approved by the ethical committee of the French Service de Santé des Armées (C2EA-SSA).

2.2. Vesicant vapor exposure

Exposures were performed in the toxicology laboratories of the French Institut de Recherche Biomedical des Armées (IRBA). CEES was purchased from Sigma Aldrich (ref: 242640), whereas SM was supplied by the French Direction Générale de l'Armement (DGA). Handling precautions were similar for both agents in terms of the use of personal protective equipment and handling under a chemical fume hood.

Before exposure, vial caps were prepared by placing a filter paper disk (8 mm in diameter) in the cap. On the day of exposure, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The animals were placed on a hotplate under a chemical fume hood. Ten μ L of neat SM or CEES were deposited on the paper filter, and then the cap was fixed on the shoulders and hips of the mice. To fix the cap, 30% Pluronic Gel F-127 was prepared in advance. This gel is thermoreversible, because it jellifies at

body temperature, whereas it is liquid at 4 °C (Escobar-Chavez et al., 2006). The edge of the caps was soaked in Pluronic gel and then fixed on the back of the mice. A control cap was fixed to the base of the tail as an internal control. For SM, caps were removed after 8 min, whereas for CEES, caps were removed after 30 min. Exposure parameters (volume and duration) were previously determined (data not shown). Individual cages were then placed under the chemical fume hood. Four hours after exposure, skin decontamination was performed using a compress soaked in soap and water followed by a second one soaked in water. To relieve the pain, animals were given a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg). In addition, codeine was added to water (4 mL/100 mL) provided *ad libitum*. The animals were divided into eight groups of eight animals corresponding to days after CEES or SM exposure when they were sacrificed (D1, D3, D7 and D14). A control group of seven animals was added.

2.3. Non-invasive monitoring

Body weight was recorded daily. Lesions were photographed with a Nikon D40x camera and a Sigma $\text{\textcircled{R}}$ 17–70 mm f/ 2.8–4 DC Macro HSM lens. A visual scale was placed near the animal to calculate the surface of the skin lesions using ImageJ $\text{\textcircled{R}}$ software. The individual typology angle (ITA) was measured with Skincatch color (Delfin $\text{\textcircled{R}}$). ITA, expressed in degrees, reflects the color of the skin: the lower the ITA value, the darker the skin, thus signifying the presence of an eschar. Skin hydration was determined by MoistureMeter D (Delfin $\text{\textcircled{R}}$) with a 0.5 mm probe measuring the dielectric constant of the skin and subcutaneous tissues, proportional to the skin water content (Papp et al., 2006). Trans-epidermal water loss (TEWL) was measured with Vapometer (Delfin $\text{\textcircled{R}}$) using the small adapter. The sensor monitor inside the chamber measured the increase in relative humidity (RH), and the evaporation rate was automatically calculated based on the RH increase. This apparatus has the advantage of having a closed chamber (Tagami et al., 2002; De Paepe et al., 2005). TEWL reflects the barrier function of the skin (De Paepe et al., 2005). Indeed, when the skin barrier is disrupted, water passes through the skin, thus increasing the RH. Furthermore, to easily evaluate the intensity of the lesion, a combined lesion score was calculated based on the above-skin parameters (ITA, hydration, TEWL, lesion surface). Recordings were performed daily on each animal until euthanasia at D1, D3, D7, and D14.

2.4. Histology

After sacrifice, skin biopsies were collected with a 8 mm-diameter punch. Biopsies for histology were fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer saline (PBS) for 1 day and then immersed in PBS 1X. Biopsies were dehydrated using Excelsior AS automat (MM France $\text{\textcircled{R}}$) and then included in paraffin blocks. Sections were cut (5 μ m thickness) using Leica $\text{\textcircled{R}}$ Multicut R microtome. Hematoxylin phloxin safran (HPS) coloration was then performed using the automat Leica $\text{\textcircled{R}}$ ST5020. Histology slides were mounted with Eukitt $\text{\textcircled{R}}$ after successive baths of ethanol and xylene to dehydrate the sections. Histologic sections were then analyzed and recorded using NanoZoomer (Hamamatsu $\text{\textcircled{R}}$) and NDP view. Skin sections shown in the figures were recorded using a 10x objective.

2.5. RT-qPCR

After sacrifice, skin biopsies for molecular biology were immersed in RNAlater TM for 24 h at 4 °C and then stocked at – 20 °C before analysis. Biopsies were grinded with 2.8 mm ceramic beads using Omni $\text{\textcircled{R}}$ bead ruptor in Qiazol $\text{\textcircled{R}}$ lysis reagent. RNAs were then extracted with RNeasy $\text{\textcircled{R}}$ Plus Universal Mini Kit (Qiagen). RNA quality and concentration were determined with a Nanodrop $\text{\textcircled{R}}$ spectrophotometer. To ensure the integrity of RNAs, samples were analyzed with Agilent TapeStation $\text{\textcircled{R}}$. The RNA integrity number (RIN) had to be above 5 to be

considered for the rest of the study. cDNAs synthesis was performed using Qiagen RT² First Strand Kit following the commercial instructions. PCR 384-well plates were designed to analyze inflammation, skin remodeling, and connexins (Cx):

- Inflammation: TNF α (NM_013693), IL-6 (NM_001314054), IL-1 β (NM_008361);
- Remodeling: MMP1a (NM_032006), MMP9 (NM_013599), KRT1 (NM_008473);
- Connexins: GJA1 (NM_010288) coding for the Cx-43 protein, GJB2 (NM_008125) coding for the Cx-26 protein, and GJB6 (NM_008128) coding for the Cx-30 protein. Indeed, Cx are involved in skin healing (Coutinho et al., 2003) and are deregulated in chronic wounds (Sutcliffe et al., 2015). Since SM skin lesions are often described as having a long healing time (Graham and Schoneboom, 2013; Graham et al., 2005), it was interesting to compare SM lesions with acute and chronic wounds regarding Cx evolution.

Three housekeeping genes were used: Cdc73 (NM_145991), Rplp0 (NM_007475), and Ccna2 (NM_009828). Readings were performed using LightCycler[®] 480 (Roche) and LightCycler[®] 480 SYBR[®] Green I Master (Roche). PCR controls (genomic DNA, reverse transcription, and positive) were included in each plate. Cycle thresholds over 35 were considered undetected. Normalization was performed by the arithmetic mean. Results were expressed in fold changes (FC) compared to the control group.

2.6. Statistical analysis

Multiple comparisons between groups (SM, CEES, and control) were performed using two-way ordinary analysis of variance to compare skin parameters (body weight, ITA, TEWL, hydration, and lesion surface). Comparisons were presented on graphs for each parameter compared to post-exposure time. The significance threshold for the p-value of the F-test was set at 0.05.

For the PCR experiment, statistical tests were performed to compare on the one hand groups for each delay post-exposure for a given agent, and on the other hand, between both agents. P-values were calculated using Student's test on the replicate $2^{-\Delta Ct}$ value for each gene in each control and experimental groups. The p-value was based on parametric unpaired two-sample equal variance and two-tail distribution. The significance threshold for the p-value of the t-test was set at 0.05. A correction of p-values was then applied using the Benjamini-Hochberg method. Results were presented in graphs representing FC compared to control versus post-exposure time.

For readability reasons, only statistical comparisons between SM and CEES groups are shown on the graphs.

3. Results

3.1. Body weight increase

After exposure to SM vapor for 8 min or CEES vapor for 30 min, no significant differences were observed between the two groups. Thus, SM vapor exposure does not increase body weight compared to CEES.

3.2. Clinical observations

Erythema followed by necrosis and eschar appears after both CEES and SM exposure (Fig. 2). Necrosis is observed from D1 for SM, whereas it is observed from D3 for CEES. From D7, the edges of the eschar begin to peel off in the SM group. SM lesions seem to be slightly more intense and deeper than with CEES. At the end of the experiment (D14), the SM and CEES lesions have a similar aspect, with the detachment of the eschar. In summary, skin lesions appear earlier with SM but present the same aspect at D14.

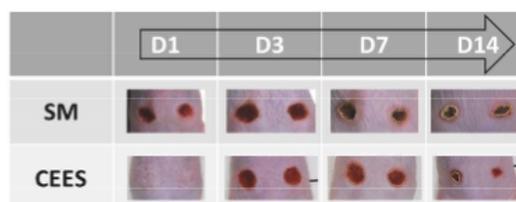


Fig. 2. Comparison of skin lesions after vapor exposure with CEES (30 min) and SM (8 min) at D1, D3, D7, and D14 post-exposure. Deep necrosis appears earlier with SM than with CEES (D1 instead of D3).

ITA values are significantly higher for CEES than for SM at D1: 86.6 ± 3.2 for CEES vs 14.0 ± 12.4 for SM ($p < 0.0001$) (Fig. 3A). No statistical significance for ITA values between CEES and SM is evidenced until the end of the experiment. In summary, CEES induces an eschar one day later than SM, but from D3 to the end of the study, the skin lesions have a similar intensity for both agents.

TEWL values are significantly lower for CEES than for SM at D1: 18.4 ± 3.7 g/m²h for CEES vs 126.9 ± 37.3 g/m²h for SM ($p < 0.0001$) (Fig. 3B). However, no statistical difference is evidenced from D3 until the end of the experiment. In summary, CEES disrupts the skin barrier at a slower rate compared to SM. Nevertheless, from D3 to the end of the study, TEWL values are similar for both agents.

Skin hydration values are significantly higher for CEES than for SM at D1: 33.5 ± 1.8 for CEES vs 24.6 ± 2.5 for SM ($p < 0.01$) (Fig. 3C). However, no statistical difference is evidenced from D3 until the end of the experiment. From D3, skin hydration values are close to 0 due to the presence of eschar for the CEES and SM groups. In summary, CEES induces less dehydration at D1 compared to SM. However, from D3 to the end of the study, hydration status is similar for both agents.

Lesion surfaces are smaller in the CEES group compared to SM at D1: 0.9 ± 0.5 mm² for CEES vs 17.6 ± 2.8 mm² for SM ($p < 0.0001$) (Fig. 3D). By contrast, CEES lesions are larger at D7: 29.4 ± 1.6 mm² vs 21.9 ± 1.3 mm², respectively ($p < 0.05$). Subsequently, no statistical difference is evidenced until the end of experiment (D14). In summary, lesion surfaces are smaller for CEES than for SM at the beginning of the experiment (D1), whereas CEES lesions are larger at D7, with similar lesion surfaces for both agents at D14 (data not shown).

The combined lesion score based on non-invasive skin parameters is in accordance with the observations described above. Lesions appear later with CEES than with SM: 8.3% for CEES vs 54.5% for SM at D1 (Fig. 3E). Nevertheless, values for CEES and SM are similar from D3 to D14: 92.0% vs 85.0% at D3 and 59.27% vs 52.57% at D14 for CEES and SM, respectively. In summary, the combined lesion score is in accordance with all the observations reported above regarding skin status.

3.3. Histology

Histological analysis shows inflammation, edema, deep necrosis (110 μ m depth), and intradermal blisters at D1 after SM exposure, whereas there is no necrosis but inflammation with edema after CEES exposure at D1 (Fig. 4B and C). Necrosis continues to spread, and some intradermal blisters are observed for SM at D3 and D7 (data not shown). At D3, blisters and necrosis are observed for CEES, but necrosis is thinner compared to SM (80 μ m for CEES vs 300 μ m for SM, data not shown). At D7, CEES-induced necrosis is slightly more extensive (370 μ m for CEES vs 300 μ m for SM, data not shown). At D14, eschar is peeling off for both agents, and new epidermis appears (Fig. 4D and E). In summary, skin lesions appear later for CEES than for SM. Nevertheless, at the end of the study period (D14), eschar detached for both agents, and re-epithelialization began.

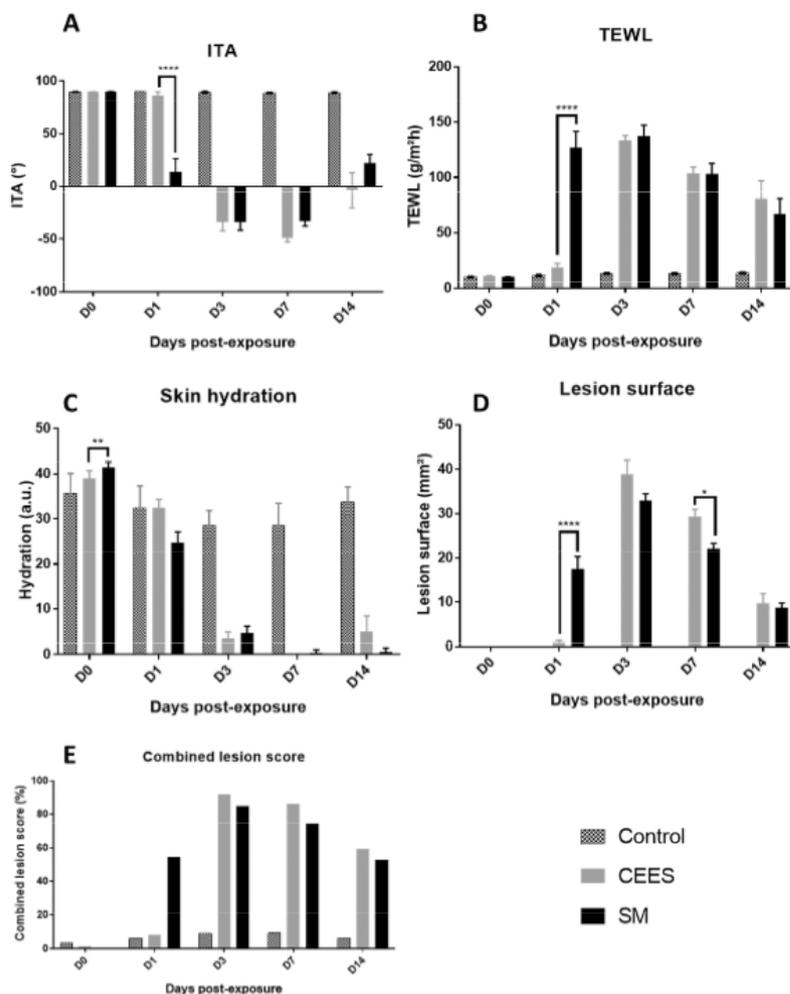


Fig. 3. : Comparisons of cutaneous parameters after vapor exposure with CEES (30 min) and SM (8 min). Comparisons between CEES and SM groups are depicted: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Animals were divided into eight groups of eight animals corresponding to D1, D3, D7, and D14 after CEES or SM exposure. A control group of seven animals was added. Recordings were performed daily on each animal until euthanasia on D1, D3, D7, or D14. (A) individual typology angle (ITA, °), (B) transepidermal water loss (TEWL, $g/m^2/h$), (C) skin hydration (a.u.), (D) lesion surface (mm^2), and (E) combined lesion score compiling these four non-invasive cutaneous parameters.

3.4. RT-qPCR

mRNAs of inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β and TNF α) are analyzed by RT-qPCR. Results are expressed in FC compared to the control group. Compared to control, FC of TNF α mRNA for CEES and SM groups are positive from D1 (2.8 for CEES vs 4.2 for SM) (Fig. 4A). Maximum FC of TNF α mRNA is observed at D7 for CEES (FC = 7.9) instead of D3 for SM (FC = 22.0). Moreover, the maximum amount of mRNA is lower with CEES than with SM. Regarding D3, FC is significantly lower with CEES than with SM (7.9 for CEES vs 22.0 for SM; $p < 0.005$). No significant difference is then observed at D7 and D14. Similarly, FC of IL-6 and IL-1 β mRNAs for CEES and SM groups compared to control are positive from D1 (Figs. 4B and 4C). Furthermore, FC are lower for CEES compared to SM. Indeed, for IL-6, FC is 26.7 for CEES and 122.6 for SM ($p < 0.0001$). For IL-1 β , FC is 13.78 for CEES vs 58.26 for SM ($p < 0.05$). No significance is thus evidenced from D3 for IL-6 and from D7 for IL-1 β . In summary, inflammation appears after D1 for both agents. Nevertheless, CEES-induced inflammation is weaker than for SM, with a maximum reached only later. However, similar levels of inflammation cytokine mRNAs are then observed at the end of

the experiment.

Compared to control, a decrease in KRT1 mRNA is observed from D1 after both CEES and SM exposure (Fig. 4D). At D7, KRT1 mRNA remains low for CEES (FC = 0.29), whereas the control level is recovered with SM (FC = 1.32). At D14, KRT1 mRNA increases with both agents (FC = 1.68 for CEES vs 2.64 for SM). Comparing CEES and SM, FC is significantly lower for CEES than for SM at D7 (FC = 0.29 vs 1.32, respectively; $p < 0.01$). A decrease in KRT1 signals the loss of keratinocytes induced by the lesion. By contrast, re-epithelialization involves new keratinocytes, with a corresponding increase in KRT1. In summary, after a drastic decrease in KRT1 with both agents from D1, re-epithelialization seems to occur later with CEES than with SM.

A decrease in MMP1 mRNA from D1 with SM is evidenced compared to control and CEES groups (Fig. 4E). For CEES, no significant difference is observed compared to control at any time. Additionally, a significant difference between CEES and SM groups is observed at D1. FC is 0.61 for CEES vs 0.09 for SM ($p < 0.005$). The mRNA level of MMP1a then returns close to the control level without significant differences between both agents (FC = 0.96 for CEES vs 0.75 for SM on D14; NS). In summary, no difference in MMP1a mRNA level is observed for CEES

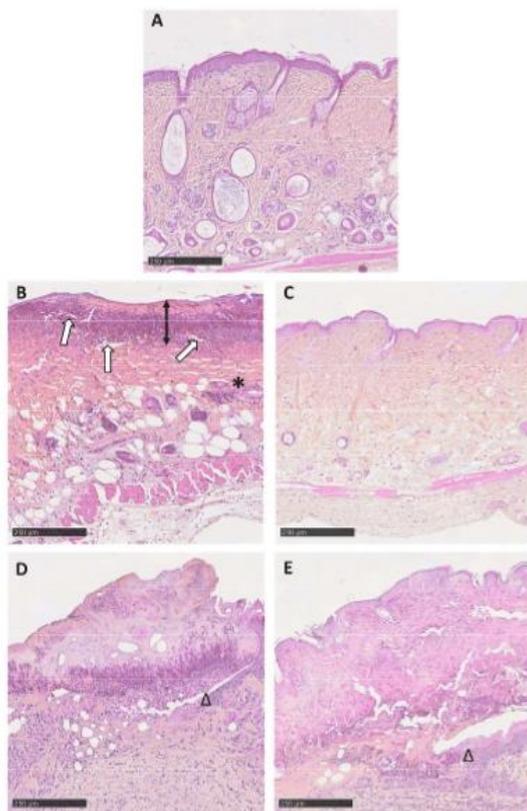


Fig. 4. Skin sections after SM or CEES exposure (8 min of vapor exposure for SM and 30 min for CEES), hematoxylin phloxin safran coloration, objective 10x. (A) control group, (B) SM group at D1 post-exposure, (C) CEES group at D1 post-exposure, (D) SM group at D14 post-exposure, and (E) CEES group at D14 post-exposure. *: inflammation, double arrow: necrosis depth, white arrow: intradermal blister, triangle: detachment of eschar and re-epithelialization. Bar represents 250 μ m length.

compared to the control group, whereas a decrease is observed at D1 for SM compared to control and CEES groups. However, at the end of the study, CEES and SM groups were similar to control.

Comparing CEES to SM, an increase in MMP9 mRNA is evidenced at D1 for CEES (FC = 4.85 for CEES vs 1.35 for SM) before decreasing at D3 (FC = 1.84 for CEES vs 4.42 for SM) (Fig. 4F). At D7 and D14, no significant difference between CEES and SM groups is observed. However, compared to control, an increase in MMP9 mRNA is still observed with both agents until the end of the experiment. Indeed, compared to control at D14, FC is 3.01 for CEES ($p < 0.001$) and 2.7 for SM ($p < 0.0001$). In summary, the increase in MMP9 mRNA occurs later with CEES (D3) than with SM (D1); the increase then continues with CEES and SM until D14 compared to control, although no difference between both agents is evidenced.

The expression of GJA1 mRNA increases in the CEES group compared to control and SM groups at D1 (FC = 2.13 for CEES vs 0.69 for SM; $p < 0.01$) (Fig. 4G). By contrast, no significant difference is observed for GJA1 mRNA in the SM group at D1 compared to control. From D3 to D14, the level of GJA1 mRNA increases in the SM group compared to control. Compared to control, FC is 2.31 for SM at D3 ($p < 0.01$), 3.57 at D7 ($p < 0.0001$) and 3.43 at D14 ($p < 0.0001$). In

summary, an increase in GJA1 mRNA is observed after CEES exposure only at D1 and from D3 to D14 for the SM group.

Since GJB2 and GJB6 mRNAs are modulated in the same way, only GJB6 is presented in Fig. 4H. Indeed, both increase from D3 with a lower level in CEES than in SM. Indeed, for GJB2 at D3, FC is 1.15 for CEES vs 14.13 for SM ($p < 0.01$). For GJB6 at D3, FC is 1.75 for CEES vs 21.89 for SM ($p < 0.01$). GJB2 and GJB6 levels increased until D14 for both agents, though with a lower level of mRNAs for CEES. For GJB2 at D14, FC is 7.98 for CEES vs 17.65 for SM ($p < 0.0001$). For GJB6 at D14, FC is 23.44 for SM vs 10.56 for CEES ($p < 0.0001$). In summary, a progressive increase in GJB2 and GJB6 mRNAs is observed after CEES and SM exposure from D3 to the end of the experiment. Levels are lower after CEES exposure compared to SM (Fig. 5).

4. Discussion

To evaluate the pertinence of CEES as an analog of SM, we set up a new model of CEES vapor exposure to be as close as possible to SM vapor exposure (Vallet et al., 2012). For this purpose, an animal model was necessary to perform clinical observations for 14 days. The chosen animal model was SKH-1 mice, which are currently used in wound healing studies, and more specifically, in SM studies (Vallet et al., 2012; Tewari-Singh et al., 2013; Dorandeu et al., 2010; Benavides et al., 2009). Hairless guinea pigs are another model frequently used in SM studies. Nevertheless, because guinea pigs are more sensitive to SM than hairless mice, SKH-1 was preferred considering the cost-suitability of this model (Smith et al., 1997; Langenberg et al., 1998; Kan et al., 2003; Benson et al., 2011). Since the final objective of this study was to obtain a model to screen therapeutics, the pig model was not considered, even though pig skin is closer to human skin (Sabourin et al., 2002). We previously defined the parameters of CEES exposure in terms of delay and volume (data not shown). This new model of CEES exposure allowed us to obtain well-defined and reproducible lesions without lethality. Moreover, exposure parameters are close to those of SM, since only their duration differs. Indeed, animals were exposed to CEES vapors for 30 min and to SM vapors for 8 min. A longer CEES exposure duration could reduce the apparition delay of the lesions, although lethality could occur. Moreover, a higher volume of CEES could induce liquid exposure and not only vapor exposure. Since the same healing status was observed at D14, we decided not to lengthen the duration of CEES exposure or increase the volume.

To assess the lesions, a scoring grid is often used (Dorandeu et al., 2011; Tewari-Singh et al., 2013; Benson et al., 2011), although this method has the disadvantage of being subjective and operator-dependent. We therefore preferred the use of objective measurements using an apparatus for skin exploration. The combined lesion score, which compiles the measured cutaneous parameters, is in accordance with clinical observations. Lesion surfaces are higher for CEES than SM. The difference between CEES- and SM-lesioned surfaces could be explained by the lower penetration of CEES and its broader spread. We may question the difference between both agents in terms of their penetration. The difference between the chemical structures of CEES and SM may be responsible for a difference in lipophilic properties, and consequently, for the difference in the penetration power, surface, and depth of the lesions. Moreover, SM is a bifunctional alkylating agent that forms intra- and intermolecular crosslinks, whereas CEES is a monofunctional alkylating agent (Shakarjian et al., 2010). Since the same lesions are induced by CEES and SM, bi-alkylation of SM would not be critical for skin injury (Shakarjian et al., 2010). Moreover, NM, as the other SM analog, is also a bi-alkylating agent, although it does not induce the same aspect of the lesions as those induced by SM (Tewari-Singh et al., 2013). Besides, NM is hydrophilic (Tewari-Singh et al., 2013) which impacts skin penetration and pharmacodynamic properties.

Both CEES and SM lead to DNA adducts. In particular, SM formed adducts with guanine (N7-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]-guanine)

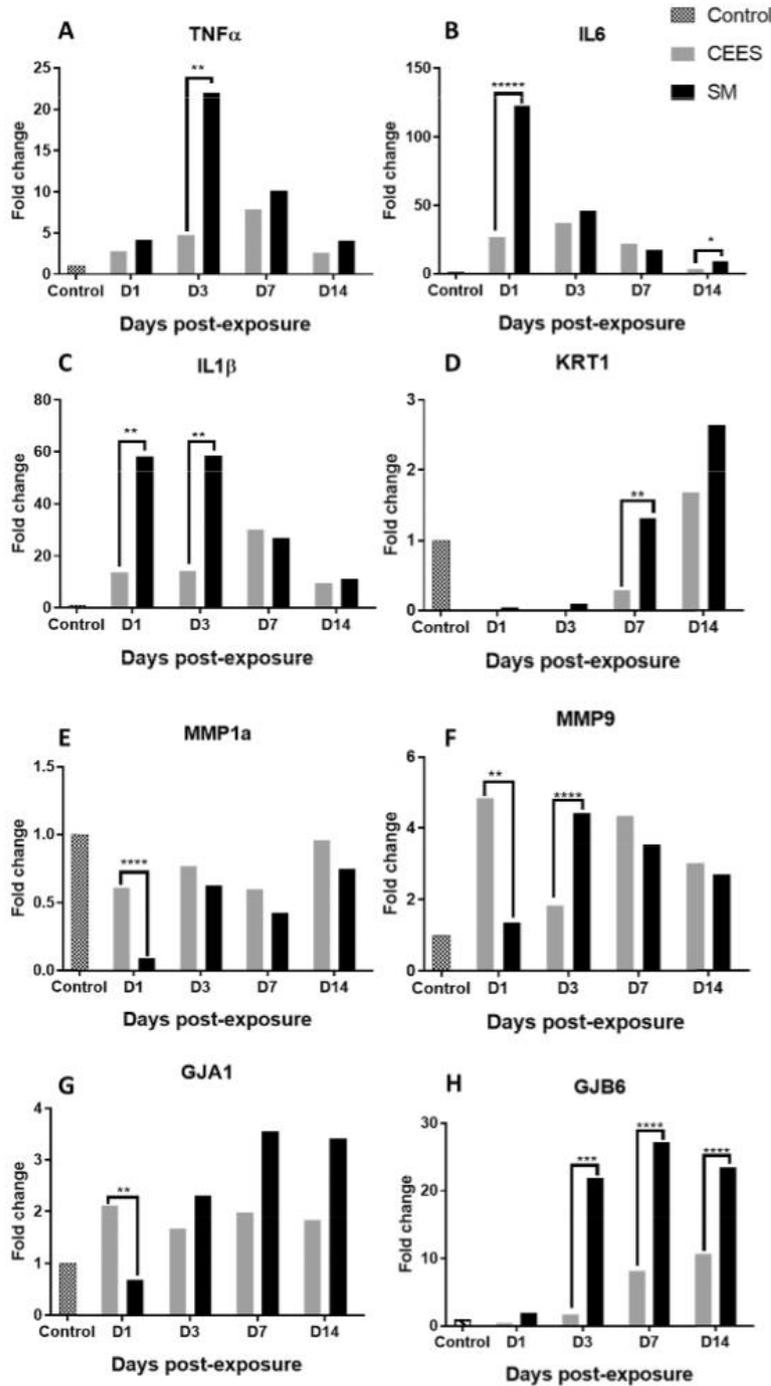


Fig. 5. Skin mRNA expressions after CEES or SM vapor exposure (respectively, 30 and 8 min) at D1, D3, D7, and D14 post-exposure, expressed in fold changes (FC) compared to control. (A) TNF α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) KRT1, (E) MMP1a, (F) MMP9, and (G) GJA1. Comparisons between SM and CEES groups: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Animals were divided into eight groups of eight animals corresponding to D1, D3, D7, and D14 after CEES or SM exposure. A control group of seven animals was added.

(Xu et al., 2014). Moreover, the recent study of Gilardoni et al. (2021) shows that after skin exposure to CEES on SKH-1, the adduct of CEES with guanine (2-ethyl-thioethyl-N7-guanine) is also detected in plasma and brain (Gilardoni et al., 2021). Other adducts with glutathione, cysteine, and N-acetylcysteine have also been detected, suggesting similar targets (Gilardoni et al., 2021). Similar to SM, CEES adducts were detected in brain, thus confirming the internal penetration of CEES (Gilardoni et al., 2021; Batal et al., 2015).

The analysis of inflammatory biomarkers allowed us to observe that inflammation is higher with SM compared to CEES. Our results are consistent with the literature, since inflammatory cytokine mRNAs rapidly increased after SM exposure (Sabourin et al., 2000, 2002; Kehe et al., 2008; Arroyo et al., 2000). Few in vivo studies explore inflammatory markers after CEES exposure. Indeed, most of the studies using CEES were conducted in vitro or after respiratory exposure. However, these studies describe an increase in inflammatory markers such as TNF α (Wormser et al., 2005) as well as oxidative stress with the activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B after CEES exposure (Pal et al., 2009).

Both gelatinases (such as MMP-9) and collagenases (such as MMP-1) belong to the metalloproteinase (MMP) family, which is involved in wound healing (Jablonska-Trypuc et al., 2016; Gill and Parks, 2008). Gelatinases are involved in blister formation by disrupting the dermal-epidermal junction (Shakarjian et al., 2010) as observed in humans after SM intoxication (Kehe et al., 2008). In the literature, MMP-9 increased in acute wounds and remained high in chronic wounds, thus indicating uncontrolled proteolysis characteristic of delayed healing (Tarlton et al., 1997). Another study demonstrated that MMP-9 secretion was enhanced after in vitro SM skin exposure due to the release by keratinocytes of soluble factors that also enhance the invasiveness of fibroblasts (Ries et al., 2009). Therefore, the observed increases in MMP-9 after CEES and SM skin exposure are consistent with the literature, thus indicating that CEES would be a good analog of SM in terms of MMP-9 regulation. MMP-1 remains elevated in chronic wounds, suggesting that its gradual decrease is important for the healing process (Caley et al., 2015). Indeed, MMP-1 activity is necessary for keratinocyte migration over the dermal matrix by lessening the affinity of collagen-integrin contacts (Gill and Parks, 2008; Pilcher et al., 1997). In the present study, with both agents, the MMP-1 mRNA profile differed from the profile described for acute or chronic wounds, suggesting an effect of CEES and SM on this metalloproteinase. MMP-1 would therefore be interesting to focus on and could be a potential target for therapeutic drugs.

The present study analyzed the profile of three major connexins (Cx) involved in skin healing: Cx-26, Cx-30, and Cx-43. The decrease in Cx-43 ensures, in particular, the migration of fibroblasts, the proliferation of keratinocytes, and the decrease in inflammation (Zhang and Cui, 2017; Wong et al., 2016). In chronic wounds, high levels of GJA1 (Cx-43) are observed instead of a decrease (Zhang and Cui, 2017). High levels of Cx-43 would contribute to the chronicity of the wound. The down-regulation of Cx-43 is therefore considered a prerequisite for skin healing (Kretz et al., 2003). After CEES and SM exposure, we found no decrease in Cx-43, and therefore the impact of both agents on Cx-43 would contribute to the impairment of skin healing. Treatment for chronic wounds using Cx-43 modulators such as antisense or peptide (Qiu et al., 2003; Coutinho et al., 2005; Laird and Lampe, 2018) could therefore be tested on CEES- or SM-induced lesions.

Because lesions appear later with CEES compared to SM, it is necessary to take into account the delay for testing treatments or skin decontamination devices. The first days after CEES exposure are not relevant for testing the effectiveness of treatments or skin decontamination devices, because the absence of apparent lesions can lead to an overevaluation of effectiveness. However, thanks to the present pathophysiological study, the protocols and observations in terms of the delays can be adapted to provide valuable results with CEES.

5. Conclusion

Few studies have evaluated the pertinence of CEES as an analog of SM from a pathophysiological point of view. In the present paper, CEES and SM were compared in terms of their clinical aspect, histology, and molecular biology. The present results showed a different apparition delay of skin lesions after CEES and SM exposure, with a greater impact of SM during the first days after exposure. However, at the end of the study, lesions induced with both agents are similar. Therefore, CEES appears to be a relevant SM analog to test skin therapies and decontamination devices while taking into account the latency of the apparition of lesions. CEES has the advantage of being handled in standard laboratories, as it is not restricted by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons. It could therefore be used in civilian laboratories to obtain preliminary data before performing tests with SM. However, considering the similar clinical effects observed after CEES and SM exposure, precautions for CEES handling should be taken in the laboratory environment.

Funding

This work was supported by French Ministry of Defense: Direction Générale de l'Armement, FRANCE (Biomedef PDH-NRBC-4-C-4201) and Service de Santé des Armées, FRANCE.

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.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr Laure Barbier, Dr Anne-Laure Favier, Dr Krisztina Nikovics, Xavier Butigieg, and Muriel Berthelot for their kind assistance and expertise.

References

- Arroyo, C.M., Schafer, R.J., Kurt, E.M., Broomfield, C.A., Carmichael, A.J., 2000. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: cytokine release. *J. Appl. Toxicol.* 20 (Suppl 1), S63–S72.
- Batal, M., Rebelo-Moreira, S., Hamon, N., Bayle, P.A., Mouret, S., Clery-Barraud, C., et al., 2015. A guanine-ethylthioethyl-glutathione adduct as a major DNA lesion in the skin and in organs of mice exposed to sulfur mustard. *Toxicol. Lett.* 233 (1), 1–7.
- Benavides, F., Oberszyn, T.M., VanBuskirk, A.M., Reeve, V.E., Kusewitt, D.F., 2009. The hairless mouse in skin research. *J. Dermatol. Sci.* 53 (1), 10–18.
- Benson, J.M., Seagrave, J., Weber, W.M., Santistevan, C.D., Grotendorst, G.R., Schultz, G. S., et al., 2011. Time course of lesion development in the hairless guinea-pig model of sulfur mustard-induced dermal injury. *Wound Repair Regen.* 19 (3), 348–357.
- Caley, M.P., Martins, V.L., O'Toole, E.A., 2015. Metalloproteinases and wound healing. *Adv. Wound Care* 4 (4), 225–234.
- Coutinho, P., Qiu, C., Frank, S., Tamber, K., Becker, D., 2003. Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol. Int.* 27 (7), 525–541.
- Coutinho, P., Qiu, C., Frank, S., Wang, C.M., Brown, T., Green, C.R., et al., 2005. Limiting burn extension by transient inhibition of Connexin43 expression at the site of injury. *Br. J. Plast. Surg.* 58 (5), 658–667.
- De Paep, K., Houben, E., Adam, R., Wiesemann, F., Rogiers, V., 2005. Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res. Technol.* 11 (1), 61–69.
- Dorandeu, F., Taysse, L., Boudry, L., Foquin, A., Herodin, F., Mathieu, J., et al., 2010. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse. (I) Development of a model for screening studies in skin decontamination and protection. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 6.
- Dorandeu, F., Taysse, L., Boudry, L., Foquin, A., Hérodin, F., Mathieu, J., et al., 2011. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse. (II) Development of a model for screening studies in skin decontamination and protection. *Hum. Exp. Toxicol.* 30 (6), 470–490.
- Escobar-Chavez, J.J., López-Cervantes, M., Aarti, N., Yogeshvar, K., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., 2006. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9 (3), 339–358.

- Gilardoni, M., Léonço, D., Caffin, F., Gros-Désormeaux, F., Eldin, C., Béal, D., et al., 2021. Evidence for the systemic diffusion of (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide, a sulfur mustard analog, and its deleterious effects in brain. *Toxicology* 462, 152950.
- Gill, S.E., Parks, W.C., 2008. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (6–7), 1334–1347.
- Graham, J.S., Schoneboom, B.A., 2013. Historical perspective on effects and treatment of sulfur mustard injuries. *Chemico-Biol. Interact.* 206 (3), 512–522.
- Graham, J.S., Chilcott, R.P., Rice, P., Milner, S.M., Hurst, C.G., Mallner, B.L., 2005. Wound healing of cutaneous sulfur mustard injuries: strategies for the development of improved therapies. *J. Burns Wounds* 4, e1.
- Jablonska-Trypuc, A., Matejczyk, M., Rosochacki, S., 2016. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31 (sup1), 177–183.
- Jain, A.K., Tewari-Singh, N., Orlicky, D.J., White, C.W., Agarwal, R., 2011. 2-Chloroethyl ethyl sulfide causes microvesiculation and inflammation-related histopathological changes in male hairless mouse skin. *Toxicology* 282 (3), 129–138.
- Jowsey, P.A., Williams, F.M., Blain, P.G., 2009. DNA damage, signalling and repair after exposure of cells to the sulphur mustard analogue 2-chloroethyl ethyl sulphide. *Toxicology* 257 (3), 105–112.
- Kan, R.K., Pleva, C.M., Hamilton, T.A., Anderson, D.R., Petralli, J.P., 2003. Sulfur mustard-induced apoptosis in hairless guinea pig skin. *Toxicol. Pathol.* 31 (2), 185–190.
- Kehe, K., Balszuweit, F., Emmler, J., Kreppel, H., Jochum, M., Thiermann, H., 2008. Sulfur mustard research—strategies for the development of improved medical therapy. *Eplasty* 8, e32.
- Kretz, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., 2003. Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J. Cell Sci.* 116 (Pt 16), 3443–3452.
- Laird, D.W., Lampe, P.D., 2018. Therapeutic strategies targeting connexins. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (12), 905–921.
- Langenberg, J.P., van der Schans, G.P., Spruit, H.E., Kullpers, W.C., Mars-Groenendijk, R. H., van Dijk-Knijnenburg, H.C., et al., 1998. Toxicokinetics of sulfur mustard and its DNA-adducts in the hairless guinea pig. *Drug Chem. Toxicol.* 21 (sup1), 131–147.
- Mérat, S., Perez, J.P., Rüttimann, M., Bordier, E., Lienhard, A., Lenoir, B., et al., 2003. Intoxication aiguë par arme chimique vésicante: l'ypérite. *Ann. Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 22 (2), 108–118.
- Pal, A., Tewari-Singh, N., Gu, M., Agarwal, C., Huang, J., Day, B.J., et al., 2009. Sulfur mustard analog induces oxidative stress and activates signaling cascades in the skin of SKH-1 hairless mice. *Free Radic Biol. Med.* 47 (11), 1640–1651.
- Papp, A., Lahtinen, T., Härmä, M., Nuutinen, J., Uusaro, A., Alhava, E., 2006. Dielectric measurement in experimental burns: a new tool for burn depth determination? *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 3.
- Paromov, V., Suintres, Z., Smith, M., Stone, W.L., 2007. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *J. Burns Wounds* 7, e7.
- Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G., Parks, W.C., 1997. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J. Cell Biol.* 137 (6), 1445–1457.
- Qiu, C., Coutinho, P., Frank, S., Franke, S., Law, L.Y., Martin, P., 2003. Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr. Biol.* 13 (19), 1697–1703.
- Ries, C., Popp, T., Egea, V., Kehe, K., Jochum, M., 2009. Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: upregulation in response to sulphur mustard. *Toxicology* 263 (1), 26–31.
- Rose, D., Schmidt, A., Brandenburger, M., Sturmheit, T., Zille, M., Boltze, J., 2018. Sulfur mustard skin lesions: a systematic review on pathomechanisms, treatment options and future research directions. *Toxicol. Lett.* 293, 82–90.
- Rowell, M., Kehe, K., Balszuweit, F., Thiermann, H., 2009. The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology* 263 (1), 9–11.
- Sabourin, C.L., Danne, M.M., Buxton, K.L., Casillas, R.P., Schlager, J.J., 2002. Cytokine chemokine, and matrix metalloproteinase response after sulfur mustard injury to weanling pig skin. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (6), 263–272.
- Sabourin, C.L., Danne, M.M., Buxton, K.L., Casillas, R.P., Schlager, J.J., 2002. Cytokine chemokine, and matrix metalloproteinase response after sulfur mustard injury to weanling pig skin. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (6), 263–272.
- Sabourin, C.L.K., Petralli, J.P., Casillas, R.P., 2000. Alterations in inflammatory cytokine gene expression in sulfur mustard-exposed mouse skin. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 6.
- Sawyer, T.W., 2020. Chapter 19 – A century of sulphur mustard research: a time for recalibration?: Nato - Technical Report RDP; 2020. Report No.: STO-TR-HFM-253. Publisher: STO (from NATO) <https://www.sto.nato.int/publications/STO%20Technical%20Reports/Forms/Technical%20Report%20Document%20Set/docsethomepage.aspx?ID=4454&FolderCTID=0x0120D5200078F9E87043356C409A0D30823AFA16F6010066D541ED10A62C40B2AB0FE9841A61&List=92d5819c-e6ec-4241-aa4e-57b918681b1&RootFolder=https://www.sto.nato.int/publications/STO%20Technical%20Reports/STO-TR-HFM-253>.
- Shakarjian, M.P., Heck, D.E., Gray, J.P., Smko, P.J., Gordon, M.K., Casillas, R.P., 2010. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicol. Sci.* 114 (1), 5–19.
- Smith, K.J., Casillas, R., Graham, J., Skelton, H.G., Stemler, F., Hackley Jr., B.E., 1997. Histopathologic features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *J. Dermatol. Sci.* 14 (2), 126–135.
- Smith, K.J., Casillas, R., Graham, J., Skelton, H.G., Stemler, F., Hackley, B.E., 1997. Histopathologic features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *J. Dermatol. Sci.* 14 (2), 126–135.
- Sutcliffe, J.E., Chin, K.Y., Thrasivoulou, C., Serena, T.E., O'Neil, S., Hu, R., 2015. Abnormal connexin expression in human chronic wounds. *Br. J. Dermatol.* 173 (5), 1205–1215.
- Swetha Inturi, N.T.-S., Gu, Mallikarjuna, Shrotriya, Sangeeta, Gomez, Joe, Agarwal, Chapla, Carl, W., White, Agarwal, Rajesh, 2011. Mechanisms of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced DNA damage in skin epidermal cells and fibroblasts. *Free Radic Biol. Med.* 51 (12), 21.
- Tagami, H., Kobayashi, H., Kikuchi, K., 2002. A portable device using a closed chamber system for measuring transepidermal water loss: comparison with the conventional method. *Skin Res. Technol.* 8 (1), 7–12.
- Tarleton, J.F., Vickery, C.J., Leaper, D.J., Bailey, A.J., 1997. Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. *Br. J. Dermatol.* 137 (4), 506–515.
- Tewari-Singh, N., Jain, A.K., Inturi, S., White, C.W., Agarwal, R., 2013. Clinically-relevant cutaneous lesions by nitrogen mustard: useful biomarkers of vesicants skin injury in SKH-1 hairless and C57BL/6 mice. *PLOS One* 8 (6), e67557.
- Tewari-Singh, N., Rana, S., Gu, M., Pal, A., Orlicky, D.J., White, C.W., 2009. Inflammatory biomarkers of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced skin injury in SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Sci.* 108 (1), 194–206.
- 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 (2), 450–459.
- Vallet, V., Poyot, T., Clery-Barraud, C., Coulon, D., Sentenac, C., Peinnequin, A., 2012. Acute and long-term transcriptional responses in sulfur mustard-exposed SKH-1 hairless mouse skin. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 31 (1), 38–47.
- Wong, P., Tan, T., Chan, C., Laxton, V., Chan, Y.W., Liu, T., et al., 2016. The role of connexins in wound healing and repair: novel therapeutic approaches. *Front. Physiol.* 7, 596.
- Wormser, U., Brodsky, B., Proscura, E., Foley, J.F., Jones, T., Nyska, A., 2005. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in sulfur mustard-induced skin lesion; effect of topical iodine. *Arch. Toxicol.* 79 (11), 660–670.
- Xu, H., Nie, Z., Zhang, Y., Li, C., Yue, L., Yang, W., et al., 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.
- Zhang, X.F., Cui, X., 2017. Connexin 43: key roles in the skin. *Biomed. Rep.* 6 (6), 605–611.

Résultats complémentaires : immunomarquage de la connexine-43

Des expériences complémentaires d'immunomarquage de la connexine-43 ont été réalisées sur des biopsies cutanées de souris témoins non exposées et de souris exposées au CEES ou à l'ypérite.

A J1, le marquage de la Cx-43 est très faible sur la coupe de peau exposée à l'ypérite (Figure 41 B), tandis que la coupe de peau exposée au CEES (Figure 41 C) présente un marquage plus intense que la coupe de peau saine (Figure 41 A). La faible intensité de marquage sur la coupe ypérite s'explique par la forte nécrose déjà observée avec la coloration HPS. En effet, les tissus nécrosés sont détruits, les protéines coagulées (242), empêchant la fixation de l'anticorps.

A J14, les coupes ypérite et CEES présentent toutes deux une forte intensité de marquage de la Cx-43, diffuse sur toutes les strates de la peau, suggérant la réépithélialisation sous la croûte qui se détache (Figure 41 D et E).

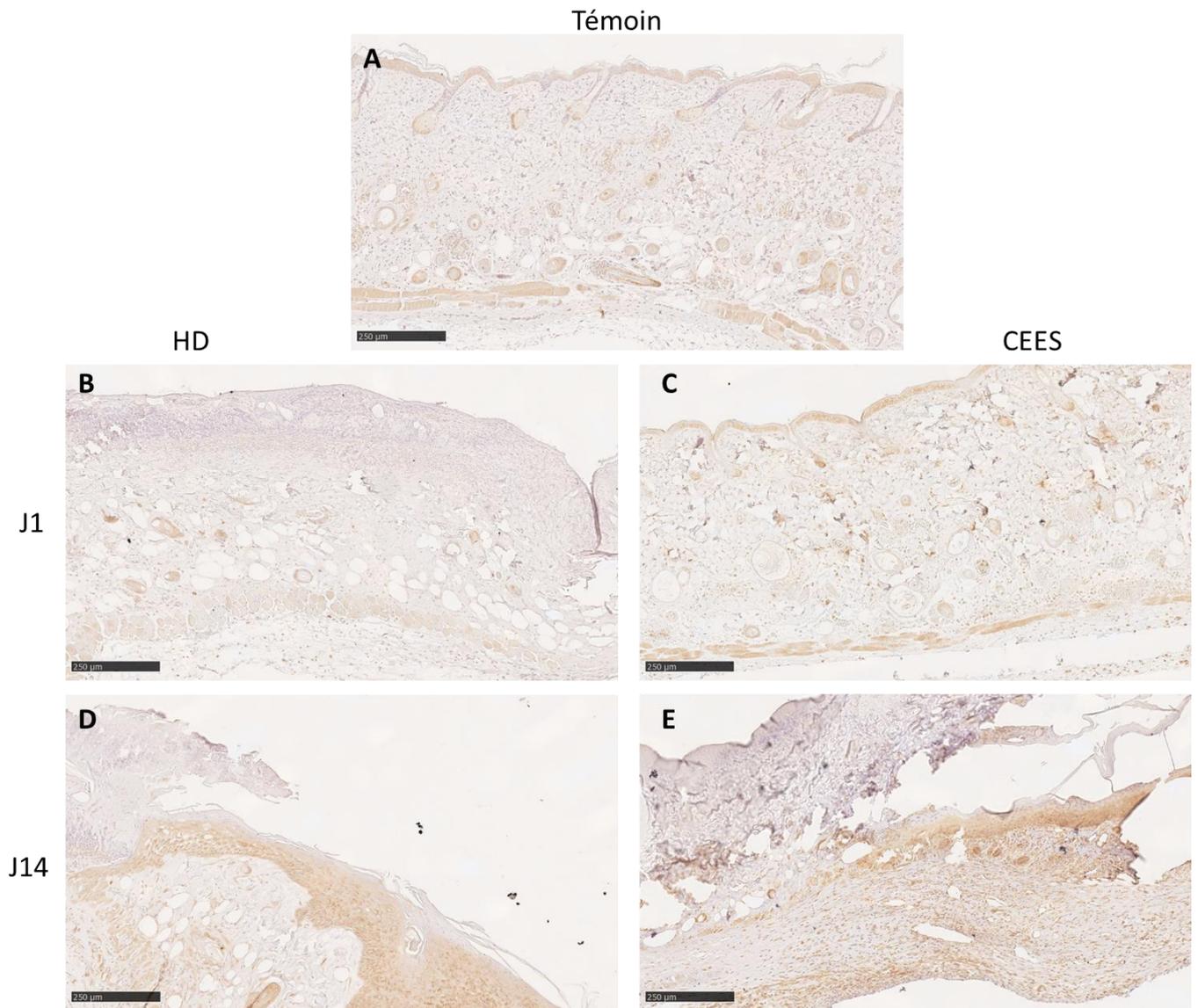


Figure 41 : Immunomarquage de la Cx-43 sur des biopsies de peau de souris SKH-1, révélation au DAB, objectif x10.

A) peau non-exposée, **B)** peau exposée à l'ypérite à J1 **C)** peau exposée au CEES à J1 **D)** peau exposée à l'ypérite à J14 **E)** peau exposée au CEES à J14

A J1, l'immunomarquage de la protéine Cx-43 est plus intense chez les souris exposées au CEES. Les souris exposées à l'ypérite présentent une forte nécrose empêchant l'immunomarquage. A J14, les coupes CEES et HD présentent toutes les deux un fort marquage de la Cx-43 sous la croûte qui se détache.

IV.1.3 Résultats objectif 3 : Evaluation de l'efficacité de molécules agissant sur la connexine 43 sur les lésions induites par le CEES

Une augmentation des ARNm de la connexine 43 a été observée au premier jour post-exposition au CEES, or sa diminution est une étape importante de la cicatrisation. Un lien entre la chronicité des plaies et l'absence de diminution de la Cx-43 est par ailleurs décrit (120). Les lésions induites par des agents vésicants s'apparentant à des lésions chroniques, nous avons émis l'hypothèse que la chronicité de ces lésions pouvait être liée à une dysrégulation de la Cx-43. Nous avons donc évalué deux molécules agissant sur la Cx-43 : le peptide ACT1 et l'oligonucléotide antisens (ASODN), sur des lésions induites par le CEES. En effet, une augmentation de la Cx-43 a été observée un jour après l'exposition cutanée au CEES.

Selon le protocole défini précédemment, les souris ont été exposées au CEES durant 30 minutes. Elles ont ensuite été décontaminées, 4 h après exposition, par des compresses d'eau savonneuse puis d'eau. Les molécules candidates ACT1, ASODN, ou le véhicule Pluronic® F-127 ont été appliqués sur les zones exposées à J0+4h, J1, J2 et J3 (Figure 42). Les animaux ont été répartis en plusieurs groupes avec n = 23 pour le groupe CEES et n = 20 pour les groupes CEES Pluronic, CEES ACT1, CEES ASODN. Un suivi des animaux a été réalisé pendant un maximum de 14 jours. A J1, J3, J7 et J14, 5 souris de chaque groupe ont été sacrifiées. Les répartitions des groupes sont fournies en Annexe VIII. Trois groupes de souris témoins, témoins ACT1 et témoins ASODN ont été ajoutés afin de vérifier l'absence d'effet irritant des molécules seules.

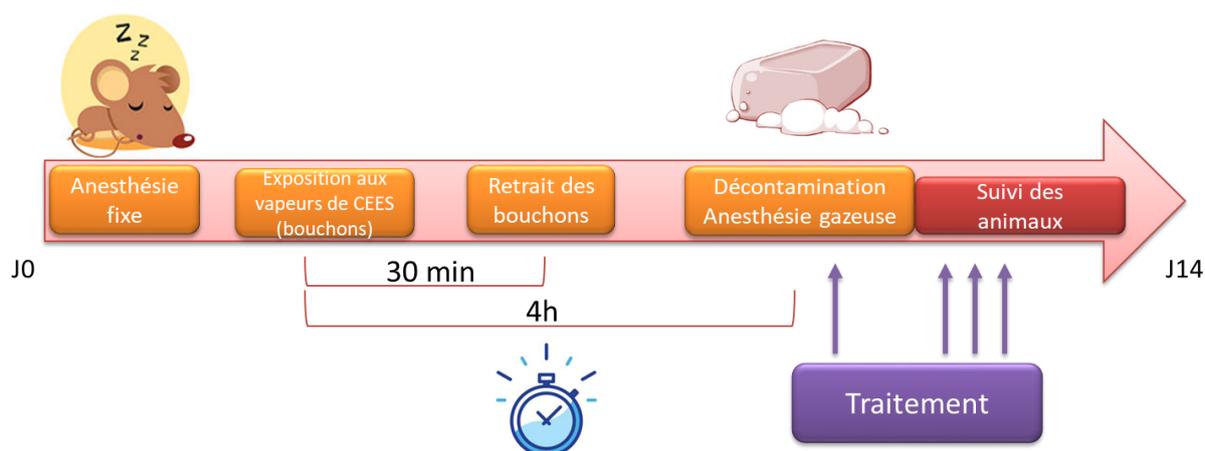


Figure 42 : Protocole d'exposition aux vapeurs de CEES et traitement des animaux à J0+4h, J1, J2 et J3.

Suivi pondéral

Les animaux ont été pesés quotidiennement. La Figure 43 représente la prise de poids des animaux au cours de l'étude. Une perte de poids durant les premiers jours post-exposition a été observée pour tous les groupes, y compris pour les souris n'ayant pas été en contact avec le CEES. Les variations de poids étaient comprises entre $- 7,1 \pm 1,7 \%$ (CEES ACT1 à J2) et $+ 5,2 \pm 2,4 \%$ (Témoins à J13). Cette perte de poids est donc imputable au protocole d'exposition qui comprend une anesthésie fixe puis une anesthésie gazeuse (pour la décontamination), mais non au CEES. Les souris témoins n'ayant été ni exposées au CEES, ni traitées, ont retrouvé leur poids initial plus rapidement (autour de J3-J4) par rapport aux autres groupes. Cependant, aucune différence significative entre les groupes n'a été observée tout au long de l'étude.

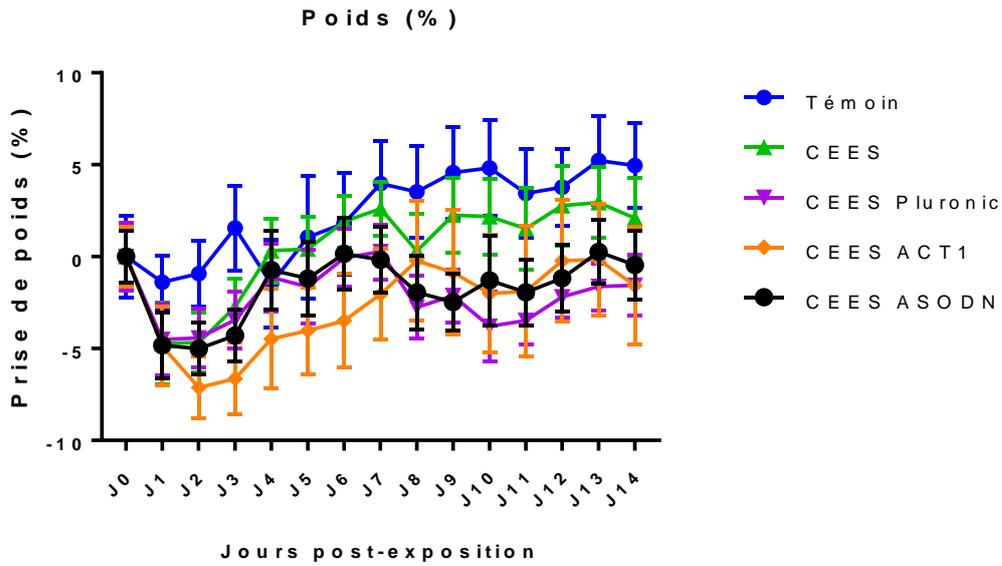


Figure 43 : Variation de poids des souris (%) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours)

Aucune significativité entre les groupes n'a été observée.

Il n'est pas observé de différence significative sur la prise de poids entre les différents groupes de souris.

Aspect des lésions

Les souris témoins non exposées au CEES ainsi que les souris témoins traitées avec l'ACT1 ou l'ASODN n'ont pas présenté d'irritation (Figure 44).



Figure 44 : Aspect cutané des souris témoins non exposées, traitées avec ASODN ou ACT1. Aucune souris n'a présenté d'érythème consécutif à l'application des molécules candidates.

L'observation visuelle des souris exposées au CEES et traitées avec le véhicule Pluronic® F-127 ou les deux molécules (ASODN et ACT1) n'a pas montré d'amélioration de l'aspect des lésions ou de la cicatrisation (Figure 45). En effet, une nécrose marquée est visible à J3 dans les différents groupes. La nécrose devient de plus en plus profonde puis ses bords commencent à se détacher pour tous les groupes en fin de procédure (J14).

Par la suite, pour des raisons de lisibilité des figures, seuls les groupes CEES, CEES Pluronic, CEES ACT1 et CEES ASODN seront représentés et comparés, puisque les groupes témoins n'ont pas présenté d'irritation.

	Souris CEES	Souris CEES + Pluronic (véhicule)	Souris CEES + ASODN	Souris CEES + ACT1
J1				
J3				
J7				
J14				

Figure 45 : Aspect des lésions après exposition au CEES puis traitement des souris avec le véhicule Pluronic® F-127, ASODN ou ACT1.

Aucune accélération visible de la cicatrisation n'a été observée après traitement avec ASODN ou ACT1.

Suivi cutané

Surface des lésions

Les surfaces des lésions ont été mesurées quotidiennement, puis des comparaisons entre les différents groupes de souris ont été réalisées. Des différences significatives ont été observées à J2 (Figure 46) : les souris CEES présentent une surface moyenne de lésion plus faible ($13,9 \pm 3,8 \text{ mm}^2$) que les souris CEES Pluronic ($27,8 \pm 4,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$), et que les souris CEES ASODN ($21,7 \pm 3,8 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$). Les souris CEES Pluronic présentent une surface moyenne de lésions plus grande que les souris CEES ACT1 ($27,8 \pm 4,1 \text{ mm}^2$ vs $19,6 \pm 3,7 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$). A J2, le véhicule Pluronic® F-127 et l'ASODN ont donc augmenté la surface des lésions par rapport aux souris exposées au CEES et non traitées. L'ACT1 a permis d'obtenir des surfaces de lésions similaires avec les souris CEES. Durant le reste de l'étude, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités. Les surfaces des lésions ont atteint leur maximum à J3, quel que soit le groupe, puis ont progressivement diminué jusqu'à la fin de la procédure (J14). Le traitement avec les molécules candidates ACT1 et ASODN n'a donc pas permis de diminuer significativement la taille des lésions.

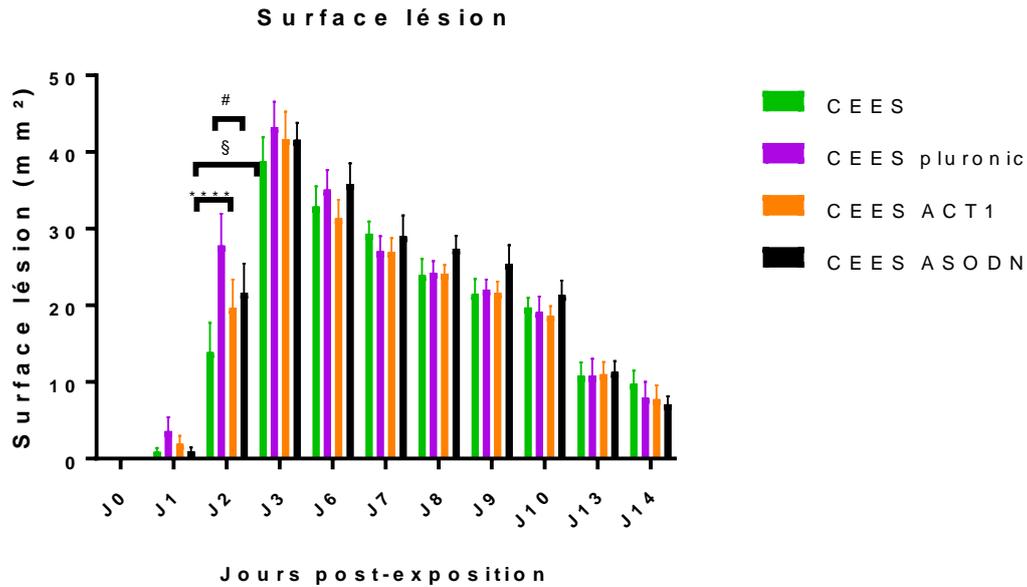


Figure 46 : Surface des lésions (mm²) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours). Comparaisons CEES vs CEES Pluronic **** $p < 0,0001$; CEES vs CEES ASODN § $p < 0,5$; CEES Pluronic vs CEES ACT1 # $p < 0,05$.

A J2, les souris traitées avec le véhicule Pluronic® F-127 et l'ASODN ont présenté des surfaces moyennes de lésions supérieures à celles des souris CEES. Les souris traitées avec l'ACT1 ont présenté des surfaces de lésions similaires à celles des souris CEES. L'ASODN et l'ACT1 n'ont donc pas permis de diminuer la surface moyenne des lésions.

Teinte de la peau (ITA)

L'ITA (Individual Topology Angle) permet de mesurer la teinte de la peau. Plus l'angle est faible, plus la teinte est foncée. Dans notre étude, les souris ayant le même phototype, un ITA faible signe la présence d'une croûte. Des différences significatives ont été observées à J2 (Figure 47). Les souris CEES ont présenté un ITA plus élevé ($40,3 \pm 13,3^\circ$) que les souris CEES Pluronic ($- 21,1 \pm 15,8^\circ$, $p < 0,0001$) et CEES ASODN ($- 4,8 \pm 15,9^\circ$, $p < 0,001$). Les souris CEES Pluronic ont présenté un ITA plus faible que les souris CEES ACT1 ($13,4 \pm 16,0^\circ$, $p < 0,05$).

Aucune différence significative n'a été observée durant le reste de l'étude. A J14, les valeurs d'ITA sont proches de 0 dans tous les groupes. A J14, les croûtes commencent à se décoller ou à être arrachées par les animaux.

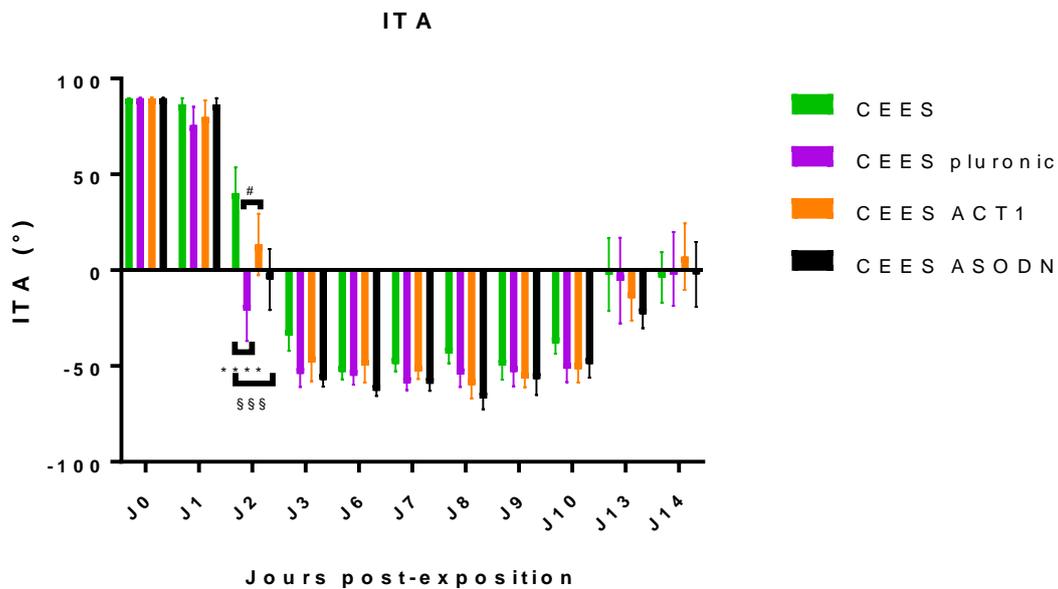


Figure 47 : Individual Topology Angle (ITA, °) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours).

Comparaisons CEES vs CEES Pluronic **** $p < 0,0001$; CEES vs CEES ASODN §§§ $p < 0,001$; CEES Pluronic vs CEES ACT1 # $p < 0,05$

A J2, les souris traitées avec le véhicule Pluronic® F-127 et l'ASODN ont présenté des ITA plus faibles que les souris CEES. Les souris traitées avec l'ACT1 ont présenté des ITA similaires aux souris CEES.

L'ASODN et l'ACT1 n'ont donc pas permis de modifier la cinétique de formation de la croûte.

Perte insensible en eau (PIE)

La Perte Insensible en Eau (PIE) a été mesurée quotidiennement afin d'évaluer la restauration de la fonction barrière de la peau. A J2, les souris CEES ont présenté une PIE plus faible ($82,8 \pm 11,5 \text{ g/m}^2\text{h}$) que les souris CEES Pluronic ($118,9 \pm 7,9 \text{ g/m}^2\text{h}$, $p < 0,001$) et CEES ASODN ($115,7 \pm 19,1 \text{ g/m}^2\text{h}$, $p < 0,001$) (Figure 48). Aucune différence significative n'a été observée durant la suite de l'étude entre les groupes traités. La PIE maximale est observée à J4 pour tous les groupes. La PIE décroît ensuite progressivement mais reste plus élevée que les valeurs initiales. A J0, CEES : $10,6 \pm 0,5 \text{ g/m}^2\text{h}$, CEES pluronic : $11,0 \pm 0,5 \text{ g/m}^2\text{h}$, CEES ACT1 : $10,7 \pm 0,5 \text{ g/m}^2\text{h}$, CEES ASODN : $11,0 \pm 0,6 \text{ g/m}^2\text{h}$. A J14, CEES : $80,9 \pm 12,6 \text{ g/m}^2\text{h}$, CEES pluronic : $50,6 \pm 11,5 \text{ g/m}^2\text{h}$, CEES ACT1 : $62,6 \pm 11,8 \text{ g/m}^2\text{h}$, CEES ASODN : $52,6 \pm 11,6 \text{ g/m}^2\text{h}$.

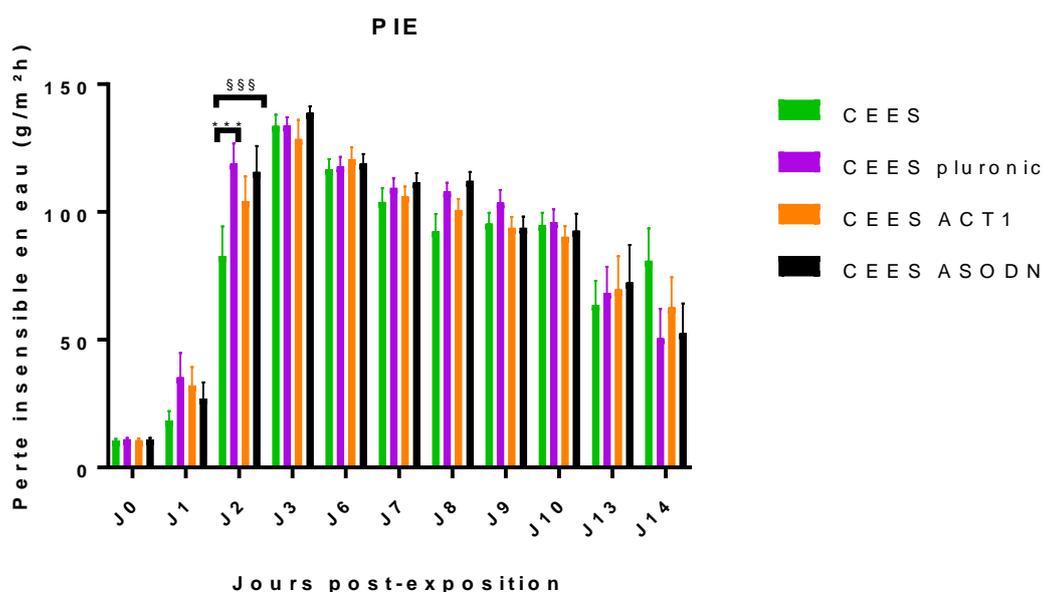


Figure 48 : Perte insensible en eau (PIE, $\text{g/m}^2\text{h}$) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours).

Comparaisons CEES vs CEES Pluronic, $***p < 0,001$; CEES vs CEES ASODN, $§§§p < 0,001$.

A J2, les souris traitées avec le véhicule Pluronic® F-127 et l'ASODN ont présenté une PIE plus élevée que les souris CEES. Les molécules candidates n'ont donc pas permis de limiter la rupture de la barrière cutanée.

Hydratation cutanée (HC)

L'hydratation cutanée (HC) a été mesurée à l'aide du MoisturMeterD. Après l'exposition au CEES, l'hydratation cutanée a diminué dès J1 dans tous les groupes (Figure 49). Après J3, les valeurs étaient nulles ou proches de 0 du fait de la présence de la croûte. L'hydratation est redevenue mesurable à partir de J13 en raison du début de décollement de la croûte. Les valeurs d'HC étaient similaires entre les groupes, à l'exception de J2, où une différence a été observée entre le groupe CEES et le groupe CEES Pluronic ($18,5 \pm 2,3$ u.a. vs $9,9 \pm 3,3$ u.a., $p < 0,01$). A J2, les souris CEES ont donc présenté une meilleure hydratation, reflétant une lésion moins profonde. En revanche, l'hydratation était ensuite similaire dans tous les groupes sur la suite de l'étude. A J14, l'hydratation cutanée est restée faible, et n'a donc pas retrouvé les valeurs initiales. A J0 : CEES : $41,4 \pm 1,2$ u.a., CEES Pluronic : $42,0 \pm 0,8$ u.a., CEES ACT1 : $40,7 \pm 1,4$ u.a., CEES ASODN : $41,1 \pm 1,6$ u.a. A J14 : CEES : $5,0 \pm 2,7$ u.a., CEES Pluronic : $3,8 \pm 3,9$ u.a., CEES ACT1 : $3,2 \pm 2,6$ u.a., CEES ASODN : $3,5 \pm 3,2$ u.a..

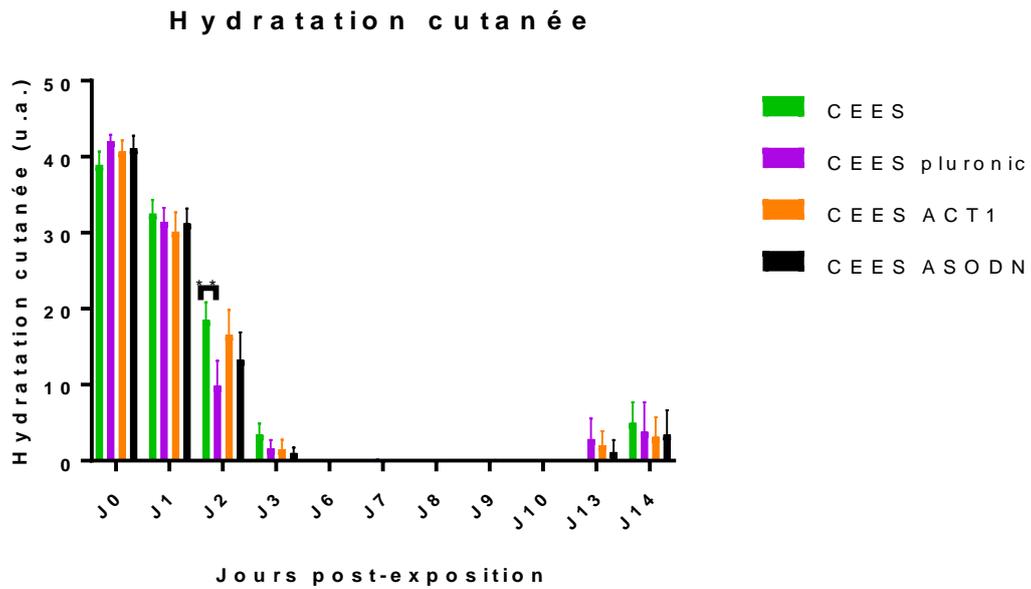


Figure 49 : Hydratation cutanée (HC, u.a.) en fonction du délai post-exposition au CEES (jours).
 Comparaison CEES vs CEES Pluronic, $**p < 0,01$.

A J2, les souris CEES ont présenté une meilleure hydratation cutanée. De J3 à J14, des valeurs similaires ont cependant été observées pour tous les groupes.

Aucun groupe n'a retrouvé son état initial d'hydratation cutanée.

Score combiné lésionnel

Le score combiné lésionnel permet de compiler les différents paramètres cutanés mesurés afin d'obtenir une vision globale de la cicatrisation (Figure 50). Ce score montre que quel que soit le traitement appliqué, aucun groupe n'a retrouvé son état cutané initial. De plus, aucun groupe traité ne s'est distingué. A J2, le groupe CEES semblait présenter le meilleur score (45,25 %) et le groupe CEES Pluronic le moins bon (76,33 %). Ce résultat est en accord avec les analyses indépendantes de chacun des paramètres. Cependant, cette différence n'est pas significative. A J14, les scores des différents groupes sont similaires : 58,11 % pour les CEES, 50,99 % CEES Pluronic, 52,62 % CEES ACT1, 51,60 % CEES ASODN.

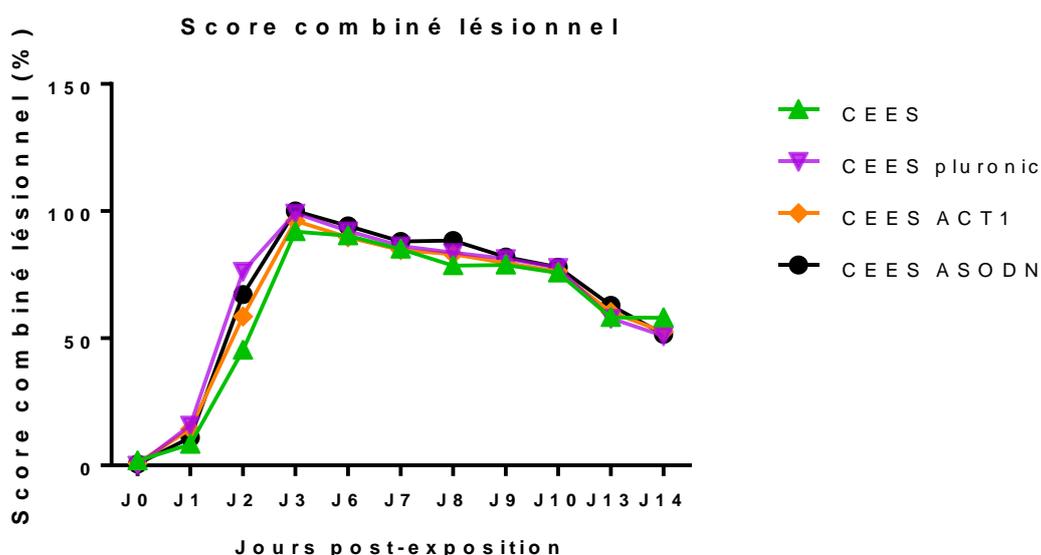


Figure 50 : Evolution du score combiné lésionnel (%) après exposition au CEES, et traitement avec le peptide ACT1, l'antisens (ASODN) ou le véhicule seul (Pluronic® F-127).

Après exposition au CEES, les traitements ASODN et ACT1 n'ont pas permis d'améliorer la cicatrisation cutanée sur 14 jours.

Discussion de l'objectif 3 : Evaluation de l'efficacité de molécules agissant sur la connexine 43 sur les lésions induites par le CEES

Une régulation négative de la Cx-43 est nécessaire durant les premiers jours pour permettre une cicatrisation normale d'une plaie aiguë. Au contraire, dans le cas d'une plaie chronique, il a été observé que la Cx-43 reste stable ou est augmentée (117, 120). Lors d'une exposition cutanée au CEES, nos résultats ont montré une augmentation à J1 de l'ARNm codant pour la Cx-43. Ainsi, afin d'améliorer la cicatrisation cutanée des lésions induites par le CEES, deux molécules agissant sur la Cx-43 ont été testées : le peptide ACT1 et l'ASODN de la Cx-43. Ces deux molécules ont été appliquées par voie topique dans du gel Pluronic® F-127 à J0+4h (immédiatement après la décontamination), J1, J2 et J3. Des mesures cutanées quotidiennes ont été effectuées afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ces molécules.

Concernant la prise de poids des animaux, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes. La perte de poids observée durant les premiers jours de la procédure semble due au protocole d'anesthésie et non à l'exposition au CEES ou aux molécules candidates (243).

La taille des lésions induites par le CEES était supérieure chez les souris CEES Pluronic et CEES ASODN. Ainsi, les groupes présentant les plus petites lésions à J2 sont le groupe CEES et le groupe CEES ACT1. A partir de J2 et jusqu'à la fin de l'étude (J14), la taille des lésions était similaire entre les groupes. Les molécules candidates n'ont donc pas permis de réduire la taille des lésions.

La teinte des lésions a été évaluée par la mesure de l'ITA. Plus la lésion est foncée, plus la valeur de l'ITA est faible, reflétant la présence d'une croûte. Des différences de valeurs d'ITA entre les groupes ont été observées uniquement à J2. Les souris CEES Pluronic et les souris CEES ASODN ont présenté des valeurs plus faibles par rapport aux souris CEES ou CEES ACT1. A partir de J3, les valeurs entre les groupes ont ensuite été similaires jusqu'à J14. En fin de procédure, les valeurs d'ITA étaient basses du fait de la présence de croûtes. Nous ne pouvons donc pas parler à ce stade d'hyperpigmentation. Afin d'apprécier la restauration de la couleur

originelle de la peau ou de la présence de dyspigmentation (45), une étude plus longue serait nécessaire.

L'hydratation cutanée a été mesurée quotidiennement par le MoisturMeterD afin d'évaluer la qualité de la cicatrisation et la restauration de l'état initial de la peau en terme d'hydratation, paramètre important dans le processus de cicatrisation (244). Des pansements hydrocolloïdes peuvent en outre être utilisés pour maintenir la plaie dans un environnement humide et ainsi faciliter la cicatrisation (245). En effet, il a été décrit un retard de cicatrisation en condition « sèche » contrairement aux cicatrisations en condition humide. En maintenant la plaie dans un environnement humide, une accélération du taux d'épithélialisation, de la prolifération cellulaire, de la synthèse de la matrice extracellulaire ont été décrits (244). Dans notre étude, à J13 et J14, les valeurs d'hydratation sont positives, mais proches de 0, du fait de la présence partielle ou totale de croûtes. Ainsi, à J14, l'hydratation cutanée reste diminuée par rapport au taux d'hydratation initial. Cette conclusion est en accord avec les mesures de la PIE qui montrent une barrière cutanée non restaurée avec des PIE qui restent supérieures aux valeurs initiales en fin de procédure.

Toutes ces mesures cutanées sont synthétisées par le score combiné lésionnel. Ce score reflète les conclusions obtenues pour chaque paramètre, à savoir :

- les molécules candidates n'accélèrent pas la restauration de l'état cutané initial
- la cicatrisation est incomplète à J14

Dans cette étude, les molécules candidates ont été appliquées par voie topique pendant 4 jours consécutifs (J0+4h, J1, J2 et J3), tandis que dans la littérature les molécules étaient appliquées une seule fois, immédiatement après l'incision ou l'excision. Pour l'objectif 3, le mode d'application multiple a été retenu du fait du délai d'apparition des lésions après exposition au CEES. En effet, comme décrit dans l'objectif 2, l'érythème n'apparaît qu'à partir de J1 après exposition au CEES et la nécrose à J3. Or, la Cx-43 intervient au début de la cicatrisation pour permettre la migration cellulaire, la diminution de l'inflammation ou encore l'angiogenèse (246). Afin de se situer dans la fenêtre thérapeutique, les molécules ont donc été appliquées quotidiennement jusqu'à J3, la demi-vie des connexines étant par ailleurs très courte (de 1,5 h à 5 h) (102, 246). Les formulations d'ASODN et d'ACT1 dans le Pluronic® F-

127 ont été préparées extemporanément du fait du manque d'information sur leur stabilité dans le temps. Le pH des solutions obtenues n'a pas été mesuré, cependant, les souris non exposées et ayant reçu uniquement les formulations ASODN et ACT1 n'ont pas présenté d'érythème ou de lésion. L'aspect de la peau des souris témoins traitées est resté similaire à celui des souris témoins non traitées. Il semble donc que le pH des formulations appliquées soit bien compatible avec une utilisation topique.

Le véhicule utilisé pour les molécules candidates est le gel Pluronic® F-127. Ce gel, thermoréversible, gélifie à température corporelle et est liquide à + 4°C. Il est utilisé pour délivrer les médicaments par différentes voies et en particulier les voies dermique et transdermique dans le cadre du traitement de lésions cutanées et de brûlures (247). En effet, ce gel permet la concentration dans la peau de la molécule candidate véhiculée avec un faible passage systémique, améliorant ainsi l'action locale désirée (247). Le gel Pluronic® F-127 est donc indiqué pour notre étude ciblant la Cx-43 au niveau de la lésion cutanée. Par ailleurs, plusieurs études évaluant l'efficacité du peptide ACT1 et de l'ASODN de la Cx-43 ont utilisé ce véhicule (123, 125).

Par la suite, des études de biologie moléculaire permettraient d'évaluer l'action des molécules candidates au niveau moléculaire. Le peptide ACT1 est un inhibiteur compétitif de la Cx-43 pour la protéine ZO-1 (248). Il agit en empêchant la fixation de la Cx-43 avec ZO-1. L'ASODN s'hybride à l'ARNm de la Cx-43 pour empêcher la traduction de la protéine Cx-43 par clivage de l'ARNm par la RNase H ou bien par blocage physique de la machinerie ribosomale (249). Une diminution de la protéine Cx-43 est ainsi attendue et pourrait être mise en évidence par exemple à l'aide de Western Blots. En alternative, nous envisageons une analyse de type multiplex qui permettrait de détecter et de quantifier la présence de protéines. Ainsi, des plaques réalisées à façon pour les protéines de l'inflammation, du remodelage cutané et des connexines permettraient de corréler les résultats obtenus en PCR avec la traduction protéique. En effet, la diminution de la régulation négative de la Cx-43 a entre autres buts de diminuer la réponse inflammatoire (121). Pour vérifier la pénétration des molécules candidates, une autre possibilité serait de les marquer avec un marqueur fluorescent, afin de visualiser leur localisation sur des coupes histologiques.

Les souris sont isolées en cages individuelles tout au long de l'étude, suite à leur exposition au CEES, afin de limiter les interactions sociales (morsures, griffures...) entre congénères et ainsi d'éviter une perte de traitement. Cependant, les souris sont suffisamment souples pour se lécher le dos et retirer ainsi une partie ou la totalité du produit. De plus, les cages contiennent des éléments d'enrichissement environnemental tels que des tubes en carton afin de pallier à leur isolement. Ces éléments peuvent être des sources de perte de produit par transfert. Les lésions n'ont pas été recouvertes par des pansements afin de permettre au CEES stocké dans le réservoir cutané de pouvoir désorber et de ne pas augmenter son action lésionnelle. Par ailleurs, il a été observé que le gel Pluronic® F-127 forme une fine pellicule sur la peau après sa gélification. Or, les groupes de souris CEES Pluronic ou CEES + molécules candidates ont présenté à J2 des lésions plus importantes que le groupe de souris CEES seul. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la pellicule de Pluronic® F-127 pourrait limiter la désorption du toxique, retardant ainsi la cicatrisation. Afin de vérifier cette hypothèse, une modification du mode d'application par des injections sous-cutanées pourrait être évaluée. Ce mode d'application permettrait de s'affranchir de la formation de pellicule à la surface de la peau mais également du possible retrait partiel ou total du traitement par ingestion ou par les éléments d'enrichissement présents dans la cage.

IV.1.4 Discussion et conclusion de la partie cutanée

L'ypérite est un agent vésicant induisant, sur le plan cutané, des lésions longues à cicatriser et pouvant laisser des séquelles. La prise en charge des victimes est similaire à celle des brûlés immunodéprimés et vise à diminuer la douleur, prévenir les infections et corriger les troubles hydroélectrolytiques. En effet, bien que l'ypérite ait été utilisée pour la première fois depuis plus d'un siècle, il n'existe à ce jour aucun antidote, ni traitement spécifique. Le traitement des lésions induites par l'ypérite est à ce jour uniquement symptomatique.

Afin d'évaluer de nouvelles thérapeutiques, des analogues de l'ypérite tels que le CEES peuvent être utilisés. En effet, leur utilisation est plus aisée puisqu'ils ne sont pas réglementés par l'OIAC. Cependant, afin que les études conduites avec ces analogues soient pertinentes, il est nécessaire de connaître les similarités et les différences entre l'ypérite et l'analogue utilisé. Pour cette thèse, l'analogue choisi a été le CEES, très proche structurellement de l'ypérite puisqu'un seul atome de chlore diffère. Le CEES est ainsi un agent alkylant monovalent, tandis que l'ypérite est bi-alkylante. Bien que plusieurs études évaluant des thérapeutiques contre l'ypérite aient été conduites avec le CEES, très peu ont comparé leurs effets physiopathologiques. Cette thèse a donc eu pour but de mettre au point un mode d'exposition au CEES avec les paramètres les plus proches possibles du mode d'exposition à l'ypérite. En effet, le mode d'exposition liquide est fréquemment utilisé pour le CEES (204, 239) tandis que pour l'ypérite, il s'agit du mode vapeur (236, 250). Le modèle animal utilisé pour cette étude est la souris SKH-1. Cette souche, sans poils, offre l'avantage de ne pas nécessiter une étape de rasage ou de dépilation. Elle est de plus fréquemment utilisée dans des études de cicatrisation ainsi que dans des études portant sur l'ypérite (211, 251). Notre première étude de mise au point du modèle d'exposition aux vapeurs de CEES et d'ypérite a ainsi permis de déterminer les paramètres d'exposition en termes de volume (10 μ L), durée d'exposition (30 min vs 8 min pour l'ypérite) et délai de décontamination (4h).

Les lésions induites par l'exposition aux vapeurs de CEES ont été comparées à celles induites par les vapeurs d'ypérite. Plusieurs paramètres cliniques et cutanés ont ainsi été comparés : poids des souris, surface des lésions, hydratation cutanée, PIE et ITA. Des études

histologiques et de biologie moléculaire ont ensuite été réalisées pour poursuivre la comparaison de ces deux agents. Le CEES a permis d'obtenir le même type de lésion que l'ypérite avec cependant un retard d'apparition : la nécrose survient dès J1 pour l'ypérite, tandis qu'elle apparaît vers J3 avec le CEES. Ce retard d'apparition des lésions avec le CEES est également observé lors des mesures des paramètres cutanés non-invasifs. De plus, en fin de procédure, J14, les lésions sont équivalentes entre les deux agents. Ces observations ont été confirmées par l'histologie et la biologie moléculaire. En outre, les études RT-qPCR ont mis en évidence une inflammation plus prononcée avec l'ypérite qu'avec le CEES.

Les études de RT-qPCR ont également permis d'étudier les connexines-43, 26 et 30 suite à l'exposition cutanée avec ces deux agents vésicants. Ces connexines sont impliquées dans la cicatrisation et une expression anormale de celles-ci a des retentissements sur la cicatrisation. En particulier, l'absence de diminution de la Cx-43 en début de cicatrisation est liée avec la chronicité des plaies (246). Les lésions induites par l'ypérite étant longues à cicatriser, elles peuvent être classées parmi les plaies chroniques. Ainsi, l'hypothèse émise est que, comme observé dans les plaies chroniques, la Cx-43 ne diminuerait pas. Cette thèse a montré en effet que la Cx-43 est augmentée à partir de J3 après l'exposition à l'ypérite et à J1 après exposition au CEES. Les Cx-26 et 30 présentent en revanche le profil attendu après une plaie aiguë.

Une étude conduite avec des souris SKH-1 exposées à la moutarde à l'azote (HN) a montré que la Cx-43 était régulée négativement à J1, J3, J7 et J10 post-exposition, comme lors de plaies aiguës de type incision ou excision (252). Ainsi, l'analogie HN n'induit pas les mêmes modulations de la connexine-43 que l'ypérite et le CEES. Par ailleurs, les lésions induites par le HN diffèrent également puisqu'il ne produit pas une large nécrose au niveau de la zone d'exposition (253).

Les biopsies ont été analysées dans la pleine épaisseur de la peau. Du fait de la présence d'une nécrose de coagulation affectant le tissu en profondeur, nous n'avons pas séparé les différentes strates cutanées. De plus, nous n'avons pas pesé les biopsies puisque celles-ci présentaient des épaisseurs variables du fait de la présence ou non de la croûte.

Cependant, pour analyser des biopsies représentatives de la zone d'exposition et comparables entre elles, nous avons utilisé des punchs de 8 mm, afin de prélever des biopsies de même diamètre. De plus, lors du prélèvement de la peau des souris, nous nous sommes assurés de procéder toujours selon le même mode opératoire afin de séparer la peau du tissu conjonctif lâche.

Des études *in vivo* (excisions, incisions, brûlures thermiques) et cliniques (ulcères diabétiques) menées avec l'oligonucléotide antisens de la Cx-43 (ASODN) et le peptide ACT1 (partie C-terminale de la Cx-43) ont montré une accélération de la cicatrisation des lésions (117, 124, 127). Afin d'évaluer l'efficacité de ces molécules sur les lésions induites par un agent vésicant, elles ont été appliquées par voie topique sur les lésions induites par le CEES. Comme il a été observé par RT-qPCR que la Cx-43 était augmentée à J1, l'agent vésicant choisi pour cette étude était le CEES. L'oligonucléotide antisens ASODN et le peptide ACT1 ont été délivrés à l'aide du gel Pluronic® F-127 afin d'optimiser l'effet cutané local de ces molécules en limitant la perméation (247). L'ASODN et l'ACT1 ont été appliqués immédiatement après la décontamination cutanée (J0+4h), puis à J1, J2 et J3. En effet, les lésions induites par le CEES apparaissent après un temps de latence. Or, la lésion doit être constituée pour que la diminution de la Cx-43 puisse être efficace puisque cette diminution doit survenir en début de cicatrisation. Ainsi, les molécules candidates ont été appliquées lors des phases œdémateuse, érythémateuse et nécrotique. Aucune amélioration significative n'a été observée sur les différents paramètres cutanés après application des molécules candidates ou du véhicule Pluronic® F-127 par rapport au témoin CEES. Les molécules candidates n'ont pas permis de restaurer plus rapidement l'intégrité cutanée en fin de procédure. Les seules différences ont été observées à J2, or ces effets tendent à être plus péjoratifs dans les groupes traités avec les molécules candidates et le véhicule Pluronic® F-127, puisque le groupe CEES seul a présenté de meilleurs résultats à J2. Ainsi, se pose l'hypothèse d'une aggravation des lésions par le véhicule Pluronic®. Celui-ci en effet laisse une fine pellicule à la surface de la peau, limitant ainsi la perméation. Ainsi, la désorption du réservoir cutané de CEES n'aurait pas pu se faire, induisant une prolongation de la toxicité du CEES. L'utilisation de pansements avait par ailleurs été écartée afin de ne pas produire un effet occlusif. Un autre mode d'application tel qu'une injection sous-cutanée devrait donc être testé pour étayer cette hypothèse et s'affranchir de

cet effet occlusif indésirable dans le cas du Pluronic® F-127. Bien que ce même véhicule ait été utilisé dans l'étude évaluant l'efficacité de l'ASODN sur des lésions induites par le HN, l'application de l'ASODN 2 heures après l'exposition a engendré une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour la Cx-43 à J3 et J7. Macroscopiquement, une diminution de l'érythème, de l'œdème et de la formation de la croûte avait été conclue à J1 et J3 (252). Ainsi, dans cette étude réalisée avec l'analogue HN, il ne semble pas y avoir d'effet occlusif empêchant la perméation du toxique. Kehe et al., 2013, ont cherché à détecter par immunomarquage les adduits à l'ADN (guanine en position N7) des moutardes au soufre et à l'azote (HD, CEES et HN-1, 2 et 3) après exposition *in vitro* de kératinocytes humains. Seuls les adduits de l'HD et du CEES ont pu être détectés. Les auteurs ont conclu qu'une exposition aux moutardes à l'azote inférieure à 2 heures ne permettait pas de détecter des adduits à l'ADN (254).

Le mode d'exposition aux vapeurs de CEES mis au point lors de cette thèse permet d'obtenir des lésions cutanées comparables à celles obtenues avec l'ypérite, bien qu'il existe des différences en termes d'intensité. Dans le cadre d'études portant sur l'ypérite, telles que l'évaluation de contre-mesures médicales et de dispositifs de décontamination, le CEES s'avère pertinent en prenant en compte les différences décrites dans cette thèse, notamment concernant le délai d'apparition des lésions. En effet, pour l'évaluation de l'efficacité d'une contre-mesure, on ne pourra pas préjuger de son efficacité durant les premiers jours post-exposition du fait du délai d'apparition des lésions plus long avec le CEES. Le CEES conserve l'avantage de ne pas être soumis à la réglementation des armes chimiques rendant sa disponibilité et sa manipulation possibles d'un point de vue réglementaire.

IV.2. Seconde partie : effets cérébraux

IV.2.1 Résultats objectif 1 : évaluation des effets cognitifs et émotionnels d'une exposition à un agent vésicant

Article n°4 : *Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice.*

L'objectif 1 de cette partie sur les effets cérébraux a fait l'objet d'une publication « ***Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice*** » de Gros-Désormeaux et al., dans Toxicology Letters, 2018 Sep 1; 293: 73-76.

Cette publication porte sur l'évaluation des effets cognitifs et émotionnels chez des souris exposées au CEES par voie cutanée. Les effets neurologiques et neuropsychiques de l'ypérite étant uniquement décrits dans un contexte belliqueux, nous avons voulu explorer les fonctions cognitives et émotionnelles en laboratoire sur des animaux afin d'étudier les effets propres de l'ypérite. Dans ce but, nous avons exposé des souris C57/Bl6J au CEES pur ou dilué par voie cutanée ainsi que des souris exposées à de l'acide chlorhydrique (témoin brûlure chimique). Ce groupe de témoin brûlure, a pour but de s'affranchir d'un potentiel biais induit par la douleur ou la gêne causée par la brûlure sur le dos de l'animal. Nous avons ensuite comparé les performances des souris saines et des groupes de souris exposées lors de différents tests : le test du labyrinthe en croix surélevé, le test de l'open-field et le test du labyrinthe en T. Ainsi, l'état anxieux des souris a été évalué par les tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'open-field. La mémoire de travail a quant à elle été explorée par le test du labyrinthe en T.

Le premier test effectué par les souris était le test du labyrinthe en croix surélevé, à J3 après exposition.

Rapport d'entrées : le nombre d'entrées totales était similaire entre les groupes. En revanche, le rapport d'entrées dans les bras ouverts était plus faible chez les souris exposées au CEES pur ($27,3 \pm 4,8 \%$) par rapport au groupe contrôle ($48,2 \pm 4,5 \%$, $p < 0,01$). Les autres groupes HCl et CEES dilué (dCEES) ont quant à eux présenté un rapport d'entrées similaire à celui du groupe contrôle.

Rapport de temps : le rapport du temps passé dans les bras ouverts est également plus faible dans le groupe des souris exposées au CEES pur ($12,3 \pm 3,1 \%$) par rapport au groupe contrôle ($29,4 \pm 4,9 \%$, $p < 0,01$). Les rapports des temps des autres groupes, dCEES et HCl sont quant à eux similaires au groupe contrôle.

En conclusion, les souris exposées au CEES pur sont préférentiellement restées dans les bras fermés et ont moins explorés les bras ouverts qui sont plus aversifs.

Le second test effectué par les souris est celui de l'open-field, à J4 après exposition.

Nombre de sections traversées : le nombre total de sections traversées du test de l'open-field a été comptabilisé pour les différents groupes de souris. Ainsi, les souris CEES pur ont traversé moins de sections que les autres groupes. CEES : $12,7 \pm 2,2$ vs contrôles : $37,6 \pm 3,6$; HCl : $31,0 \pm 3,0$ et dCEES : $26,5 \pm 1,9$; $p < 0,001$ pour les trois comparaisons. Les souris exposées au CEES pur ont donc moins exploré l'open-field que les souris des autres groupes.

Latence périphérie – centre : les souris du groupe CEES pur ont mis plus de temps que les autres groupes pour aller de la périphérie vers le centre. En effet, elles ont mis $197,1 \pm 30,3$ s tandis que les autres groupes ont mis $38,0 \pm 6,8$ s pour les souris contrôles, $28,7 \pm 3,0$ s pour les HCl et $40,3 \pm 5,4$ s pour les souris dCEES, $p < 0,0001$ pour les trois comparaisons.

En résumé, les souris exposées au CEES pur ont présenté un comportement anxieux mis en évidence par des tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'open-field.

Le troisième test effectué avait pour but d'évaluer le comportement d'alternance spontanée dans le labyrinthe en T, afin de mesurer la mémoire de travail. Ce test a été mis en œuvre à J5 post-exposition. Le groupe de souris exposées au CEES pur a présenté un pourcentage d'alternance plus faible que pour les groupes contrôles et dCEES. CEES pur : $47,6 \pm 4,3 \%$ vs contrôles : $78,6 \pm 4,8 \%$; $p < 0,01$ et vs dCEES $80,6 \pm 5,1 \%$; $p < 0,01$. Cependant, il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les souris CEES pur et les souris HCl. Par ailleurs, les pourcentages moyens d'alternance spontanée à la 8^{ème} session ne montrent pas de différence significative entre les quatre groupes qui présentent des pourcentages d'alternance très élevés. Le déficit d'alternance des souris du groupe CEES pur ne peut donc pas être imputé à une baisse de la motivation à alterner au cours des essais successifs.

En conclusion, la mémoire de travail est altérée chez les souris exposées au CEES pur uniquement.

Les tests conduits chez les souris exposées par voie cutanée au CEES pur ont ainsi mis en évidence un comportement anxieux ainsi qu'une altération de la mémoire de travail spatiale. Les souris exposées au CEES dilué ainsi que les souris exposées à l'acide chlorhydrique n'ont en revanche pas vu leur performance diminuer lors des tests. Ainsi, les effets observés seraient imputables au CEES lui-même et non au stress, à la douleur ou à la gêne induits par la brûlure. Par ailleurs, un effet dose est suggéré puisque l'exposition au CEES dilué n'a pas induit ces mêmes déficits.

L'intégralité de ces résultats figure dans l'article ci-dessous.



Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice

Fanny Gros-Désormeaux^a, Daniel Béracochéa^b, Frédéric Dorandeu^{b,c}, Christophe Piérard^{a,*}

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

^b Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), Université de Bordeaux, CNRS UMR 5287, 33615 Pessac, France

^c Ecole du Val de Grâce (EVDG), 1 Place Alphonse Laveran, 75230 Paris Cedex 05, France



ARTICLE INFO

Keywords:
Sulfur mustard
CEES
Cognition
Working memory
Stress
Anxiety

ABSTRACT

Cognitive and emotional disorders have been reported in veterans intoxicated with sulfur mustard (SM) a chemical weapon belonging to the category of vesicating agents. However, the intense stress associated with the SM intoxication may render difficult determining the exact role played by SM intoxication itself on the emergence and maintaining of cognitive disorders. Animals model would allow overcoming this issue. So far, we presently investigated the cognitive and emotional impact of an acute cutaneous intoxication with CEES (2-chloroethyl ethyl sulfide), a SM analog in C57/B6 mice.

Our study evidenced that up to 5 days after a single acute neat CEES skin exposure, compared to controls, mice exhibited i) a significant increase in anxiety-like reactivity in an elevated plus-maze and in an open field tasks and ii) an alteration of working memory in a sequential alternation task. In contrast, mice submitted to intoxication with a diluted CEES solution or hydrochloric acid (HCl) did not show any memory or emotional impairments. Given that, Our data shows that a single local cutaneous intoxication with neat CEES induced long-lasting cognitive and emotional pejorative effects, in accordance with the epidemiological observations in veterans. Thus, the single acute neat CEES cutaneous intoxication in mice could allow studying the sulfur mustard-induced cognitive and emotional disorders and their further counter-measures.

1. Introduction

Sulfur mustard (SM) is a chemical warfare agent belonging to blistering (or vesicating) agents category. It was used for the first time in 1917 at Ypres in Belgium for its property to induce severe burns which are long to heal, causing more incapacitation than fatalities and keeping soldiers out of the battlefield for a long period of time. If the pathological effects of SM on skin, eyes, and respiratory system are well documented, its effect on cognitive functions is not fully demonstrated. Indeed, only few studies showed that soldiers exposed to SM in recent conflicts showed mental health disorders such as anxiety, severe depression, concentration deficit, emotional troubles, behavioral abnormalities and memory impairments (see (Razavi et al., 2014) for review). However, the long-term psychological symptoms of SM victims could be more related to the trauma caused by the war itself rather than SM poisoning *per se* (Darchini-Maragheh et al., 2015). For these reasons, it is important to develop an animal model of SM intoxication which allows alleviating fear components as a causal factor of the SM-induced cognitive and emotional alterations.

To date animal studies have not been focused on the cognitive and

emotional impacts of SM. To our knowledge, only one study showed neurobehavioral impairments after daily percutaneous administration of SM in mice but this study does not represent the actual risk of exposure which is supposed to be acute instead of chronic (Sharma et al., 2009).

Therefore, the purpose of the present study is to determine the impact of a unique cutaneous exposure to an analog of SM on emotional and cognitive responses in mice. Although the mechanism of toxicity of SM is not fully understood, it is known that SM penetrates through the skin and reaches many organs in mice, including the brain (Batal et al., 2014). In particular, the delivery of SM from skin to brain occurs rapidly, as soon as 10 min in rats (Yue et al., 2015). Studies conducted with butyl 2-chloroethyl sulfide (BCS), an analog of SM, also evidenced the translocation of BCS from subcutaneous area to the brain (Elsayed et al., 1989). In our study, another analog of SM was used: the 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES), commercially available. It is structurally close to SM as it differs only by one chlorine less; moreover, many studies showed that CEES acted on the same targets as SM, such as the DNA, proteins and lipids (Black et al., 2010; Inturi et al., 2011).

* Corresponding author.

E-mail address: christophe.pierard@chemdet.fr (C. Piérard).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.889>

Received 18 April 2017; Received in revised form 3 July 2017; Accepted 10 July 2017
Available online 22 July 2017

0378-4274/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Material & methods

Principles of laboratory animal care were followed and experiments have been performed in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/UE and the local ethical committee for animal experiments.

Male C57Bl/6J mice obtained from Janvier (France) were used. Upon arrival, animals remained in collective cages and were housed individually at least 10 days before intoxication with CEES and behavioral testing. Mice were 4 months-old at the time of intoxication. All animals had continuous access to food and water, and were placed on a 12-h light-dark cycle (8:00 a.m.–8:00 p.m.) in a temperature-controlled room (22 ± 1 °C).

Mice were shaved on the center of their back using scissors and a single-use razor (approximately 9 cm^2). They were then cutaneously exposed to CEES (Sigma-Aldrich, France), diluted CEES, or HCl under anesthesia using a mixture of ketamine and xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg b.w. respectively).

A group of mice received a 20 μl solution of neat CEES (id 21.4 mg) on the shaved area (CEES group; $n = 7$) (Boulware et al., 2012) whereas a second group was exposed to 4 mg of CEES diluted in 200 μl of acetone (dCEES group; $n = 6$) (Jain et al., 2011). Because of the difference in concentration between neat and dCEES, skin was decontaminated with a hypochlorite solution (5%) 1.5 or 2.5 h respectively after intoxication. The third group was exposed to hydrochloric acid (20% v/v) in order to induce a superficial chemical burn (HCl group; $n = 7$) and mice were also cleaned 2.5 h after HCl exposure with the same hypochlorite solution to be fully comparable. A control non-exposed group ($n = 7$) was also constituted. Mice were allowed to recover at least 2 days before behavioral testing which occurred from Day 3 to Day 5 after intoxication. Anxiety was first evaluated in the elevated plus-maze (Day 3), then in the open-field (Day 4) and working memory was evaluated on Day 5 in a T-maze. All behavioral tests were performed in all groups between 8:00 a.m. and 12:00 a.m. in order to avoid circadian variations.

The elevated plus-maze and procedure have been previously described (Dominguez et al., 2016). Mice were allowed to freely explore the open and closed arms of the maze for 5-min. The anxiety-like behavior was evaluated by i) the Time ratio (Time spent in open arms/Total time spent in all arms $\times 100$) and ii) the Entry ratio (Number of entries in open arms/Total number of entries in all arms $\times 100$). The smaller are these ratios, the more “anxious” is the mouse.

The open-field is a circular chamber measuring 100 cm in diameter and surrounded by a 15-cm-high wall. A camera above the apparatus was connected to a computer screen dividing the floor into 64 zones. Illumination (40 lx) was equally distributed on the platform. At the start of each trial, animals were placed for 30 s in a small cylinder and then were allowed to freely explore the apparatus for 5 min. Two measures

were recorded: the initial time to reach to the center from the periphery and the total number of zones crossed. The smaller is the number of zone crossed and the higher is the delay to reach periphery or the center, the more “anxious” is the mouse.

The T-maze allowed the evaluation of the working memory using the spontaneous sequential alternation behavior (Vandesquille et al., 2013). Mice were first habituated to the T-maze (10 min/day \times 2 successive days) and submitted to a training session 3 days before the intoxication procedure and their latter random attribution to the 4 groups. The training session consisted of seven successive trials separated by a 30 s-inter-trial interval (ITI) to familiarize the mice with the closure and opening of the arms over trials. At the beginning of each trial, the mouse was placed in the start box for 30 s. When the subject entered one of the goal-arms, the door to that arm was closed and the choice was recorded. After a 30 s-confinement period into the chosen arm, the mouse was placed back in the start-box for a new trial. In the test session, the procedure was similar, except that the ITI was increased to 90 s from the 1st to the 7th trials. The less is the alternation rate, the more impaired is working memory. An additional trial was added at the end of the series, which was separated from the 7th one by a shorter ITI (30 s). This 8th trial allowed to control that any behavioral impairment on the previous trials was not due to a motivational alteration. Indeed, a significant increase of alternation rates at the 8th trial would indicate that the motivation to alternate was not impaired by the repetition of trials.

For statistical analyses, between-groups comparisons were performed using one-way ANOVA followed when adequate by post-hoc comparisons (Bonferroni-Dunn test). In order to evidence only major differences, we deliberately considered a significance threshold of $p < 0.01$ for paired between-groups comparisons. For all behavioral tests, values are presented as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Skin burns

In the neat CEES group, erythema was observed two days after intoxication. The HCl group also exhibited erythema, however weaker and more heterogeneous than in the CEES group, whereas the dCEES group exhibited no visible lesion.

3.2. Anxiety-like reactivity

According to our statistical threshold (significance at $p < 0.01$), the overall total number of entries in the elevated plus maze was not different among the groups ($F(3,23) = 3.65$; $p = 0.03$). No significant between-groups difference was observed on the total time spent visiting all arms of the maze ($p > 0.10$ in all analyses; data not shown).

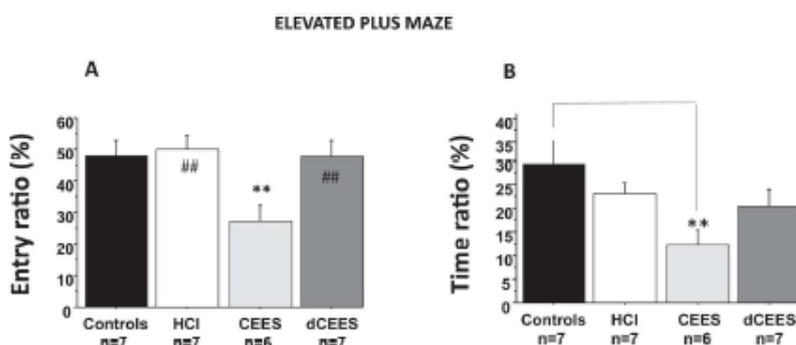


Fig. 1. Elevated plus-maze. A) In this task, the lower the entry and time ratios are, the more anxious is the mouse. Neat CEES-treated group exhibited a lower entry ratio as compared to Controls, HCl (20% hydrochloric acid) and dCEES (CEES diluted in acetone) groups. B) CEES mice exhibit a lower time ratio as compared to Controls, HCl and dCEES groups (** $p < 0.01$ versus Controls; ## $p < 0.01$ versus CEES). Values are presented as means \pm SEM.

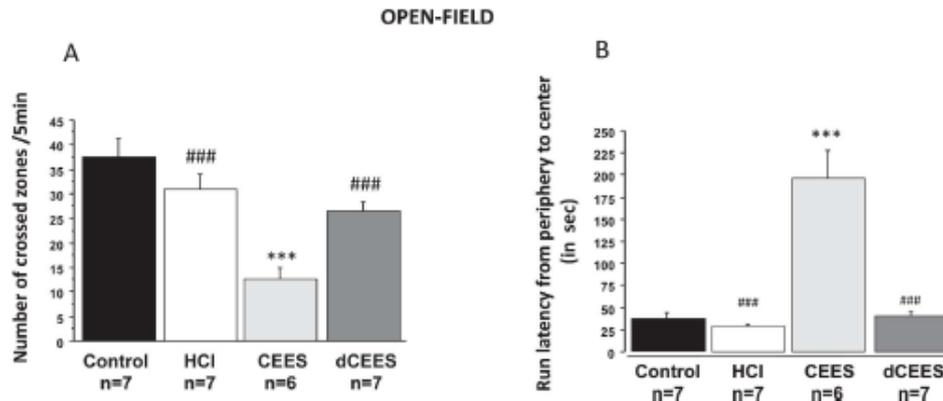


Fig. 2. Open Field. A): Number of areas crossed by the mice in 5 min. CEES mice (neat CEES) exhibited a reduction of the number of crossed sections as compared to Controls, HCl (20% v/v hydrochloric acid) and dCEES (CEES diluted in acetone) groups; B) CEES mice exhibited a higher run latency to reach the center of the maze from the periphery as compared to Controls, HCl and dCEES groups (** $p < 0.01$ versus Controls; ### $p < 0.001$ versus CEES).

The entry ratio was significantly different among the groups (Fig. 1A; $F(3,23) = 5.26$; $p = 0.006$); more specifically, a significant decrease of this ratio was observed in the CEES group ($27.3 \pm 4.8\%$) as compared to Controls ($48.2 \pm 4.5\%$; $p < 0.01$). The other groups exhibited an entry ratio similar to Controls (dCEES: $47.7 \pm 5.1\%$; HCl: $50.1 \pm 4.4\%$; NS versus Controls; $p < 0.01$ versus CEES). The time ratio was significantly different among the groups ($F(3,23) = 4.02$; $p < 0.01$; Fig. 1B); more specifically, a significant decrease of this ratio was observed in the CEES group ($12.3 \pm 3.1\%$) as compared to Controls ($29.4 \pm 4.9\%$; $p < 0.01$). The other groups exhibited a time ratio similar to Controls (dCEES: $20.4 \pm 3.5\%$; HCl: $23.1 \pm 2.2\%$; $p > 0.01$; NS versus Controls and CEES).

In the open-field, the total number of crossed zones was significantly different among the groups ($F(3,23) = 14.24$; $p < 0.001$). Thus, the CEES group (12.7 ± 2.2) exhibited a lower number of crossed zones as compared to the other groups (Controls: 37.6 ± 3.6 ; HCl: 31.0 ± 3.0 ; dCEES: 26.5 ± 1.9 ; $p < 0.001$ in all comparisons with CEES) (Fig. 2A). The delay to run from the center of the maze to the periphery was significantly different among the groups ($F(3,23) = 3.43$; $p = 0.003$). However, between-group paired comparisons failed to reveal any significant difference (data not shown). In contrast, the delay to run back from the periphery to the center was significantly different among the groups ($F(3,23) = 24.96$; $p < 0.001$). Indeed, this delay was significantly increased in CEES mice (197.1 ± 30.3 s) as compared to the other groups (Controls: 38.0 ± 6.8 s; HCl: 28.7 ± 3.0 s; dCEES: 40.3 ± 5.4 s; $p < 0.0001$ in each comparison with CEES) (Fig. 2B).

3.3. Working memory

Working memory was evaluated by the mean percentage of spontaneous alternation (SA rate) over the 7 first trials. SA rates significantly differed among the groups ($F(3,23) = 8.00$; $p = 0.0008$). CEES mice exhibited a lower alternation score ($47.6 \pm 4.3\%$) as compared to the Control and dCEES groups ($78.6 \pm 4.8\%$ and $80.6 \pm 5.1\%$ respectively; $p < 0.001$ for each comparison) but not as compared to the HCl group ($69.0 \pm 6.7\%$) (Fig. 3). Interestingly, no significant between groups difference was observed for the 8th trial of the series ($F(3,23) < 1.0$). More specifically, the mean alternation rates were $85.7 \pm 14.3\%$ for the CEES group, $83.3 \pm 16.7\%$ for the dCEES group, $85.7 \pm 14.3\%$ for the HCl group and $71.4 \pm 18.4\%$ for Controls.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the cognitive and emotional impacts of a cutaneous exposure to CEES, a sulfur mustard analog. For this purpose, mice exposed to CEES (neat or diluted) or HCl (as a chemical burn control) were tested for anxiety and working memory in comparison to unexposed controls.

Mice exposed to HCl or dCEES behaved similarly as control mice in all tests. Impairments in emotional reactivity and working memory were observed specifically in the group exposed to neat CEES. More precisely, CEES group exhibited in the elevated plus maze less visits and spent less time in the open arms, as compared to the other groups. Similarly, in the open-field, CEES mice crossed significantly less zones into the maze, and their running latencies to go back to the center of the maze from the periphery were significantly increased as compared to the 3 other groups.

The alternation test was performed 4 days after skin exposure to assess working memory (Dominguez et al., 2016; Vandesquille et al., 2013). This test evidenced a deficit in sequential alternation for the CEES group only using an inter-trial delay of 90 s which reveals a working memory deficit. In addition, shortening the delay between the 7th and 8th trials increased significantly SA rates in all groups discarding the hypothesis of a motivational failure to alternate as a determinant of memory impairment in CEES mice.

One could suggest that pain from the skin burns and/or that muscular lesions act as causal factors of neat CEES-induced deficits. However, neat CEES-treated animals did not exhibit any locomotor impairments as shown by a similar amount of total entries in the elevated plus maze among the 4 groups, or by the increase of the alternation rate at the 8th trial of the series in the alternation task, which shows that the alternation deficit on the 7 first trials stems from a delay-dependent interference among trials (that is to say a cognitive alteration), rather than from motivational or sensorimotor impairments. In addition, the lack of any emotional or memory impairments in the HCl group which also exhibited erythema discards pain from the skin burns as a causal factor for the behavioral impairments observed in the neat CEES group. Thus, it can be suggested that the CEES-induced cognitive and emotional alterations are consequences of a brain dysfunction. Indeed, several authors have shown that SM administered on the skin reached the brain very rapidly, e.g. less than 10 min (Yue et al., 2015) and induced oxidative stress. Moreover, the targets of CEES are the same as those of sulfur mustard, such as DNA, proteins and lipids (Sharma et al., 2009; Black et al., 2010; Inturi et al., 2011). In addition,

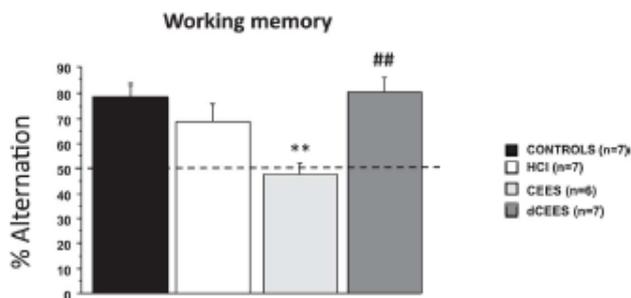


Fig. 3. Working memory in the alternation task. Mean percentage of alternation with an inter-trial interval of 90 s over the 7 first trials. Neat CEES mice exhibited a lower mean alternation rate as compared to Controls and dCEES (CEES diluted in acetone) groups; (** $p < 0.01$ versus Controls; ## $p < 0.01$ respectively versus dCEES and HCl groups).

a study performing intoxication with a single subcutaneous injection of neat BCS increased oxidative stress in the brain as measured by several biological markers total glutathione and lipid peroxidation (Elayed et al., 1989).

Another interesting point raised by our study is that the CEES-induced working memory and emotional impairments are long-lasting, since the deficits of working memory are still observed 5 days after the intoxication. This observation suggests that the single cutaneous CEES intoxication may induce long-lasting brain alterations as observed in humans intoxicated with sulfur mustard (Razavi et al., 2014) which could be responsible for the emergence and maintenance of the deficits over time. We may hypothesize that the CEES-induced impairments relied on protracted alterations of the amygdalo-prefrontal cortex-hippocampus network, known to be involved in working memory and fear reactivity (Vandesquille et al., 2013; Arruda-Carvalho and Clem, 2015) and which is highly sensitive to the deleterious effects of oxidative stress (Omell et al., 2014).

This hypothesis is sustained by a study of Gadsden-Gray et al. (Gadsden-Gray et al., 2011), showing that a single dose of CEES can cause neuronal damage in the frontal brain region at least in part by increasing microglial cells. However, the effects observed in the present study are not specific to CEES because nerve agents of military interest such as soman also induce cognitive and emotional impairments (Collombet et al., 2011; Coubard et al., 2008). Indeed, these previous studies reported anxiety and disturbances of working memory, thus the impairments observed in the present study are not specific to CEES.

5. Conclusion

Overall, our study evidenced that a single cutaneous exposure to neat CEES, an analog of SM, induced prolonged cognitive impairment and an increase of anxiety-like reactivity. Thus, the CEES mimicked the psychological disorders of sulfur mustard reported in humans, however in the absence of the intense stress often associated with SM intoxication, showing that the memory and emotional alterations are induced by SM *per se* and not by stress.

However, the neurobiological mechanisms sustaining these long-term impairments remain to be investigated. The reversibility and the mechanism sustaining these cognitive and emotional impairments should also be explored (Razavi et al., 2014). In a further step, experiments should be designed in order to counteract the potential CEES-induced neuronal damage and further cognitive impairments, using for example anti-oxidants and/or psychoactive drugs such as modafinil (Omell et al., 2014; Lallement et al., 1997).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

- Arruda-Carvalho, M., Clem, R.L., 2015. Prefrontal-amygdala fear networks come into focus. *Front. Syst. Neurosci.* 9, 145.
- Basil, M., Boudry, J., Moutet, S., Cléry-Barnaud, C., Wartelle, J., Bérard, I., Douki, T., 2014. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278, 39–44.
- Black, A.T., Joseph, L.R., Casillas, R.P., Heck, D.E., Gerecke, D.R., Slinko, P.J., Laikin, D.L., Laikin, J.D., 2010. Role of MAP kinases in regulating expression of antioxidants and inflammatory mediators in mouse keratinocytes following exposure to the half mustard, 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 352–360.
- Boulware, S., Fields, T., Mclvor, E., Powell, K.L., Abel, E.L., Vasquez, K.M., MacLeod, M.C., 2012. 2,6-Dithiopyridine, a nucleophilic scavenger, protects against mutagenesis in mouse skin treated in vivo with 2-(chloroethyl) ethyl sulfide, a mustard gas analog. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 203–209.
- Collombet, J.M., Béreacochéa, D., Liéca, P., Piéard, C., Lallement, G., Pillat, P., 2011. Long-term effects of cytokine treatment on cognitive behavioural recovery and neuronal regeneration in soman-poisoned mice. *Behav. Brain Res.* 221, 261–270.
- Coubaud, S., Béreacochéa, D., Collombet, J.M., Philippin, J.N., Kraem, A., Liéca, P., Lallement, G., Piéard, C., 2008. Long-term consequences of soman poisoning in mice: part 2. emotional behaviour. *Behav. Brain Res.* 191, 95–103.
- Darchini-Mangrhe, E., Blain, P.G., Balaji-Mood, M., 2015. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds* Springer International Publishing Switzerland, pp. 101–134.
- Dominguez, G., Refuzing, C., Piéard, C., David, V., Henkous, N., Decorte, L., Mons, N., Béreacochéa, D., 2016. Alcohol withdrawal induces long-lasting spatial working memory impairments: relationship with changes in corticosterone response in the prefrontal cortex. *Addict. Biol.* 10.
- Elayed, N.M., Omaye, S.T., Maib, G.J., Inase, J.I., Dahlberg, E.T., Wheeler, C.R., Korte, J.D.W., 1989. Response of mouse brain to a single subcutaneous injection of the monofunctional sulfur mustard, butyl 2-chloroethyl sulfide (BCS). *Toxicology* 58, 11–20.
- Gadsden-Gray, J., Shyamali, M., Oluhemiya, O., Sali, K.D., 2011. Induction of neuronal damage in guinea pig brain by intratracheal infusion of 2-chloroethyl ethyl sulfide, a mustard gas analog. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26, 23–30.
- Intuf, S., Tewari-Singh, N., Gu, M., Shrivastava, S., Gomez, J., Agarwal, C., White, G.W., Agarwal, R., 2011. Mechanisms of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced DNA damage in skin epidermal cells and fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 2272–2280.
- Jain, A.K., Tewari-Singh, N., Orlicky, D.J., White, C.W., Agarwal, R., 2011. 2-Chloroethyl ethyl sulfide causes microvesiculation and inflammation-related histopathological changes in male hairless mouse skin. *Toxicology* 282, 129–138.
- Lallement, G., Piéard, C., Masquedez, C., Pémot-Marino, I., Péta, M., Lagarde, D., 1997. Neuroprotective effects of modafinil against soman-induced hippocampal lesions. *Med. Sci. Res.* 25, 437–440.
- Omell, F., Valvassori, S.S., Steckert, A.V., Demzo, P.F., Resende, W.R., Varda, R.R., Quevedo, J., 2014. Modafinil effects on behavior and oxidative damage parameters in brain of wistar rats. *Behav. Neurol.* 91.
- Razavi, S.M., Negahban, Z., Pirhomeliso, M., Razavi, M.S., Hadjari, G., Salamati, P., 2014. Sulfur mustard effects on mental health and quality-of-life: a review. *Iran J. Psychiatry Behav. Sci.* 8, 11–21.
- Sharma, D.R., Sunkaria, A., Bal, A., Bhutia, Y.D., Vijayaraghavan, R., Flon, S.J.S., Gill, K.D., 2009. Neurobehavioral impairment, generation of oxidative stress and release of proapoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 208–218.
- Vandesquille, M., Baudouat, M., Decorte, L., Louis, C., Lestage, P., Béreacochéa, D., 2013. Working memory deficits and related disturbance of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol. Aging* 34, 1599–1609.
- 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 sponge-dawley rats with percutaneous exposure to sulfur mustard. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 532–540.

IV.2.2 Résultats objectif 2 : recherche d'adduits du CEES dans le cerveau après exposition cutanée

Voir article de M. Gilardoni et al., 2021 en annexe IX

L'objectif 1 ayant montré que les souris exposées au CEES pur présentent un état anxieux ainsi qu'un déficit de la mémoire de travail, une recherche d'adduits cérébraux a été conduite en collaboration avec le CEA de Grenoble.

Des cerveaux de souris exposées par voie cutanée au CEES ont été prélevés puis analysés afin d'étudier la diffusion du CEES. D'une part, les adduits au CEES avec la guanine en position N7 (N7Gua-CEES) ont été recherchés dans les extraits d'ADN cérébraux. D'autre part, plusieurs biomarqueurs du CEES ont été recherchés et dosés dans les broyats de cerveaux. Ces biomarqueurs sont les adduits du CEES avec le glutathion (GSH-CEES), avec la cystéine (Cys-CEES) et avec la N-acétylcystéine (NAC-CEES). Les analyses ont été effectuées par UHPLC-MS/MS avec SPE en ligne (protocole d'extraction et d'analyse décrit dans l'article de Gilardoni et al., 2021 en annexe IX). Dans les extraits d'ADN cérébraux, des adduits N7Gua-CEES ont été détectés de J1 à J14 post-exposition, avec un pic à J3 (Figure 51). La quantité d'adduits a diminué progressivement jusqu'à J14 mais est restée détectable ($18,0 \pm 6,7$ adduits pour 10^6 bases). Cet adduit N7Gua-CEES a également été détecté dans des extraits cérébraux de J1 à J14 post-exposition, avec un maximum à J1 puis une diminution progressive mais détectable jusqu'à J14.

D'autres biomarqueurs spécifiques du CEES dans les extraits cérébraux ont également été quantifiés (Figure 52). Les adduits GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES ont été détectés à J1 dans des quantités similaires. La concentration GSH-CEES et de NAC-CEES a ensuite diminué jusqu'à J14 post-exposition. La concentration de Cys-CEES semble augmenter à J3, cependant, cette augmentation est non significative. Les trois biomarqueurs diminuent progressivement jusqu'à J14 où ils restent encore détectables. Le GSH-CEES diminue très fortement dès J3 à cause d'un manque de sensibilité de la méthode analytique.

Il est à noter qu'aucun de ces adduits n'a été détecté avant l'exposition, confirmant ainsi leur spécificité.

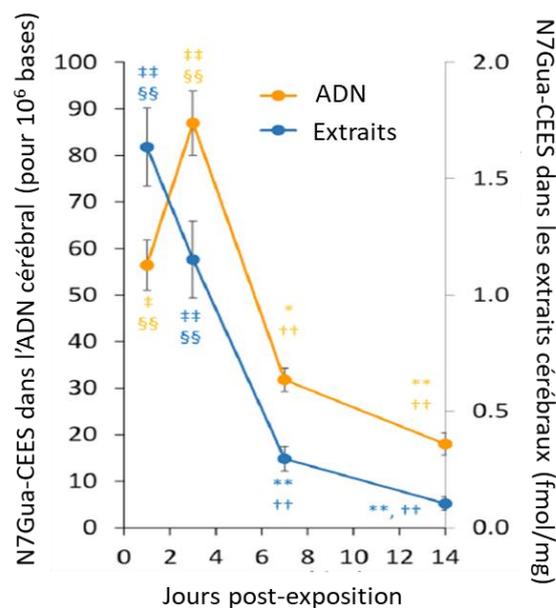


Figure 51 : Détection des adduits N7Gua-CEES dans l'ADN et les extraits cérébraux après exposition cutanée au CEES.

Analyse par UHPLC-MS/MS avec SPE en ligne. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, $p < 0,005$ ou $p < 0,01$ avec * et ** pour les comparaisons avec J1, † ou †† pour les comparaisons avec J3, ‡ ou ‡‡ pour les comparaisons avec J7, et § ou §§ pour les comparaisons avec J14.

Figure issue de Gilardoni et al., 2021 (66).

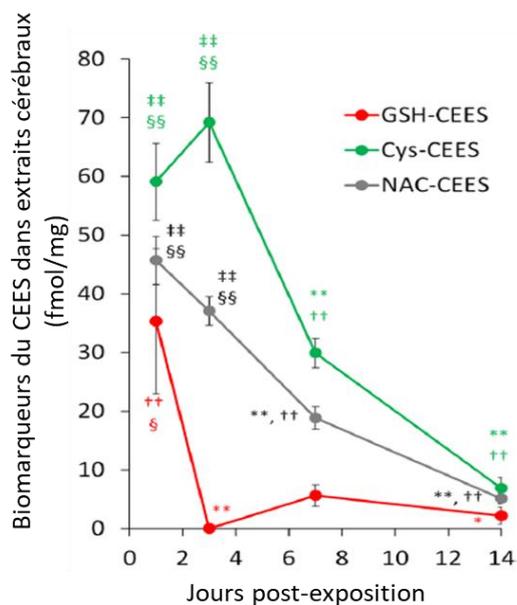


Figure 52 : Détection des biomarqueurs spécifiques du CEES dans les extraits cérébraux après exposition cutanée au CEES.

Analyse par UHPLC-MS/MS avec SPE en ligne. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, $p < 0,005$ ou $p < 0,01$ avec * et ** pour les comparaisons avec J1, † ou †† pour les comparaisons avec J3, # ou ## pour les comparaisons avec J7, et § ou §§ pour les comparaisons avec J14.

Figure issue de Gilardoni et al., 2021 (103).

Pour conclure, des adduits cérébraux du CEES (N7Gua-CEES, GSH-CEES, Cys-CEES et NAC-CEES) ont été détectés dès le 1^{er} jour après exposition et sont restés détectables jusqu'à la fin de l'étude (J14).

IV.2.3 Discussion et conclusion de la partie cérébrale

Les résultats des différents tests réalisés ont permis de mettre en évidence une anxiété et une atteinte de la mémoire de travail chez les seules souris exposées au CEES pur. En effet, les résultats des tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'open-field montrent tous deux une anxiété chez les souris exposées au CEES pur, tandis que les souris exposées au CEES dilué ou à l'acide chlorhydrique ne présentent pas cette anxiété. En effet, les souris exposées au CEES pur ont passé plus de temps dans les bras fermés du labyrinthe en croix surélevé et ont mis plus de temps pour rejoindre le centre de l'open-field. De plus, elles ont traversé moins de sections de l'open-field. A noter que les souris exposées au CEES pur n'ont pas présenté davantage de déficit locomoteur, que ce soit lors de leur déplacement dans l'open-field ou lors du test du labyrinthe en croix surélevé, puisque le nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe était similaire aux autres groupes. Les souris exposées au CEES pur ont donc moins exploré les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé ou la zone centrale de l'open-field. En effet, les zones ouvertes et éclairées de ces deux tests sont aversives pour les souris qui manifestent une préférence pour les endroits fermés et obscurs, plus sécurisants.

La souche de souris C57/Bl6 a été choisie pour ces tests comportementaux d'anxiété et de mémoire de travail. Elle possède l'avantage d'être largement utilisée pour ce type de tests (218-220). Son profil comportemental et émotionnel est donc bien documenté. Cependant, cette souche a l'inconvénient de nécessiter un rasage ou une dépilation avant l'exposition. Cette étape peut créer des microlésions ou modifier la surface cutanée suite à l'application d'une crème dépilatoire et de fait modifier la pénétration du toxique. Les souris SKH-1, utilisées pour l'étude cutanée, ont l'avantage d'être sans poils et ne nécessitent donc pas d'étape de rasage ou de dépilation. Cependant, le profil émotionnel et cognitif de ces souris n'est pas documenté. Une étude préliminaire (non publiée) conduite sur un faible effectif de cette souche a montré que les souris SKH-1 ne semblent pas adaptées pour la réalisation de ces tests comportementaux. En effet, ces souris sont déficitaires dans le test du labyrinthe en T. L'alternance ne semble donc pas être un comportement phylogénétiquement déterminé dans la souche SKH-1, contrairement aux souris C57/Bl6. De plus, le comportement exploratoire des SKH-1 a été observé dans le test de l'open-field. Il s'est avéré que leur

comportement était très hétérogène en termes d'exploration et de motricité. L'observation comportementale des souris SKH-1 montre qu'elles semblent posséder une anxiété naturelle plus importante que celle des souris C57/Bl6. Il a donc été décidé dans un premier temps, d'effectuer les tests de comportement avec des souris C57/Bl6 afin d'évaluer un potentiel effet du CEES. Un effet comportemental ayant été observé chez les C57/Bl6 exposées au CEES, il serait maintenant utile de mieux caractériser le profil émotionnel et comportemental de la SKH-1 sur d'autres tests avec de grands effectifs pour limiter la variabilité interindividuelle des résultats. Cela permettrait ainsi de réaliser les études cutanées et comportementales sur la même souche de souris SKH-1.

Les souris exposées au CEES pur ont vu leur mémoire de travail affectée à J5, puisqu'elles présentent un déficit d'alternance spontanée entre les bras du labyrinthe en T. Le test du labyrinthe en T est pertinent pour l'évaluation de la mémoire de travail chez la souris puisqu'il demande une flexibilité mnésique avec une mise à jour permanente. En effet, le comportement phylogénétique d'exploration de la souris implique pour chaque essai la mémorisation de l'essai n-1 et l'oubli de l'essai n-2. L'alternance spatiale implique plusieurs structures cérébrales dont l'hippocampe, qui joue un rôle majeur dans la mémoire spatiale, et le cortex préfrontal (255, 256). Ainsi, le déficit observé lors de ce test chez les souris exposées au CEES pur suppose une atteinte de ces structures. Le 8^{ème} essai, qui est effectué après un ITI raccourci, a par ailleurs démontré que les souris ne souffrent pas d'un manque de motivation à alterner après les 7 essais précédents (218). En effet, lorsque le temps de latence était plus long, (90 secondes lors des 7 premiers essais) une différence de pourcentage d'alternance est observée. Cette différence d'alternance ITI-dépendante montre que l'atteinte est d'ordre cognitif et non motivationnel ou sensorimoteur. Ce 8^{ème} essai est donc un critère d'inclusion des souris dans les différents groupes expérimentaux pour l'exploitation des résultats. Selon ce critère, aucune souris n'a été écartée pour l'analyse.

Par ailleurs, un lien existe entre l'anxiété et l'altération de la mémoire de travail (199), probablement en raison du passage des glucocorticoïdes à travers la barrière hématoencéphalique (BHE) puis de leur action au niveau de leurs récepteurs hippocampiques (168). Sur le plan cognitif, l'état anxieux mobiliserait les ressources attentionnelles, entraînant

ainsi un effort plus important (142). L'altération de la mémoire de travail observée chez les souris exposées au CEES pur pourrait être une manifestation de l'anxiété observée lors des tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'open-field. Un moyen de vérifier cette hypothèse serait d'injecter par voie systémique un inhibiteur de la synthèse surrénalienne de glucocorticoïdes, la métyrapone (176), chez les souris exposées au CEES pur puis d'évaluer leur performance en mémoire de travail dans le test du labyrinthe en T.

Les effets cognitifs et émotionnels observés chez la souris suggèrent l'implication de trois principales zones cérébrales : l'amygdale, le cortex préfrontal et l'hippocampe. Une atteinte des circuits neuronaux de ces zones cérébrales serait donc possible (155, 172, 178, 191). En effet, ces trois zones sont principalement impliquées aussi bien dans l'anxiété que dans la mémoire de travail spatiale. Un possible déficit hippocampique pourrait être mis en évidence par un dosage des glucocorticoïdes (corticostérone chez la souris) dont le taux se trouverait augmenté, ainsi que l'ont montré certains travaux (177, 178). En effet, dans la défense contre les effets du stress, les glucocorticoïdes entrent en jeu dans un second temps, après une latence de quelques minutes, après l'intervention immédiate des catécholamines (257) (voir Figure 21).

Pour compléter l'exploration de la mémoire des souris après exposition au CEES, un test de reconnaissance d'objets mettant en jeu la mémoire à plus long terme, pourrait être envisagé. Ce test consiste, lors de la phase d'acquisition, à placer la souris dans un open-field contenant un petit objet, afin qu'elle puisse librement l'explorer et devienne familière avec cet objet. La souris est ensuite réintégrée dans sa cage puis replacée dans l'open-field au bout d'un délai variable (en général 24 h), avec le même objet ainsi qu'un nouveau. Il faut au préalable s'assurer que le nouvel objet présente pour la souris le même intérêt exploratoire que le premier, en mesurant les temps d'exploration respectifs des deux objets sur un groupe indépendant de souris. Plusieurs paramètres sont mesurés tels que le temps passé à explorer chaque objet, le nombre de redressements et de sections traversées. Selon le délai entre

l'acquisition et la phase de test, plusieurs formes de mémoire peuvent être explorées (court, moyen, voire long terme).

L'exposition des souris à l'acide chlorhydrique (HCl) avait pour but de distinguer les effets dus au CEES par rapport aux effets dus à la gêne et à la douleur induites par la brûlure chimique. Ainsi, les effets cognitifs et émotionnels observés peuvent être attribués au CEES lui-même et non à la brûlure chimique. En effet, le groupe HCl n'a pas présenté de signes d'anxiété ni d'altération de la mémoire de travail. Cependant, les brûlures induites par HCl et par le CEES ne sont pas totalement identiques. Comme détaillé plus haut, la brûlure induite par un agent vésicant tel que le CEES résulte d'un mécanisme de toxicité spécifique (voir Figure 2 de Gros-Désormeaux et al., 2022 (258)). Le nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe en T était similaire entre les différents groupes de souris. Ainsi, les lésions induites par le CEES ou HCl n'ont pas eu d'effet sur la performance motrice des souris.

Cependant, des tests évaluant spécifiquement les capacités psychomotrices et la force des souris permettraient de mieux comparer l'impact des lésions cutanées entre les groupes brûlés. Pour mesurer les capacités motrices des souris, des tests d'activité spontanée, ou forcée sont disponibles. Ainsi, un test de mesure de l'activité spontanée (par exemple dans un actographe (259) ou à l'aide d'une roue instrumentée (260)) sur plusieurs jours pourrait être utilisé car il a été montré l'existence d'une relation entre la dépression et la baisse d'activité spontanée (261, 262). Ce test pourrait être complété par un test de motricité complémentaire tel que le tapis roulant qui consiste à faire courir les souris à une vitesse définie et variable, et à évaluer leur résistance à l'effort, leur endurance. Si les résultats sont similaires entre les groupes HCl et CEES, alors cela appuierait l'absence d'effets de la brûlure (par HCl ou CEES) sur la motricité. Le test du rotarod pourrait compléter l'exploration psychomotrice en évaluant la coordination locomotrice (224). Ce test consiste à faire marcher des souris sur une barre qui tourne à une vitesse définie pouvant varier. La barre est divisée en plusieurs compartiments par des cloisons, permettant ainsi de tester simultanément plusieurs souris. Le temps passé par la souris sur la barre ainsi que la vitesse pour laquelle l'animal est tombé sont enregistrés. Si les animaux ont une mauvaise coordination psychomotrice, ils tomberont rapidement. Si l'impact des brûlures HCl et CEES est similaire, les souris des deux groupes devraient tomber pour des vitesses et temps comparables. Le test d'agrippement ou « grip

test » permettrait quant à lui d'évaluer le pic de force maximale développée par les souris avant et après exposition au CEES ou à l'HCl (224). En effet, ce test consiste à mesurer la force déployée par la souris pour rester accrochée sur une barre, ou une grille. Une diminution de la force des souris après l'exposition aux agents serait attendue du fait de l'apparition des lésions. En revanche, entre les groupes CEES et HCl, la force maximale devrait être identique si les lésions génèrent le même niveau de douleur. Il existe par ailleurs des tests mesurant la douleur. Ces tests basés sur le déficit de posture permettent d'évaluer la répartition du poids de l'animal sur ses pattes. Le principe de ce test pourrait ne pas permettre de mettre en évidence des différences intergroupes, du fait de la localisation des lésions au niveau du dos.

Les tests effectués dans cette thèse (labyrinthe en croix surélevé, open-field et labyrinthe en T) ont permis d'évaluer l'anxiété et la mémoire de travail des souris après exposition au CEES. En revanche, la dépression n'a pu être explorée bien qu'elle fasse partie des principaux symptômes décrits chez les vétérans exposés à l'ypérite, plus de 40 % de cas selon les publications (136, 137, 263). La dépression pourrait être évaluée chez la souris, dans le cadre d'une étude à plus long terme, par le test de suspension caudale (tail suspension test) afin de compléter l'étude cognitive et émotionnelle des souris après exposition au CEES (264, 265). Ce test consiste à suspendre les souris par la queue à l'aide d'un ruban adhésif. Les souris tentent à plusieurs reprises de s'échapper en se redressant. Leurs tentatives de redressement échouant, elles finissent par rester immobiles par résignation. Si le CEES a un effet dépressif, alors l'état de résignation de ces souris sera atteint plus rapidement. Le test de Porsolt ou du désespoir comportemental, test de référence, évalue également la dépression bien qu'il soit plus difficile à mettre en œuvre, notamment pour juger de l'immobilité totale du rongeur (265).

Après pénétration cutanée, l'ypérite diffuse dans les organes au moyen de la circulation générale. Des adduits de l'ypérite ont ainsi été détectés dans le cerveau après une exposition cutanée (130). Nous avons fait l'hypothèse que les effets cognitifs et émotionnels observés chez la souris intoxiquées au CEES pourraient être liés à la présence d'adduits cérébraux. Le CEES, utilisé lors de ces tests comportementaux, est électrophile mais monoalkylant du fait de la présence d'un seul chlore au lieu de deux dans l'ypérite. L'étude analytique, en collaboration avec le CEA, à partir d'extraits et d'ADN cérébraux issus de souris exposées au CEES par voie cutanée a permis de démontrer la diffusion systémique du CEES vers le cerveau, ainsi que son

effet alkylant à distance du site d'exposition (66). Des adduits d'ADN cérébraux ont ainsi été détectés, aussi bien après une exposition cutanée à l'ypérite (68) qu'au CEES (66). Une recherche d'adduits cérébraux menée chez des souris ayant subi au préalable des tests comportementaux, permettrait d'objectiver une corrélation entre la présence d'adduits cérébraux et les effets cognitifs et émotionnels observés.

Par ailleurs, les adduits d'ADN cérébraux du CEES (66) et de l'ypérite (130) (en position N7 de la guanine) ont pu être détectés jusqu'à la fin des études, soit 14 jours après exposition. La persistance des adduits et l'évaluation du comportement des souris au-delà de 14 jours mériteraient d'être explorées. Ainsi, la mise en œuvre d'une batterie de tests comportementaux répartis sur plusieurs mois permettrait d'évaluer l'effet à long-terme du CEES. Le dosage de ces adduits, au CEA Grenoble, a fait appel à des techniques sophistiquées d'extraction automatisée solide/liquide (SPE) et d'analyse (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, HPLC MS/MS). Les effets cognitifs observés chez les victimes perdurent de nombreuses années post-exposition (137, 139). La présence de ces adduits mise en évidence chez la souris ne permet sans doute pas d'expliquer à elle seule les effets cognitifs et émotionnels observés chez la souris ainsi que chez les victimes humaines. D'autres investigations cérébrales seraient à envisager afin d'explorer d'autres mécanismes et acteurs responsables de ces déficits. En effet, la toxicité de l'ypérite n'est pas uniquement due à son caractère alkylant. Sa toxicité se manifeste également par un stress oxydatif, une peroxydation lipidique et une forte inflammation conduisant à la mort cellulaire par la nécrose et l'apoptose (53, 258).

L'ypérite est connue pour induire un stress oxydatif (53, 132), or le cerveau y est particulièrement vulnérable du fait de son contenu limité en antioxydants (superoxyde dismutase, glutathion, α -tocophérol...(266)) et de sa forte consommation en oxygène (57, 131, 267). Les neurones de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex frontal sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif et aux maladies neurodégénératives (131). Ainsi, une hypothèse pouvant expliquer les effets du CEES observés chez la souris pourrait donc être une neurotoxicité consécutive au stress oxydatif impactant ces zones.

Une étude effet-dose permettrait de savoir s'il existe un seuil en-dessous duquel aucun effet cognitif ne serait observé. En effet, les vétérans ont été exposés à des doses variables non quantifiables et tous n'ont pas présenté de symptômes cognitifs ou émotionnels. Dans notre étude conduite chez les souris, le groupe exposé au CEES dilué n'a pas présenté d'effet, contrairement au groupe exposé au CEES pur (268). Ainsi, une relation effet-dose peut être suggérée.

V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A travers les deux parties de cette thèse, cutanée et cérébrale, la pertinence du CEES en tant qu'analogue de l'ypérite a été évaluée.

Pour évaluer, sur le plan cutané, les lésions induites les agents vésicants, nous avons mis au point un modèle d'exposition, sur le modèle souris SKH-1, tout d'abord aux vapeurs de CEES, puis aux vapeurs d'ypérite. Des étapes d'optimisation ont été réalisées pour aboutir aux protocoles décrits dans cette thèse. La comparaison des lésions induites par ces agents a montré des similarités macroscopiques et histologiques ainsi que des différences en termes d'intensité de l'inflammation et de cinétique d'apparition des lésions. En effet, le délai d'apparition des lésions après exposition au CEES est différé de plus de 24 h par rapport à l'ypérite.

Lors de cette thèse, nous avons voulu évaluer une piste thérapeutique pour le traitement des lésions cutanées induites par l'ypérite. En effet, il n'existe aucun antidote et les seuls traitements mis en œuvre sont symptomatiques. La piste thérapeutique évaluée dans cette thèse ciblait la connexine-43 par l'ACT1 et l'ASODN. Cependant ces molécules n'ont pas permis d'améliorer significativement la cicatrisation des lésions induites par le CEES en termes qualitatifs ou temporels. D'autres pistes thérapeutiques émergent (258), notamment pour diminuer l'inflammation, telles que des modulateurs calciques agissant sur le canal TRPA1 ou encore des inhibiteurs de la FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase). Une étude conduite sur des souris exposées au CEES au niveau des oreilles a ainsi montré que deux inhibiteurs de TRPA1 (HC-030031 et A-967079) administrés par voie orale ou intrapéritonéale, entre 1 et 16 h post-exposition, permettaient de diminuer l'œdème, les taux de cytokines pro-inflammatoires et de MMP-9 (269). Une autre étude, également réalisée sur des souris exposées au CEES au niveau des oreilles, a montré que l'application d'un inhibiteur de la FAAH a permis de réduire l'inflammation induite par l'agent vésicant (270). La mélatonine est également une piste thérapeutique explorée du fait de son pouvoir antioxydant et également en raison de sa

capacité à piéger l'ypérite (« effet scavenger ») en formant l'ion thiirane moins toxique (271, 272). De plus, la mélatonine pourrait permettre de réduire les effets à long-terme de l'ypérite en modulant épigénétiquement l'expression des ARNm des enzymes antioxydantes ainsi que grâce à son potentiel rôle d'inhibition de l'ADN méthyltransférase (272, 273). La N-acétylcystéine (NAC) avait également été étudiée en tant qu'antidote de l'ypérite pour son action sur le stress oxydatif et également pour son potentiel effet scavenger (274). Cependant, une étude de spectrométrie de masse *in vitro* a montré le faible impact de la NAC pour réduire la concentration d'ypérite dans le sérum humain (275).

L'ypérite et le CEES vont tous deux agir sur des cibles cellulaires identiques et former des adduits aux protéines et à l'ADN. Le CEA de Grenoble avait précédemment mis en évidence la présence d'adduits cérébraux de l'ypérite à l'ADN (68) ainsi que le double adduit avec l'ADN et le glutathion (58). Notre étude, menée en collaboration avec le CEA de Grenoble, a mis en évidence la présence d'adduits cérébraux au glutathion, à la cystéine, à la N-acétylcystéine et à l'ADN (66). Cette étude prouve ainsi le passage du CEES au niveau du système nerveux central, tout comme l'ypérite. Le CEES revêt donc également un intérêt dans la mise au point de méthodes analytiques grâce à la détection de ses adduits dans les milieux biologiques. D'autres approches analytiques sont actuellement en cours de développement afin de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs et de tester d'autres méthodes d'investigation. Ainsi, nous poursuivons des collaborations avec l'Unité Risques des Technologies Emergentes (IRBA) ainsi qu'avec le CEA de Grenoble (INAC, MEM, Laboratoire Modélisation, Exploration des Matériaux – Université Grenoble Alpes, CEA) afin d'analyser les échantillons biologiques par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) HR-MAS (High Resolution-Magic Angle Spinning). Cette méthode revêt l'intérêt de ne pas nécessiter de préparation d'échantillons. Ainsi, des biopsies de peau peuvent être directement analysées après les avoir disposées dans des rotors. Il s'agira de comparer les spectres obtenus à partir de peau saine avec ceux obtenus à partir de peau exposée à l'ypérite ou au CEES. La différence de spectres pourra ainsi mettre en évidence un profil signature d'exposition à un agent vésicant. De plus, nous collaborons avec les équipes du CEA de Grenoble (IRIG/DIESE/SyMMES ; UMR 5819 CEA-CNRS-UGA), et du CEA de Saclay (MetaboHUB, LEMM, DRF/JOLIOT/DMTS/SPI ; CEA-INRA) et

de l'Unité Développements Analytiques et Bioanalyse (IRBA) dans le cadre d'analyses métabolomiques de plasma de souris et également de larmes de lapins exposés à l'ypérite. En effet, nous avons mis au point un modèle d'exposition oculaire aux vapeurs d'ypérite chez le lapin. Les yeux sont un organe particulièrement sensible à l'ypérite et dans un scénario d'exposition terroriste d'un grand nombre de personnes, il est nécessaire de mettre au point un système de détection permettant de confirmer l'exposition à l'ypérite et à terme d'orienter le diagnostic. Actuellement, les prélèvements sont issus d'une exposition à l'ypérite, mais les mises au point des méthodes analytiques ont été réalisées en amont avec du CEES.

Notre étude portant sur les effets comportementaux du CEES a mis en évidence un comportement de type anxieux chez les souris exposées au CEES pur, à la fois lors du test de labyrinthe en croix surélevé, et également dans l'open-field. De plus, les souris exposées au CEES pur ont présenté un déficit de la mémoire de travail spatiale dans le test du labyrinthe en T (268). Ces résultats confortent les effets psychocognitifs décrits chez les vétérans et civils ayant été exposés à l'ypérite notamment en Iran et en Chine (64, 137). De plus, des adduits cérébraux ont été détectés chez la souris SKH-1 après exposition à l'ypérite et au CEES (66, 68). La présence de ces adduits cérébraux pourrait être corrélée avec les effets comportementaux décrits dans cette thèse. Actuellement, il n'existe pas de prise en charge spécifique concernant les effets psychologiques et cognitifs de l'ypérite. Un suivi psychiatrique préventif pourrait être préconisé afin de les prévenir et/ou de les prendre en charge.

Par ailleurs, l'incident récent d'Arras de septembre 2021 révèle qu'une sensibilisation au risque d'exposition à l'ypérite semble nécessaire pour le personnel soignant et les populations du Nord et l'Est de la France, dont les sols contiennent encore de nombreux obus chimiques issus de la première guerre mondiale (41). En effet, plusieurs jours ont été nécessaires avant de poser le diagnostic d'exposition à l'ypérite chez l'ouvrier agricole ayant manipulé un obus fuyard. Ne se sachant pas exposé, cet ouvrier a ainsi contaminé sa famille. Le diagnostic initialement posé par le premier médecin consulté par l'ouvrier était erroné, retardant encore la prise en charge. L'ouvrier a par la suite été hospitalisé puis les autres salariés ont été examinés. L'IRBA a été sollicité concernant la conduite à tenir face à cette exposition à l'ypérite.

Une méconnaissance de la fiche Piratox n°6 par les équipes médicales a ainsi été mise en lumière lors de cet évènement.

Plusieurs moyens de détection permettent d'alerter sur un risque d'exposition à un agent chimique de guerre. Ainsi, le papier PDF1, qui se colore en rouge en présence d'ypérite, permet de réaliser une détection d'alerte. Néanmoins, ce papier ne convient pas pour la détection de vapeurs ou en présence de carburants, ces derniers engendrant des faux positifs. Dans notre laboratoire, nous utilisons des appareils portatifs de contrôle de contamination à 4 canaux (AP4C), pour la détection de contrôle. Ces appareils fonctionnent selon le principe de la spectrométrie de flamme. Les canaux de détection correspondent au phosphore, soufre, dérivés azotés et arsenic (276). Ainsi, selon le ou les canaux qui s'allument, il est possible de connaître la classe du toxique détecté. Si seul le canal soufre est allumé, alors il s'agit d'ypérite ou d'un analogue tel que le CEES qui contient lui aussi un atome de soufre. Si le canal arsenic s'allume en plus du canal soufre, il s'agit de la lewisite. Si les canaux soufre et phosphore sont allumés, il s'agit d'un neurotoxique organophosphoré de type agent V. Ces appareils AP4C ont l'avantage de pouvoir détecter des gaz et également des liquides en ajoutant un Système Portatif de Prélèvement de Produits Persistants par Evaporation (S4PE).

Du fait de la pénétration indolore de l'ypérite, de la latence d'apparition des symptômes et de son caractère persistant, une décontamination rapide, dès les premières minutes, est cruciale. Parmi les moyens de décontamination existants, le gant poudreux a pour principaux inconvénients de déplacer le toxique et de mettre en suspension une grande quantité de poudre potentiellement contaminée. Son utilisation est donc inadaptée en milieu confiné. Après adsorption de l'ypérite liquide, la fiche Piratox n°6 de l'ANSM préconise une décontamination cutanée par de l'eau en grande quantité et du savon doux (44). En effet, l'ypérite étant faiblement soluble dans l'eau, l'étape d'adsorption de l'ypérite liquide est importante pour éviter le risque d'étalement de l'agent lors la douche. Dans cette thèse, nous avons décontaminé les souris à l'aide de compresses imprégnées d'eau savonneuse puis d'eau, sans étape d'adsorption puisque l'exposition était uniquement réalisée sous forme vapeurs.

Les deux délais de décontamination testés, 1 h et 4 h, ont tous deux conduit à des lésions nécrotiques avec une cinétique d'apparition plus rapide chez les souris décontaminées à 4 h. Ce résultat montre qu'une décontamination une heure après exposition est trop tardive. Dans le cadre de l'étude comportementale (268), dans laquelle le CEES a été appliqué sous forme liquide, la décontamination a été réalisée à l'aide de solution d'hypochlorite de sodium à 5 % puis d'eau afin de neutraliser le CEES pour permettre la manipulation des animaux en toute sécurité. L'autre moyen de décontamination souvent utilisé dans les armées est la Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) qui agit notamment en solubilisant les composés huileux. Bien que le CEES soit facilement accessible et que les lésions induites par cet agent soient similaires de celles de l'ypérite, une seule étude a évalué l'efficacité de la RSDL sur le CEES (277). Cette étude de Cao et al., 2018 a été conduite *in vitro* sur des explants de peau humaine et a comparé l'efficacité de la RSDL avec une autre solution, le Dermal Decontamination Gel (DDGel). Les auteurs ont conclu que le DDGel était plus efficace que la RSDL en termes de diminution de la pénétration cutanée et de l'absorption systémique du CEES (277). A notre connaissance, cette étude n'a pas été conduite *in vivo* pour confirmer ces résultats. En outre, il serait intéressant d'évaluer ces solutions de décontamination sur nos modèles d'exposition vapeur afin d'évaluer leur efficacité sur le réservoir cutané de toxique. En effet, la plupart de ces études portent sur la décontamination d'un toxique liquide sur la surface cutanée, mais en raison de l'existence d'un réservoir cutané d'ypérite, cette seule décontamination ne permet pas d'empêcher l'apparition des lésions. Bien que les groupes d'animaux décontaminés avec une éponge RSDL présentent à 72 h des surfaces de lésions plus petites que les groupes contrôles non décontaminés, la décontamination n'a donc pas permis d'empêcher leur apparition (71, 72). Des pistes de recherche basées sur une décontamination enzymatique sont à l'étude (209, 278). Une solution enzymatique, à base d'haloalcane déhalogénases, permettrait ainsi d'hydrolyser l'ypérite présente à la surface de la peau en thiodiglycol (TDG), non toxique (209). Cependant, ce type de solution ne permettrait pas d'atteindre le réservoir cutané. Ainsi, la solution de décontamination idéale traverserait la peau et piégerait l'ion épisulfonium l'empêchant d'exercer sa toxicité. Dans cette optique, une étude conduite avec le CEES a montré que les thiopurines seraient de meilleurs « scavengers » ou « piègeurs » électrophiles que la NAC et le GSH (279).

Lors de cette thèse, nous avons montré que le CEES induisait des effets pouvant être comparés à ceux induits par l'ypérite, que ce soit sur le plan cutané ou cognitif. La facilité d'accès au CEES, disponible dans le commerce, peut conduire à se poser la question d'une éventuelle restriction de son utilisation à l'instar du TDG qui est classé dans le tableau 2 de l'OIAC en tant que précurseur. Au vu des lésions décrites dans cette thèse, le CEES pourrait en effet être utilisé tel quel à des fins terroristes ou bien subir une chloration afin de le transformer en ypérite. Cette dernière hypothèse est cependant moins probable, l'ypérite pouvant déjà être synthétisée, relativement facilement, à grande échelle, par d'autres voies de synthèses (280). Ces éléments font de l'ypérite un agent de la menace terroriste à prendre en considération.

Annexe I : Protocole d'immunomarquage de la connexine-43

PROTOCOLE IMMUNOHISTOLOGIE – CONNEXINE 43

Date :
Expérimentateur :
Nombre de lames :
Numéros de blocs :

I. Liste des réactifs :

- Xylène
- Ethanol 100 %
- Ethanol 95%
- Eau stérile (placard)
- TBS 20X (frigo)
- Anticorps (frigo, Cx 43 = ab117843)
- Impress (antiRabbit, frigo tiroir du bas)
- Triton 100X (frigo)
- Dakopen (tiroir 06)
- Emerald (frigo)
- DAB (frigo, tiroir du bas)
- Eukitt (tiroir hotte de montage)
- Hematoxylin (placard côté évier)
- H₂O₂(frigo)

Jour 1 :

II. Déparaffinage des lames :

- Par automate
- Ou
- Bain de xylène : 2 fois 5 minutes
- Bain d'éthanol 100 % : 2 fois 1 minute
- Bain d'éthanol 95 % : 2 fois 1 minute
- Passage à l'eau courante dans verre à pied

Maintenir les lames toujours en milieu liquide pour ne pas qu'elles sèchent

III. Préparation des solutions :

- Préparer 1L de **TBS 1X** : prendre une bouteille d'eau stérile (bouchon orange dans le placard) et retirer 50 mL à l'aide d'un falcon. Ajouter 50 mL de TBS 20X (frigo). Conserver à +4°C.
- Préparer un falcon de 50 mL de TBS 1X.
- Préparer 10 mL de **Triton 10 %** dans de l'eau : prendre petite bouteille d'eau stérile (bouchon bleu dans le placard), prendre 9 mL d'eau avec pipette pasteur dans un falcon et compléter avec 1 mL de Triton 100X. Mettre le falcon dans un verre à pied contenant de l'eau chaude pour homogénéiser la solution.
- Quand la solution de Triton 10 % est homogène, préparer 5 mL de Triton 0.5 % dans du TBS 1X : 250 µL de Triton 10 % qsp 5 mL de TBS 1X.
- Préparer dans le porte lame marron (celui qui va dans la cocotte) 75 mL de **citrate pH6** : 7.5 mL de citrate 10X (frigo) qsp 75 mL d'eau stérile.

IV. Démasquage (dans la cocotte) :

- Mettre 700 mL d'eau stérile/distillée dans le fond de la cocotte
- Brancher l'appareil, fermer le couvercle et appuyer sur le bouton marche qui passe au vert 
- Le signe chauffage s'allume, le cycle est terminé (environ **10 min**) quand le signe s'allume 
- Pendant le cycle, mettre de l'eau stérile dans le bac à lames noir
- Rincer au TBS dans une cuve à lames pendant **5 minutes** sous agitation (20 rpm)

Rinçage de la cuve marron à l'eau stérile

V. Préparation des lames :

- Faire un cercle au Dakopen (tiroir) autour des biopsies
- Déposer une goutte de TBS 1X (falcon) avec pipette pasteur sur les biopsies

Page 1 sur 3

Date/Visa :

- Rincer au TBS dans bac à lames noir pendant **5 minutes** sous agitation (20 rpm)

VI. Perméabilisation des lames :

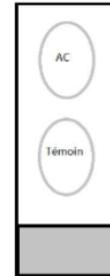
- Tapoter lames pour enlever le TBS et ajouter une goutte de Triton 0.5 %
- Laisser reposer sur le bac à lames **15 min** (pas obligation d'agiter)
- Rincer au TBS dans une cuve à lames **3 x 5 minutes** sous agitation (20 rpm)

VII. Saturation :

- Déposer une goutte suffisante d'Emerald (frigo) sur les coupes posées sur le bac noir. Redéposer une goutte au besoin 2-3 fois pour s'assurer d'en avoir mis suffisamment
- Laisser reposer dans le bac noir sous agitation, **au moins 2h** (TA).

VIII. Incubation de l'anticorps primaire :

- Enlever Emerald des lames en les tapotant dans le bac noir puis refaire au Dakopen 2-3 fois le tour des coupes
- Ajouter du TBS sur les coupes et s'assurer de l'étanchéité
- Chercher de la glace
- Diluer l'anticorps ab117843 au 1/1000^{ème}. Compter 300 µL par coupes à marquer (en sachant qu'une coupe sert de témoin sur chaque lame)
 - Volume à préparer = nombre de coupes à marquer x 300 µL
 - Dilution au 1/1000^{ème} (1 µL d'AC pour 1 mL d'Emerald)
 - On ne vortex pas, on agite en tapotant au doigt
- Déposer 290 µL d'Anticorps ou d'Emerald sur les coupes (procéder lame par lame)
- Incubation à +4°C **overnight** dans le bac noir fermé.



Jour 2 :

- Repréparer du TBS 1X
- Rincer au TBS dans une cuve à lames **3 x 5 minutes** sous agitation (20 rpm)

IX. Blocage de la peroxydase endogène :

- Sous hotte (au fond de la pièce d'inclusion), préparer 5 mL de H₂O₂ au 1/10^{ème}. Prélever 500 µL d'H₂O₂ + qsp 5 mL d'eau stérile.
- Déposer avec la pipette pasteur 1-2 goutte(s) d'H₂O₂ sur chaque coupe. Faire deux passages.
- Incuber sous hotte pendant **20 min**
- Rincer au TBS dans une cuve à lames **2 x 5 minutes** sous agitation (20 rpm)

Récupérer dans Falcon H₂O₂ et le jeter dans DASRI

X. Incubation de l'anticorps secondaire

- Sur bac noir, déposer 2 gouttes d'Impress (prêt à l'emploi) sur chaque zone.
- Laisser reposer **30 min**, sous agitation, fermé
- Rincer au TBS dans une cuve à lames **3 x 5 minutes** sous agitation (20 rpm)
- Préparer la DAB durant le dernier lavage
 - 5 mL d'eau dans un Falcon
 - 2 gouttes de buffer
 - 4 gouttes de DAB
 - 2 gouttes d'H₂O₂ (fournie dans le kit)
 - (on peut ajouter du nickel si on souhaite avoir une coloration noire plutôt que brune)

Mélanger par retournements après chaque ajout de réactif

XI. Incubation de peroxydase substrat

- Déposer de la DAB sur chaque coupe
- Incuber avec la DAB pendant environ 3 min. Regarder sur surface blanche la coloration apparaître. Quand elle est visible, stopper la réaction en trempant la lame dans de l'eau courante.
- Rincer à l'eau courante dans une cuve à lames **5 minutes** sous agitation (20 rpm)

XII. Contre-coloration, déshydratation et montage des lames

- Déposer une bonne goutte d'hématoxylin (dans placard vers la gauche) pour colorer les noyaux.
- Attendre **40 secondes** puis rincer dans cuve à lames avec de l'eau
- Sous hotte (celle au milieu de la pièce d'inclusion), préparer les bains successifs
 - Ethanol 95 % : **2 bains d'1 minute**
 - Ethanol 100 % : **2 bains d'1 minute**
 - Xylène : **2 bains de 5 minutes**
- Montage des lames :
 - Sécher avec une compresse le dessous de la première lame à monter.
 - Sortir des lamelles et choisir la taille adaptée (tiroir du haut à droite)
 - Mettre une goutte d'Eukitt (tube blanc dans le tiroir des lamelles) sur le côté de la lame
 - Déposer la tranche de la lamelle du côté de l'Eukitt. Voir l'Eukitt s'étaler le long de la tranche de la lamelle. Déposer délicatement la lamelle et attendre que l'Eukitt recouvre toute la surface. Chasser les bulles d'air en appuyant de façon à ne pas en avoir sur les coupes.
 - Laisser sécher les lames monter sur un portoir carton sous la hotte quelques heures
Attention aux traces : la lamelle bouge pendant quelques minutes le temps que l'Eukitt sèche

Attention : laisser les lames en attente de montage dans le xylène (si on les remet dans l'eau, l'Eukitt va moins bien se diffuser)

Date/Visa :

Page 3 sur 3

Annexe II : Protocole de broyage et extraction

PROTOCOLE BROYAGE & EXTRACTION ARN

Date :
Expérimentateurs :

Matériel et réactifs :

- Kit RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen)
- Aiguilles
- Kit contenant la DNase
- Gants non poudrés
- Bac de glace
- Chloroforme
- Ethanol 70 %
- Ethanol 96-100 %
- Eau RNase free
- Cônes stériles RNase-free (pointes contenant des filtres préconisés afin de limiter les contaminations croisées)
- Eau stérile
- Eppendorf 1.5 mL + 2mL
- Broyeur OMNI
- Tubes pré-remplis de billes de 2.8 mm céramique (ref UGAP : 2401388, ref Dutscher : 078106)
- Qiazol lysis (ref 79306)

Conditions de stockage :

Kits utilisés :

- RNeasy Plus Universal Mini Kit. Extraction d'ARNt à partir de tous types de tissus y compris ceux difficiles à lyser. Stockage du kit à température ambiante (15-25°C) pendant 9 mois. Le Qiazol lysis peut être conservé à température ambiante ou à 4°C.
- Kit contenant la DNase (Qiagen RNase free DNase set, référence 79254) stocké à +4°C

Attention : Les Kits contiennent des sels de guanidine qui peuvent interagir avec l'eau de javel libérant des composés toxiques. En cas de projection de liquide biologique sur la surface de travail, nettoyer avec un détergent adéquat et de l'eau puis désinfecter avec de l'hypochlorite de sodium (1% v/v).

Principe :

Ce kit permet la purification d'ARN total (taille supérieure à 200 nucléotides) à partir de tissus animaux riches en lipides. Son principe repose sur la lyse par phénol/sel de guanidine puis purification sur membrane. Le tampon Qiazol fourni dans ce kit permet la lyse d'un grand nombre de tissus et l'inhibition des RNases.

Les tissus, placés dans le tampon de lyse (Qiazol), sont broyés à l'aide de billes en céramique de 2.8 mm pré-remplies dans des tubes de 2 mL (ref UGAP : 2 401 388, ref Dutscher : 078106) et du Broyeur Omni (ref Dutscher : Homogénéiseur à billes Omni Bead Ruptor Elite - 078145B). Après ajout de chloroforme au broyat obtenu, une centrifugation permet de séparer les phases aqueuse et organique.

L'ARN est présent au niveau de la phase supérieure, l'ADN au niveau de l'interface et les protéines au niveau de la phase inférieure.

Après récupération de la phase supérieure (phase aqueuse), l'éthanol est ajouté pour obtenir les conditions optimales de liaison de l'ARN sur la membrane des colonnes lors de la centrifugation. Après différents rinçages, permettant l'élimination du phénol et de tout autre contaminant, les molécules d'ARN sont éluées par ajout d'eau RNase-free.

Points importants avant de commencer :

Attention : Le stockage dans un falcon® n'étant pas recommandé (dégradation du produit), ne prélever que le volume nécessaire de chloroforme

- Numéroté avec les références des échantillons les tubes contenant les billes
- Numéroté les tubes eppendorf® safelock stériles :
 - 1,5 mL du nombre d'échantillons
 - 2 mL du nombre d'échantillons)

Date/Visa :

Page 1 sur 4

PROTOCOLE BROYAGE & EXTRACTION ARN

- Préparer les étiquettes (cryo) à coller en fin d'extraction sur les tubes contenant les ARN extraits (préciser ARN, le nom de l'échantillon, date)
- **A préparer préalablement :**

1) Allumer la centrifugeuse et lancer un « fast temp » afin que la température atteigne 4°C

2) Ajouter de l'éthanol (96-100%) aux tampons RW1 et RPE (volume indiqué sur la bouteille)

3) Préparation de la DNase :

Dissoudre la DNase (1 500 KU) dans 550µL d'eau RNase-free en utilisant une seringue. Agiter avec précaution par retournement. Ne pas vortexer. Aliquoter la solution avant congélation -20°C (conservation pendant 9 mois). Les aliquots décongelés peuvent être conservés 6 semaines à 4°C (ne surtout pas les recongeler).

Broyage et homogénéisation du matériel initial :

Le broyage sera réalisé grâce à l'utilisation du broyeur Omni et de billes en céramique de 2.8 mm.

Procédure pour purifier des ARN totaux à partir de tissu animal

- Décongeler les échantillons sur glace.
- Déposer 1 mL de Qiazol dans chaque tube contenant les billes de céramique sous la hotte
- A l'aide d'une aiguille, placer chaque échantillon dans le tube de broyage correspondant
- Mettre les tubes dans le broyeur OMNI et après avoir bien serré le portoir, sélectionner le programme indiqué pour de la peau de souris.

	Nom du programme	Vitesse de broyage	Temps de broyage	Nombre de répétitions	Durée de la pause entre les répétitions	Méthode de refroidissement
<i>Programme optimisé</i>	Skin	7 m/s	20 s	2	40 s	Azote liquide
Programme réalisé						

Utiliser le même programme pour tous les échantillons.

- Récupérer l'homogénat dans un tube de 1,5 mL propre. Incuber les tubes contenant l'homogénat pendant 5 minutes à température ambiante afin de permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques.
- Ajouter 200 µL de chloroforme, mélanger par pipetage, et agiter vigoureusement pendant 15 sec.
- Incuber pendant 2 à 3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 12 000 g (=rcf) à 4°C ($RCF = 1.12 \times Radius \times (rpm/1000)^2$ (radius du rotor en mm)). Après centrifugation, faire remonter la centrifugeuse à température ambiante pour la suite du protocole.

PROTOCOLE BROYAGE & EXTRACTION ARN

- Après centrifugation, chaque échantillon présente 3 phases distinctes. La phase supérieure appelée phase aqueuse est transparente et contient les ARN. Le volume de cette phase aqueuse est d'environ 600 µL.
- Récupérer délicatement cette phase aqueuse (phase supérieure) et la transférer dans un nouveau tube de 2 mL. *(PAUSE POSSIBLE – durée du repas à +4°C)*
- Ajouter 1 volume (600 µL) d'éthanol 70% pour laver le lysat. Mélanger vigoureusement et ne pas centrifuger.
NB : un précipité peut apparaître lors de l'ajout d'éthanol. Ce phénomène n'affecte pas la procédure.
- Transférer 700 µL d'échantillon sur une colonne RNeasy mini placée sur un tube collecteur de 2 mL. Fermer le capuchon délicatement et centrifuger pendant 15 sec à 8 000 g (10 000 rpm) à température ambiante. Jeter l'éluat.
- Répéter l'étape 14. Jeter l'éluat.
- Ajouter 350 µL de tampon RW1 sur la colonne. Fermer le capuchon délicatement et centrifuger pendant 15 sec à 8 000 g à température ambiante afin de laver la membrane. Jeter l'éluat.
- Préparer la dilution de la DNase (en fonction du nombre d'échantillons) : pour 1 échantillon, diluer 10 µL de solution stock DNase I dans 70 µL tampon RDD (fourni dans le kit DNase) dans un tube eppendorf® de 2 mL. Agiter avec précaution par retournement. **Ne pas vortexer**. Centrifuger brièvement.
- Ajouter le mix DNase I (80 µL) directement au centre de la membrane de la colonne et incuber 15 min sur la paillasse (à température ambiante).
- Ajouter 350 µL de tampon RW1 sur la colonne. Fermer le capuchon délicatement et centrifuger pendant 15 sec à 8 000 g à température ambiante. Jeter l'éluat.
- Déposer 500 µL de tampon RPE sur la colonne. Fermer le capuchon délicatement et centrifuger pendant 15 sec à 8 000 g à température ambiante pour laver la membrane. Jeter l'éluat.
- Ajouter 500 µL de tampon RPE sur la colonne. Fermer le capuchon délicatement et centrifuger pendant 2 min à 8 000 g à température ambiante pour laver la membrane. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur propre.
- Centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min, à température ambiante.
- Placer chaque colonne sur un tube collecteur propre de 1,5 mL. Ajouter **30** ou 50 µL d'eau RNase-free au centre de la membrane (vol le plus faible pour avoir des ARN plus concentrés). Fermer le capuchon délicatement et centrifuger 1 min à 8 000g, à température ambiante.
- Répéter l'étape précédente en redéposant l'éluat obtenu à l'étape précédente (ce qui permet d'augmenter le rendement d'ARN).

Dosage et stockage des ARN obtenus

Date/Visa :

Page 3 sur 4

PROTOCOLE BROYAGE & EXTRACTION ARN

- Doser chaque échantillon au nanodrop en duplicate afin d'estimer la quantité d'ARN.
- En cas de doute, vérifier l'intégrité des ARN par un dosage par scanner agilent (dans l'idéal, il serait bon de faire également un dosage ADN pour vérifier une éventuelle contamination ADN).
- Stocker les ARN à -80°C.

Date/Visa :

Page 4 sur 4

Annexe III : Protocole de reverse transcription

PROTOCOLE RT

Date :

Expérimentateurs :

Matériel et réactifs :

- Kit RT² First Strand Kit Qiagen (330401 ou 3304404)
- Gants non poudrés
- Bac de glace
- Thermocycleur/bain marie
- Cônes stériles RNase-free (pointes contenant des filtres préconisés afin de limiter les contaminations croisées)
- Ependorf 1.5 mL/plaques

Contenu du kit :

Pour 12 réactions de 20 µl (first strand cDNA synthesis) :

- Buffer GE (24 µl),
- 5x Buffer BC3 (48 µl),
- RE3 Reverse Transcriptase Mix (24 µl),
- Control P2 (12 µl),
- Nuclease-Free Water (1 ml)

Principe :

RT² First Strand Kits yield results with as little as 25 ng or as much as 5 µg total RNA per reaction. Il est recommandé d'utiliser 0.5 µg d'ARN total pour les plaques 96p.

➔ Selon le nombre de gènes à étudier, prévoir 400 ng pour une 10^{aine} de gènes et 600 ng pour une 15^{aine}.

Points importants avant de commencer :

Travailler sur glace.

Mélanger en tapotant ou par pipetage, NE PAS VORTEXER, centrifuger brièvement.

Limite technique : pour le calcul des dilutions, prévoir un volume à prélever de minimum 2 µL d'ARN.

Dilution des ARN (400 ng dans 10 µL) :

- En fonction des concentrations mesurées en ARNm, calculer les dilutions à l'aide du fichier Excel. Pour les échantillons contenant beaucoup d'ARN, une dilution supplémentaire, au 1/2, peut-être à prévoir*
- Décongeler les réactifs du kit puis les centrifuger brièvement quelques secondes pour faire tomber le contenu au fond des tubes.
- Dans les tubes de dilution, ajouter 2 µL de buffer GE + le volume d'eau + volume ARN en se référant au tableau de dilution ($V_f = 10 \mu\text{L}$).
- Mélanger par pipetage.
- Tapoter puis centrifuger brièvement.

Date/Visa :

Page 1 sur 3

PROTOCOLE RT

Composant	Volume
ARN	0.4 µg
Buffer GE	2 µL
RNase-free water	A adapter
Volume final	10 µL

- Incuber pendant 5 minutes à 42 °C puis placer dans un bain durant 1 minute. Cette étape a pour but d'enlever la contamination d'ADN génomique.

Préparation du mix RT :

- Préparer le mix RT dans l'ordre suivant :

Réalisation du mix				
		Nombre d'échantillons :		12
	200 ng	600 ng		
	Volume pour un tube	Volume pour un tube	Nombre de tubes :	13
	(µL)	(µL)	(µL)	
5x buffer C3	4	12	156	
Control P2	1	3	39	
RE3 Reverse transcriptic	2	6	78	
Rnase free water	3	9	117	
Volume mix RT/tube	10	30	390	
Volume d'ARN+genomic	10	30		

- Ajuster les volumes de mix à préparer en modifiant le nombre d'échantillons (cellule jaune) à préparer lors de la session de RT. *(Tableau excel modifiable en double cliquant dessus)*
- Tapoter et centrifuger
- Ajouter 10 µL de mix RT au 10 µL d'ARN de l'étape précédente (Vf = 20 µL). Mélanger par aspiration refoulement.

Reverse transcription :

- Incuber 15 minutes à 42 °C puis stopper la réaction immédiatement en incubant à 95 °C pendant 5 minutes.
- Ajouter 91 µL d'eau RNase free pour chaque réaction et placer les échantillons d'ADNc obtenus sur glace pour procéder à la PCR. Sinon, stocker les échantillons à -20 °C.

Date/Visa :

Page 3 sur 3

Annexe IV : Protocole PCR

PROTOCOLE PCR

Date :
Expérimentateurs :

Matériel et réactifs :

- Gants non poudrés
- Bac de glace et blocs froid
- LC480 roche
- RT² SYBR® Green qPCR Master Mix ref 330509, Qiagen
- Cônes stériles RNase-free (pointes contenant des filtres préconisés afin de limiter les contaminations croisées)
- plaques 384p
- Sealing Foil
- RNase away

Conditions de stockage :

Conservation du kit à -20 °C. Noter la date d'ouverture sur la boîte.

Le mix est valable 1 mois à + 4°C.

Contenu du kit :

Pour 2000 réactions de 25 µl final :

- Mix Enzyme (Taq Polymerase, Buffer, Nucléotides, Sybr green)
- Eau PCR grade (2 x 25 mL)

Light Cycler 480 :

Mettre sous tension les LC480 et lancer le logiciel et le test automatique.

Préparation de l'enzyme :

Les manipulations se font exclusivement dans la pièce PCR avec la blouse bleue.

L'enzyme étant photosensible, il faut protéger l'enzyme et les échantillons de la lumière

Bien nettoyer le PSM avec du RNase away avant et après manipulation

- Décongeler les réactifs du kit puis les centrifuger brièvement quelques secondes pour faire tomber le contenu au fond des tubes.
- Dans un tube de dilution, préparer ajouter l'eau au master mix contenant l'enzyme (à l'abri de la lumière) en fonction du nombre de réactions à préparer. Prendre une marge de 10 % environ. *Pour cette manip on compte 7 plaques 384p avec 24 échantillons/plaque pour 16 gènes (intérêts + contrôles).*
- Tapoter puis centrifuger brièvement.

Date/Visa :

Page 1 sur 2

PROTOCOLE PCR

- Distribuer le mélange dans les puits puis ajouter selon le plan de plaque les échantillons d'ADNc.

Composant	Volume/puit
Master Mix	12,5 µL
RNase-free water	10,5 µL
ADNc	2,5 µL
Volume final	25 µL

- Sceller la plaque et « maroufler » avec la réglette.
- La centrifuger brièvement pour que le mélange soit bien au fond de la plaque. Vérifier qu'il n'y ait pas de présence de bulles d'air.

Lecture :

- Placer la plaque dans le bloc de lecture 384p
- Lancer le cycle avec les paramètres de dénaturation, amplification, fusion et cooling définis selon les gènes (environ 1h – 1h30).
- Sauvegarder le fichier sous le nom *Date_PCR-384p-1_plaqueRT1_gene*
- Exporter les fichiers
- Regarder le Tm Calling = fusion (cocher SyberGreen I). On doit voir un seul pic.
- Vérifier le link : 0 sinon enlever les plus fortes dilutions car cela signifie que l'analyse n'est pas linéaire mais polynomiale
- Regarder la pente (autours de -3.32) pour connaître l'efficacité
- Une fois la lecture finie, quitter le logiciel et éteindre le PC et le LC480.

Date/Visa :

Page 2 sur 2

Annexe V : Comparaison de l'évolution pondérale des souris exposées au CEES et à l'ypérite

Les souris exposées à l'ypérite présentent une perte de poids de 5,3 % en moyenne à J1 et de 6,1 % en moyenne à J2 après exposition (Figure 53). Les souris retrouvent leur poids initial vers J8 et le dépassent en fin de procédure vers J13-J14. Les souris exposées au CEES présentent une perte de poids de 4,7 % en moyenne à J1 et J2 et retrouvent leur poids initial dès J4 et le dépassent durant la deuxième semaine suivant l'exposition.

Les souris contrôles ayant subi le même protocole, à l'exception de la présence d'ypérite ou de CEES dans le bouchon, présentent également une perte de poids. Cette perte de poids est attendue du fait de l'anesthésie. Par ailleurs, les animaux sont isolés suite à l'exposition. Les souris sont des animaux sociables. Bien qu'un enrichissement de l'environnement soit apporté, un stress conduisant à une perte de poids peut également expliquer cette diminution pondérale observée chez tous les animaux, y compris les témoins.

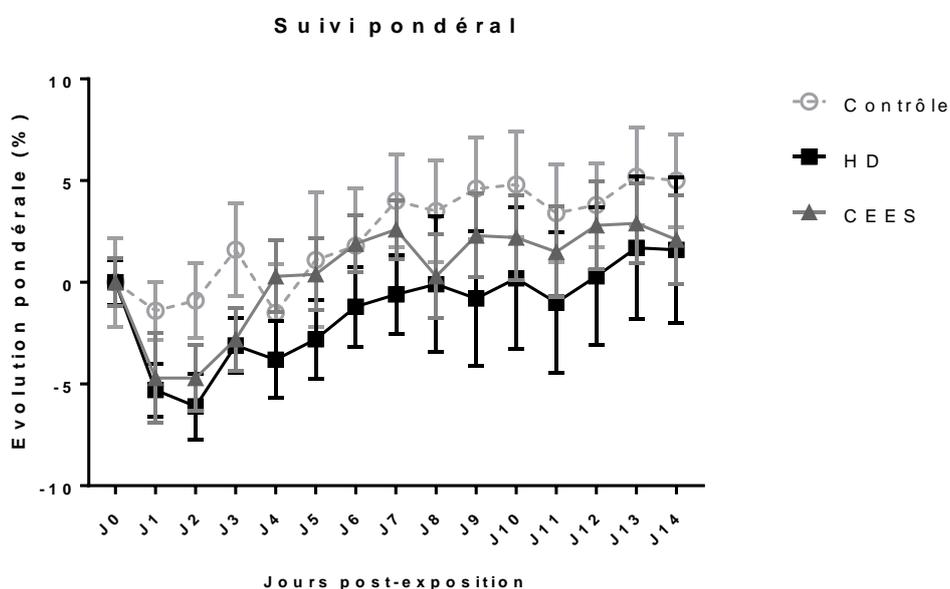


Figure 53 : Evolution pondérale des souris après exposition au CEES ou à l'ypérite.

Annexe VI : Comparaisons macroscopiques des lésions induites par le CEES et l'ypérite

Aspect des lésions :

Les lésions induites par le CEES et l'ypérite évoluent de façon similaire d'un point de vue macroscopique. Un œdème est visible dès les minutes suivant le retrait du bouchon pour les souris exposées à l'ypérite (Figure 54) et à partir de 4 h post-exposition pour les souris CEES (Figure 55).

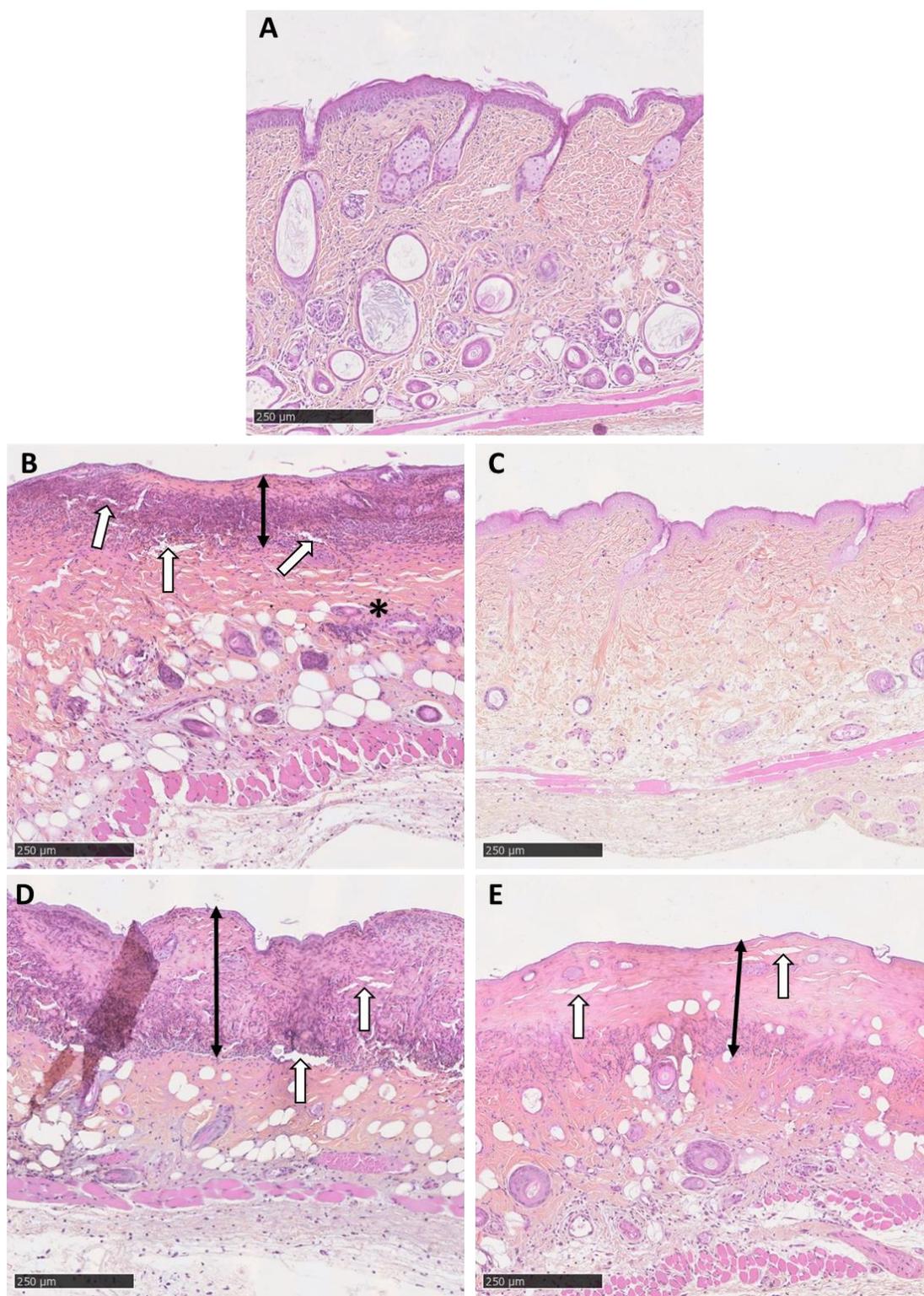


Figure 54 : Souris exposée aux vapeurs d'ypérite présentant de l'œdème dans les minutes suivant le retrait des bouchons



Figure 55 : Souris exposée aux vapeurs de CEES présentant de l'œdème, 4 h post-exposition.

Annexe VII : Comparaisons histologiques des lésions induites par le CEES et l'ypérite



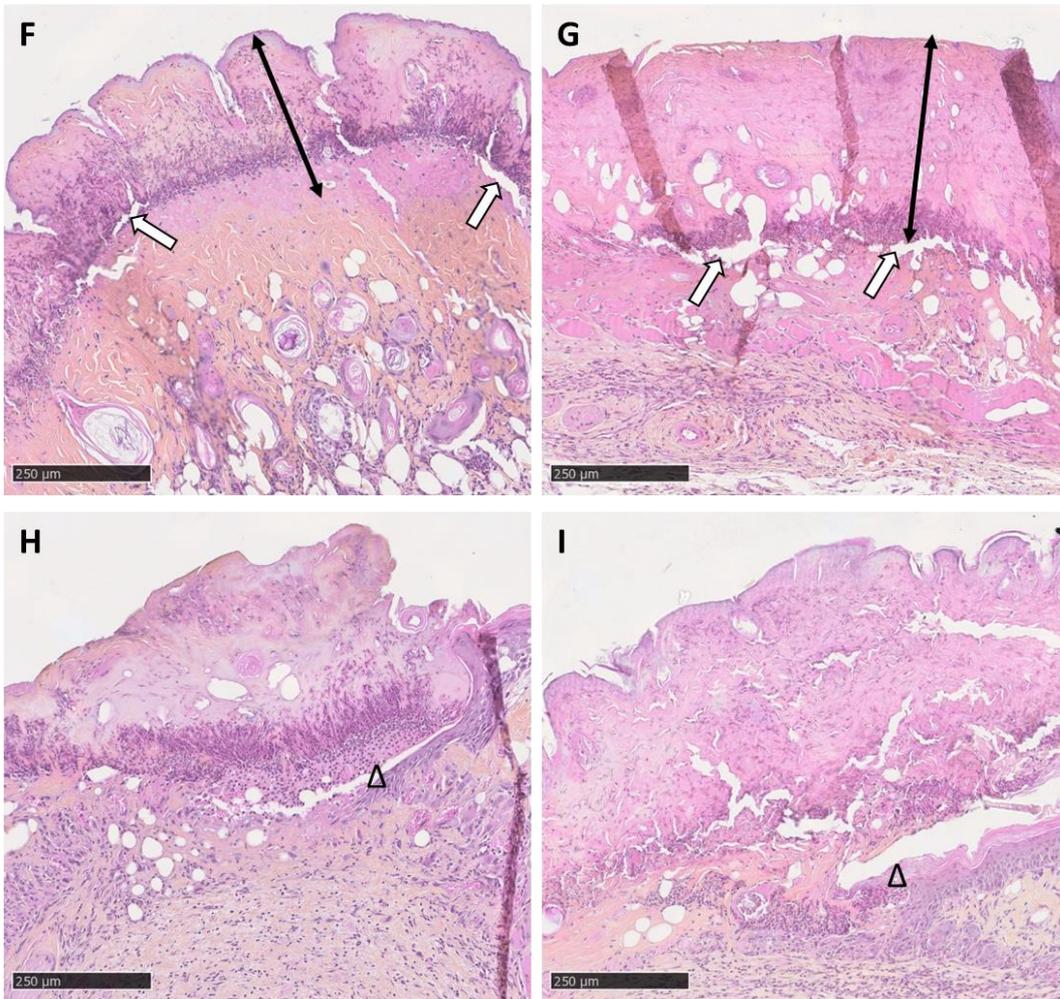


Figure 56 : Coupes de peau, coloration HPS, objectif x10.

A: contrôle, B et C : groupes HD et CEES à J1, D et E : groupes HD et CEES à J3, F et G : groupes HD et CEES à J7, H et I : groupes HD et CEES à J14. Astérisque : inflammation ; double-flèche : profondeur de la nécrose ; flèche blanche : microvésication intradermique ; triangle : réépithélialisation ; barre d'échelle de 250 μm .

Annexe VIII : Comparaisons des paramètres cutanés après exposition au CEES et traitement avec l'ASODN, ACT1, gel Pluronic® F-127

Tableau XI : Prise de poids moyenne (%) des souris après exposition au CEES, traitées avec
l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127

		J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
Témoin	Moyenne	0,0	-1,4	-0,9	1,6	-1,5	1,1	1,8	4,0	3,5	4,6	4,8	3,4	3,8	5,2	5,0
	SEM	2,2	1,4	1,8	2,3	2,4	3,3	2,8	2,3	2,5	2,5	2,6	2,4	2,1	2,4	2,3
	n	8	5	5	5	4	4	4	5	5	5	5	4	4	5	5
CEES	Moyenne	0,0	-4,7	-4,7	-2,8	0,3	0,4	1,9	2,6	0,3	2,3	2,2	1,5	2,8	2,9	2,1
	SEM	1,4	2,2	1,6	1,5	1,7	1,8	1,4	1,4	2,0	2,0	2,1	2,2	2,2	1,9	2,2
	n	23	22	18	18	13	13	13	13	8	8	8	8	8	8	8
CEES Pluronic	Moyenne	0,0	-4,5	-4,4	-3,5	-1,1	-1,7	-0,1	0,3	-2,8	-2,1	-3,8	-3,5	-2,2	-1,6	-1,6
	SEM	1,8	1,9	1,6	1,5	1,8	2,0	1,6	1,5	1,7	1,4	1,9	1,3	1,1	1,3	1,7
	n	20	20	15	15	10	10	10	10	5	5	4	4	4	4	4
CEES ACT1	Moyenne	0,0	-4,9	-7,1	-6,6	-4,5	-4,0	-3,5	-2,1	-0,2	-0,9	-2,0	-1,9	-0,2	-0,2	-1,6
	SEM	1,6	2,1	1,7	1,9	2,7	2,4	2,5	2,5	3,3	3,4	3,2	3,5	3,3	3,0	3,2
	n	20	20	15	15	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
CEES ASODN	Moyenne	0,0	-4,8	-5,0	-4,3	-0,7	-1,2	0,2	-0,2	-2,0	-2,5	-1,3	-2,0	-1,2	0,3	-0,5
	SEM	1,4	1,8	1,4	1,4	2,1	2,0	2,0	1,8	2,0	1,5	2,5	1,8	1,8	1,7	1,9
	n	20	20	15	15	9	9	9	9	5	5	5	5	5	5	5

Pas de différences significatives entre les groupes.

Tableau XII : Surfaces de lésions moyennes (mm²) des souris après exposition au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127

		J0	J1	J2	J3	J6	J7	J8	J9	J10	J13	J14
CEES	Moyenne	0,0	0,9	13,9	38,8	32,9	29,4	23,9	21,5	19,7	10,8	9,8
	SEM	0,0	0,5	3,8	3,2	2,6	1,6	2,2	2,0	1,2	1,7	1,7
	n	23,0	23,0	18,0	18,0	5,0	13,0	8,0	8,0	8,0	5,0	8,0
CEES Pluronic	Moyenne	0,0	3,6	27,8	43,3	35,1	27,1	24,2	22,1	19,2	10,8	7,9
	SEM	0,0	1,8	4,1	3,3	2,5	1,9	1,5	1,3	2,0	2,2	2,1
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	4,0	4,0	4,0
CEES ACT1	Moyenne	0,0	2,0	19,6	41,7	31,4	27,0	24,1	21,7	18,7	11,0	7,8
	SEM	0,0	1,0	3,7	3,6	2,4	1,8	1,1	1,5	1,2	1,6	1,8
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
CEES ASODN	Moyenne	0,0	0,9	21,7	41,6	35,8	29,0	27,4	25,5	21,4	11,3	7,1
	SEM	0,0	0,5	3,8	2,2	2,7	2,7	1,7	2,4	1,9	1,4	1,1
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	9,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Comparaisons CEES vs CEES Pluronic : ****p<0,0001 ; CEES vs CEES ASODN : §p<0,5 ; CEES Pluronic vs CEES ACT1 : #p<0,05.

Tableau XIII : ITA (°) moyens après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127

		J0	J1	J2	J3	J6	J7	J8	J9	J10	J13	J14
CEES	Moyenne	89,6	86,6	40,3	-34,1	-53,1	-48,9	-43,4	-49,8	-38,0	-2,3	-3,8
	SEM	0,2	3,2	13,3	8,1	3,8	3,9	5,2	7,4	5,5	19,0	13,1
	n	23,0	23,0	18,0	18,0	5,0	13,0	8,0	8,0	8,0	5,0	8,0
CEES Pluronic	Moyenne	89,7	75,8	-21,1	-54,1	-55,2	-58,9	-54,5	-53,1	-51,4	-5,4	0,7
	SEM	0,2	9,5	15,8	6,8	4,6	3,8	6,5	7,5	7,0	22,3	19,3
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	4,0	4,0	4,0
CEES ACT1	Moyenne	89,7	80,0	13,4	-48,2	-49,8	-52,8	-59,9	-56,4	-51,6	-14,6	7,1
	SEM	0,4	8,7	16,0	9,8	8,8	4,0	7,0	4,8	6,9	11,7	17,3
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
CEES ASODN	Moyenne	89,7	86,5	-4,8	-57,3	-62,9	-59,3	-66,9	-56,8	-49,0	-22,9	-2,2
	SEM	0,1	3,3	15,9	3,6	2,7	3,6	5,8	8,4	7,2	7,4	17,0
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	9,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Comparaisons CEES vs CEES Pluronic : ****p<0,0001 ; CEES vs CEES ASODN : \$\$\$p<0,001 ; CEES Pluronic vs CEES : ACT1 #p<0,05

Tableau XIV : PIE moyenne (g/m²h) après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127

		J0	J1	J2	J3	J6	J7	J8	J9	J10	J13	J14
CEES	Moyenne	10,6	18,4	82,8	133,7	116,7	104,0	92,4	95,4	95,0	63,7	80,9
	SEM	0,5	3,7	11,5	4,4	4,0	5,4	6,8	4,3	4,7	9,4	12,6
	n	23,0	23,0	18,0	18,0	5,0	13,0	8,0	8,0	8,0	5,0	8,0
CEES Pluronic	Moyenne	11,0	35,3	118,9	133,8	117,8	109,5	108,0	103,7	96,0	68,3	50,6
	SEM	0,5	9,4	7,9	3,2	3,7	3,7	3,5	4,8	5,1	10,2	11,5
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	4,0	4,0	4,0
CEES ACT1	Moyenne	10,7	32,0	104,2	128,5	120,7	106,0	100,8	93,8	90,3	69,7	62,6
	SEM	0,5	7,3	9,8	7,6	4,6	3,9	4,2	4,3	4,1	13,0	11,8
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
CEES ASODN	Moyenne	11,0	26,9	115,7	138,8	119,0	111,6	112,2	93,8	92,6	72,4	52,6
	SEM	0,6	6,4	10,1	2,5	3,8	3,7	3,5	4,4	6,6	14,7	11,6
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	9,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Comparaisons CEES vs CEES Pluronic : ***p<0,001 ; CEES vs CEES ASODN : \$\$\$p<0,001.

Tableau XV : Hydratation cutanée (HC) moyenne (u.a.) après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127

		J0	J1	J2	J3	J6	J7	J8	J9	J10	J13	J14
CEES	Moyenne	41,4	24,6	11,2	4,5	0,5	0,4	0,8	0,0	0,0	0,0	0,6
	SEM	1,2	2,5	2,8	1,6	0,6	0,6	1,1	0,0	0,0	0,0	0,8
	n	32,0	32,0	24,0	23,0	12,0	16,0	8,0	8,0	8,0	4,0	8,0
CEES Pluronic	Moyenne	42,0	31,5	9,9	1,6	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	2,9	3,8
	SEM	0,8	1,8	3,3	1,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	2,7	3,9
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	4,0	4,0	4,0
CEES ACT1	Moyenne	40,7	30,1	16,6	1,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	2,0	3,2
	SEM	1,4	2,6	3,3	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	1,9	2,6
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
CEES ASODN	Moyenne	41,1	31,2	13,3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	3,5
	SEM	1,6	2,0	3,6	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	3,2
	n	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	9,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Comparaison CEES vs CEES Pluronic : **p<0,01.

Tableau XVI : Score combiné lésionnel moyen après exposition des souris au CEES, traitées avec l'ASODN, l'ACT1 et le Pluronic® F-127

	J0	J1	J2	J3	J6	J7	J8	J9	J10	J13	J14
CEES	1,83	8,36	45,25	91,94	90,35	85	78,56	78,75	75,66	58,14	58,11
CEES Pluronic	0	15,79	76,33	99,14	92,23	86,36	83,68	81,29	77,76	57,84	50,99
CEES ACT1	0,78	14,28	58,61	96,19	89,66	84,66	83,1	79,62	76,35	60,26	52,62
CEES ASODN	0,54	10,9	67,18	100	94,2	88,06	88,47	81,99	77,99	62,9	51,6

Annexe IX : Article de Gilardoni et al., 2021

Article ***Evidence for the systemic diffusion of (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide, a sulfur mustard analog, and its deleterious effects in brain*** par Marie Gilardoni, Daniel Léonço, Fanny Caffin, Fanny Gros-Désormeaux, Camille Eldin, David Béal, Sadia Ouzia, Christophe Junot, François Fenaille, Christophe Piérard, Thierry Douki, *Toxicology* 462 (2021) 152950.



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., 2008), and on other battlefields until very recently (Sezigen and Kenar, 2020). In addition to these military concerns, SM is a threat for civilians that can be exposed to old ammunitions (Missiaen 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 (Lanks 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* (Gadsden-Gray et al., 2012; Gros-Desormeaux 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; Cullumbine, 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 (Drasch 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; Fidder 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 (Gros-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) appear 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* ($^{13}\text{C}_3$ 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).

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, Courtabouef, 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 dephosphorylate 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 homogenised 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. Sample were then centrifuged at 18,787xg 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 Nanosep® 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 detectors. 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 ionization 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

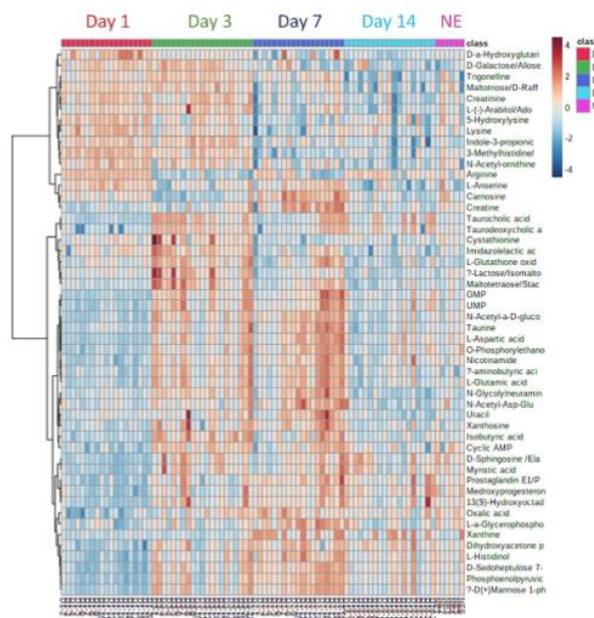


Fig. 1. Heatmap showing the modulation of the plasma levels of the top 50 impacted metabolites (according to ANOVA p-values) upon dermal exposure of hairless mice to CEES. The heatmap depicts high (red) and low (blue) relative abundances (log transformed) of metabolites from the most informative HILIC(-) 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 10^9 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 homogenisation 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

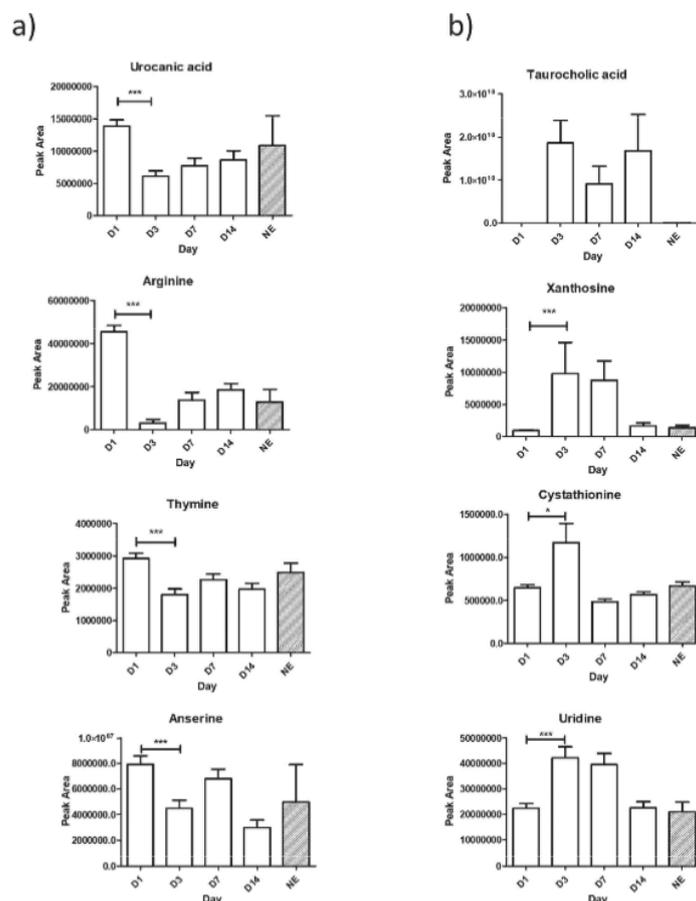


Fig. 2. Variation of the concentration of a series of plasma metabolites following exposure to CEES. The metabolites underwent either a) decrease or b) increase in their concentration levels. NE: non exposed mice.

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. ^{††,††}
N7Gua-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; Isono et al., 2018; Sharma et al., 2009). However, most of the related observational studies were performed on veterans of Iran-Iraq 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

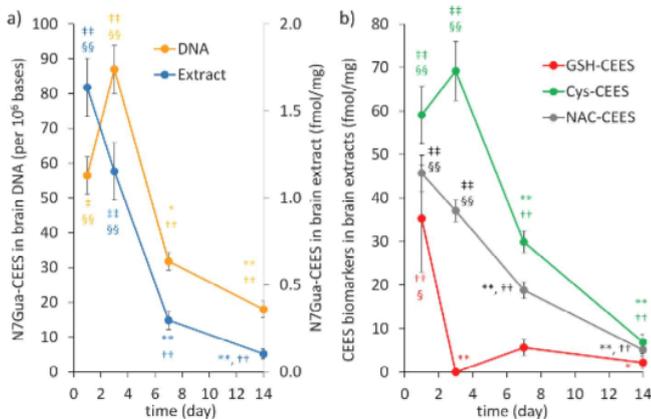


Fig. 3. Levels of biomarkers in brains of CEES exposed mice. Brains were collected after sacrifice after different periods. Half of the organ was used for DNA extraction and the other was homogenized in chloroform:methanol and extracted with water. Samples were then analysed by UHPLC-MS/MS with on-line 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; ³ and ¹¹ for comparison with day 7; and ⁵ and ⁵⁵ for comparison with day 14.

study, in order to clarify the origin of the behavioral effects observed in humans (Gros-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., 1987).

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 (Gadsden-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, 1998; Hughey et al., 1978). There, the Cys-S-conjugates are acetylated by the N-acetyl-transferase NAT8 (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 (Figs. 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 (Kolker 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 (Kolker 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 (Łuczykowski 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 focussed 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 mercapturate 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 haematoencephalic 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:<https://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., Mahmoudi, M., Jalali, E., Attaran, D., Maleki, M., Razavi, M. E., Zare, G., Tabatabaee, A., Jaafari, M.R., 2005. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 713–721.
- Batal, M., Boudry, I., 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, I., 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'-thiobis(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'-thiobis(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., Aldini, G., Derave, W., 2013. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 93, 1803–1845.
- Boudah, S., Olivier, M.F., Aros-Calt, 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., Sehmi, J.S., Gale, D.P., Wass, M.N., Ahmadi, 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., Cotlarciuc, I., Smith, G.D., de Silva, R., Deng, G., Devuyst, O., Dikkeschei, L.D., Dimkovic, N., Dockrell, M., Dominiczak, A., Ebrahim, S., Eggermann, T., Farrall, M., Ferrucci, L., Fluge, J., Forouhi, N.G., Gansevoort, R.T., Han, X., Hedblad, B., van der Heide, J.J.H., Heikkinen, B.G., Hernandez-Fuentes, M., Hypponen, E., Johnson, T., de Jong, P. E., Kleefstra, N., Lagou, V., Lapsley, M., Li, Y., Loos, R.J.F., Luan, J., Luttrough, K., Marčelch, C., Melander, O., Munroe, P.B., Nordest, L., Parsa, A., Peltonen, L., Penninx, B.W., Perucha, E., Pouta, A., Prokopenko, L., Roderick, P.J., Ruokonen, A., Samani, N.J., Sanna, S., Schalling, M., Schlesinger, D., Schlieper, G., Seelen, M.A.J., Shuldiner, A.R., Sijgren, M., Smit, J.H., Snieder, H., Soranzo, N., Spector, T.D., Steinvinkel, P., Sternberg, M.J.E., Swaminathan, R., Tanaka, T., Ubink-Veltmaat, L.J., Uda, M., Vollenweider, P., Wallace, C., Waterworth, D., Zerres, K., Waechter, G., Wareham, N.J., Maxwell, P.H., McCarthy, M.L., Jarvell, 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.
- Chilcott, 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.
- Cullumbe, H., 1947. Medical aspects of mustard gas poisoning. *Nature* 159, 151–153.
- Darchini-Maragheh, E., Nemati-Karimooy, 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 (sulphur 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, P., 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., Schaffer, 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., Rinna, 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.
- Giacomoni, F., Le Corguille, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Petera, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.F., Jacob, D., Goullitquer, S., Thevenot, E.A., Caron, C., 2015. Workflow4Metabolomics: 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-Desormes, F., Bercochea, 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 mercapturic acid pathway. *Crit. Rev. Toxicol.* 49, 819–929.
- Hemme, M., Fidler, A., van der Riet-van Everen, 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., Rebbeor, J.F., Ballatori, N., 1998. Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 275, G612–G619.
- Hug, D.H., Hunter, J.K., Dunkerson, D.D., 1998. The potential role for uracanic acid and sunlight in the immune suppression associated with protein malnutrition. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 44, 117–123.
- Hughes, R.P., Rankin, B.B., Elce, J.S., Curthoys, N.P., 1978. Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 211–217.
- Hussain, 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., Kituda, 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., Balszuweit, F., Eyer, F., Steinritz, D., Zilker, 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.
- Kolker, S., Christenson, E., Leonard, J.V., Greenberg, C.R., Boneh, A., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Dixon, M., Duran, M., Garcia Cazorla, A., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Kyllerman, M., Muhlhausen, C., Muller, E., Okun, J.G., Wilcken, B., Hoffmann, G.F., Burgard, P., 2011. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I-revised recommendations. *J. Inher. Metab. Dis.* 34, 677–694.
- Kuklenyik, Z., Calafat, A.M., Barr, J.R., Pirkle, 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. Separ. Sci.* 34, 3606–3618.
- Lanks, K.W., Turnbull, J.D., Aloyo, V.J., Dorwin, J., Papirmeister, 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.K., 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.
- Luczykowski, 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 Analyt. Chem.* 142, 116307.
- Malik, D.M., Rhoades, S., Weljie, 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, B.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.B., 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., Monks, T.J., 1995. Metabolism of 5-(Glutathione-S-YD)-Alpha-Methylglutathione following intracerebroventricular administration to male sprague-dawley rats. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 634–641.
- Missiaen, T., Soderstrom, M., Popescu, I., 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., Fenaille, F., Lozano, J.J., Junot, C., Colsch, B., Caraceni, P., Trebicka, J., Pavesi, M., Alessandria, C., Nevens, F., Saliba, F., Weizel, T.M., Abillos, A., Gustot, T., Fernandez, J., Moreno, C., Baldassarre, M., Zacherini, G., Plano, S., Montagnese, S., Vargas, V., Genesca, J., Sola, E., Bernal, W., Butin, N., Hautbergue, T., Cholet, S., Castelli, F., Jansen, C., Stelb, C., Campion, D., Mookerjee, R., Rodriguez-Gandia, M., Soriano, G., Durand, F., Benton, D., Baneres, 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.I.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 ACFE. *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., Fruton, 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* 85, 1154–1159.
- Nobakht, B.F., Aliannejad, R., Rezaei-Tavirani, M., Arefi Oskouie, A., Naseri, M.T., Parastar, H., Aliaikbarzadeh, 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., Aliannejad, 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.L., Meier, H.L., Petralli, J.P., Johnson, J.B., 1985. Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5, 134–149.
- Paromov, V., Suintres, 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., Qiu, 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., Sobotka, 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., Ruttikay-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 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, 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.
- 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., Eldin, C., Gudimard, L., Caffin, F., Gros-Desormeaux, F., Lenoco, D., Fenaille, F., Junot, C., Pierard, 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., Balszweitt, 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.
- Serigen, 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., Bhatia, 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.
- Sheehan, 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., Alamedini, 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.
- Sidell, 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. Neuropath. Exp. Neurol.* 62, 146–153.
- Strauss, K.A., Williams, K.B., Carson, V.J., Poskitt, L., Bowser, L.E., Young, M., Robinson, D.L., Hendrickson, C., Beiler, 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 1: 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., Nicholls, A.W., Reilly, 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.
- Tabone, M., Bressa, C., Garcia-Merino, J.A., Moreno-Perez, D., Van, E.C., Castelli, F.A., Fenaille, 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., Papirmei, B., 1973. Induction of axon growth and increased acetylcholinesterase production in mouse neuroblastoma cells by sulfur mustard. *Proc. Feder. Amer. Soc. Exp. Biol.* 32, 573.
- Vanninen, P., Ostin, A., Beldowski, J., Pedersen, E.A., Soderstrom, M., Szubska, M., Grabowski, M., Siedlewicz, G., Czub, 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., Kiammehr, Z., Faghilzadeh, S., Ghazantari, 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., McConkey, D.J., Norval, M., Ullrich, 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.

Annexe X : Article de Roser et al., 2021

Article ***Glutathione conjugates of the mercapturic acid pathway and guanine adduct as biomarkers of exposure to CEES, a sulfur mustard analog*** de Marie Roser, David Béal, Camille Eldin, Leslie Gudimard, Fanny Caffin, Fanny Gros-Désormeaux, Daniel Léonço, François Fenaille, Christophe Junot, Christophe Piérard & Thierry Douki, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, volume 413, (2021) pages1337–1351

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

By Marie Roser¹, David Béal¹, Camille Eldin¹, Leslie Gudimard¹, Fanny Caffin², Fanny Gros-Désormeaux², Daniel Léonço³, François Fenaille³, Christophe Junot³, Christophe Piérard² and Thierry Douki^{1*}

- 1) Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, F-38000 Grenoble
- 2) Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Place Général Valérie André, BP 73, 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex, France
- 3) Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), MetaboHUB, F-91191 Gif sur Yvette, France

* Corresponding author:

Thierry Douki

ORCID: 0000-0002-5022-071X

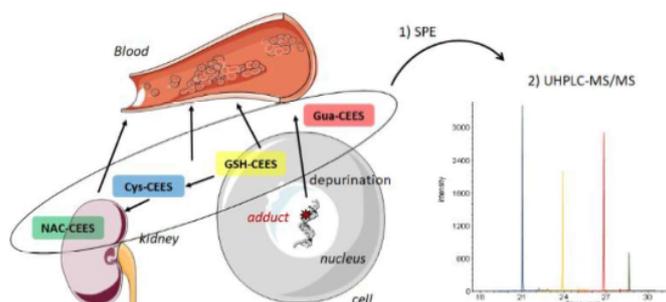
Email : thierry.douki@cea.fr

Tel (33) 4 38 78 31 91

Fax (33) 4 38 78 50 90

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 Organization 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 approach (UHPLC-MS/MS) to the conjugate of CEES to glutathione and two of its metabolites, the cysteine and the N-acetyl-cysteine 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-acetyl-cysteine 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 similarly 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 Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) prohibits the synthesis of chemical warfare agents and restricts their use to 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 hours 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-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.

< Figure 1 >

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 12h) [13, 14]. The directly hydrolyzed metabolite thiodiglycol (TDG) was detected in urine from SM-treated rats for 48h [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 TDGO were detected in the plasma of SM exposed rats, and the time windows for quantitative detection were 4 and 12h 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 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, SBMSE [17, 37, 38]. These metabolites are only detected for a few days in patients, and not in all of them [17, 39]. 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 [40–43]. Data have been reported that show a larger amount of Cys conjugates in the bile than derivatives of the β -lyase pathway [44], strongly suggesting the formation of other GSH-SM metabolites such as the 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 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 [45, 46]. 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 labelled analogs, and developed an ultra-high-pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry approach (UHPLC-MS/MS) with isotopic dilution. Then, the clean-up 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.

< Figure 2 >

Materials and methods

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* ($^{13}\text{C}_3$ 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 10.4mg of GSH were prepared in 5mL of phosphate buffer (10 mM, pH=7). Five μL 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 (90°C for 20 min in a heating block) at neutral pH as previously reported [47]. 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 (4.0x250mm, 5 μm particle size, Uptisphere, Interchim, Montluçon, France), a L4200 UV-Vis detector from Merck (Darmstadt, Germany). A gradient of ammonium formate (AmF, 5mM) and acetonitrile (0 min: 0% ACN, 10 min: 5% ACN, 30 min: 20% ACN, 45 min: 30% ACN) at a flow rate of 1mL/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 MilliQ water. N7Gua-CEES adduct was identified by comparison with a previously synthesized product [47]. GSH, NAC and Cys conjugates were also characterized by $^1\text{H-NMR}$ in D_2O . The concentration of each standard was determined by UHPLC-MS¹ used in the single ion monitoring. 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 (IS)

Solutions of 10 mM of each labelled biomolecules (either Cys*, NAC*, GSH* or dGuo*) were prepared in 1/10 PBS. CEES (20 µL) was added to 5 mg of the labelled compounds, namely either 4 mL of Cys*, 1.61 mL of GSH*, 1.72 mL of dGuo* or 3 mL 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 SPE (see below). One mL fractions containing 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 MilliQ water. The concentration of each internal standard was determined by UHPLC-MS/MS calibrated with unlabeled compounds.

Sample preparation: Solid Phase Extraction (SPE) of biomarkers from culture medium and plasma

Prior to SPE purification, all samples were centrifuged at 5000xg and the liquid phase was collected. Sample preparation, *i.e.* clean-up 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% formic acid (FAc) in water (1 mL) followed by 5% methanol containing 0.1% FAc (1mL). All traces of washing solution was removed from the column by suction for 10 minutes 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 ammonium formate (AmF) into 200 mL pure methanol. The eluent was dried in a Speed Vac 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) 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 x 2.0 mm ID, 1.8 µm particle size). Mobile phase A consisted of 2mM AmF and 0.2% FAc in MilliQ 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 minutes with the flow rate was set to 350 $\mu\text{L}/\text{min}$. The column temperature maintained at 40°C and the sample storage compartment 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, 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 minutes. The flow rate was set to 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, the column temperature maintained at 50°C, and the temperature of the sample storage compartment 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 ten 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 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 quadrupolar mass spectrometer (Framingham, MA) equipped with an Ion Drive™ 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 labelled 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), Ion Source Gas 2 (60 psi). Other compound-dependent parameters are listed in table S1 below. Data acquisition and quantitative analyses were performed using the Analyst and MultiQuant softwares, respectively.

< Electronic Supplementary Material, Table S1 >

Treatment of HaCaT human keratinocyte cell line

HaCat human keratinocytes (ThermoFischer 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 $14\,300 / \text{cm}^2$ 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, 1, 2, 5, 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 6h 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 trypsination. After deactivation of trypsin by 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 (400xg, 5min) 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 [48]. 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 1500xg). 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 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 [49] 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; phosphodiesterase I and alkaline phosphatase at pH 8 (50 mM tris) 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.

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 (14mm inner diameter, 1µm pore size filter, Greiner Bio-One, Austria) maintained in 12 well cell culture plates (sterile, with lid) (Greiner Bio-One, Austria). Medium (600 µL) 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, 2, 4, 10 mg/ml) in solution in 5µL of dichloromethane were applied to the epidermal surface, corresponding to 0, 0.08, 0.16, 0.40 µmol, respectively. Dichloromethane evaporation was permitted by waiting 30s 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, 6 and 24h. 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 (350µL) by using a TissueLyzer (15min, 25Hz). After adding proteinase K, samples were incubated 3h 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 2x100 µl of deionized water. The sample was freeze-dried overnight, and the resulting DNA residue was dissolved in 50 µL 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 4h, 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 animal were sacrificed by an injection of pentobarbital (150 mg/kg, ip route) and the blood was collected by heart puncture. Plasma was separated by centrifugation (2000 g, 10 minutes, 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 explants medium.

< Electronic Supplementary Material, Figure S1 >

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. $^1\text{H-NMR}$ 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. $^1\text{H-NMR}$ 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 on addition to GSH-CEES (m/z 396). The latter compounds was the most concentrated, in agreement with the NMR data. The concentration of second next product was half of that of GSH-CEES, while the proportion of the other impurities was below 10%. Since the mass of the contaminants was different from that of GSH-CEES, no interference was possible 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 (MS^2 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 [47]. 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.

< Electronic Supplementary Material, Table 2 >

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 quadrupolar 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 $m/z=61$ (C_2H_5S) and 89 (C_4H_9S) for all compounds. One exception was GSH-CEES for which the former fragment was replaced for by a more intense one at $m/z=121$ ($C_4H_9S_2$). Fragments at $m/z=321$ (loss of $CO_2H-CH-NH_2$) was observed for GSH-CEES and at $m/z=120$ (loss of C_4H_9S) for Cys-CEES. Detection in the MRM mode is very specific and, because it leads to a low background noise, very sensitive.

< Electronic Supplementary Material, Figure S2 >

Sample preparation

Solid phase extraction (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 include SPE, drying step, sample reconstitution were 65±5%, 84±3% 112±4% 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 2 (M+32) oxygen atoms that would correspond to sulfoxides (-SO-) and sulfones (-SO₂-), respectively (Electronic Supplementary Material, Fig. S3).

< Electronic Supplementary Material, Figure S3 >

Method validation

Validation of the method was performed by following the FDA recommendations for Bioanalytical Method Validation [50] and the Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology [51]. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for each biomarker were established by using the method called "blank determination" according to *Shrivastana et al.* [52]. 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 three standard deviation and LOQ is the analyte concentration corresponding to the sample blank value spiked with IS plus ten standard deviations. The values were determined with 18 matrix blank samples (cell culture medium). The calculated LOD for each analyte was 9, 48, 46 and 37 fmol for GSH-CEES, Cys-CEES, NAC-CEES and N7Gua-CEES, respectively. The corresponding calculated LOQ were 22, 111, 120 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.⁴⁷

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 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).

< Electronic Supplementary Material, Table S3 >

< 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 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 6h 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.

< Figure 3 >

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 [47]. 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 Brookes and Lawley in cell-free systems [53]. More recently, *Batal et al* determined the kinetics of 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, Zobel *et al* investigated the DNA adducts stability in HaCat and A549 cells; N7Gua was still detectable 6 days after treatments with SM [54]. In our work on HaCat cells, the corresponding N7Gua-CEES was detected in DNA under all the investigated conditions, 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).

< Figure 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 clean up. 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 is 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 [55]. This process leads to the release of the free alkylated base N7Gua-CEES and the formation of an abasic site in DNA [55, 56]. A similar process takes place in CEES-treated RNA [47] and mostly 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 [57], from which N7Gua adducts may depurinate.

< Electronic Supplementary Material, Figure S4 >

< Figure 5 >

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.

< Table 1 >

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 1h 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 [58]. 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 Figure 6a for the lowest applied amount (80 nmol), the level of DNA adduct actually decreases after 6h. 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 6h 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].

< Figure 6 >

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 time (1h, 6h 24h). 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 1h 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 [59]. GSH-CEES is rapidly excreted, which explained why we detected it in the medium (21.5 ± 10.3 nM) already after 1h. This early time is the maximum of concentration of GSH-CEES since this conjugate is not persistent. It is detectable at 24h 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 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, 40]. 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 one 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 group 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 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 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. 8c). 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 explants 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 [41, 42] 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 [60–62]. Acetylation of the Cys-S-conjugates is carried out by the N-acetyl-transferase NAT8, expressed almost exclusively in the kidney proximal tubular cells, and to a lower extent in the liver [63]. 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 [40, 64]. 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 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.

< Figure 7 >

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-acetyl-cysteine (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 and 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 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.

Acknowledgements

This work was supported by the "Agence de l'Innovation de Défense" (French Defence Ministry) and the "NRBC" program of CEA.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Romano JA, Lukey BJ, Salem H (2008) Chemical warfare agents : chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton :
2. Wattana M, Bey T (2009) Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital Disaster Med* 24:19–29 .
<https://doi.org/10.1017/S1049023X0000649X>
3. Ahmad S, Ahmad A (2016) Emerging targets for treating sulfur mustard-induced injuries: Coagulation and inflammation by sulfur mustard. *Ann N Y Acad Sci* 1374:123–131 .
<https://doi.org/10.1111/nyas.13095>

4. Panahi Y, Ghanei M, Zarch MV, Poursaleh Z, Parvin S, Rezaee R, Sahebkar A (2016) Evaluation of the pharmacoeconomics of drugs used for the treatment of long-term complications of sulfur mustard. *Ital J Med* 10: . <https://doi.org/10.4081/itjm.2016.743>
5. Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Panahi Y, Shoja MM (2011) Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Crit Rev Toxicol* 41:384–403 . <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.541224>
6. 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>
7. Brooks SM, Weiss MA, Bernstein IL (1985) Reactive Airways Dysfunction Syndrome (RADS). *Chest* 88:376–384 . <https://doi.org/10.1378/chest.88.3.376>
8. 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)
9. 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. *Environ Health Perspect* 104:485–488 . <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s3485>
10. Varmazyar M, Kianmehr Z, Faghihzadeh S, Ghazanfari T, Ardestani SK (2019) Time course study of oxidative stress in sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced toxicity. *Int Immunopharmacol* 73:81–93 . <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.055>
11. Black RM (2008) An Overview of Biological Markers of Exposure to Chemical Warfare Agents. *J Anal Toxicol* 32:2–9 . <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.2>
12. Thavaselvam D, Flora SS (2014) Chemical and biological warfare agents. In: *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier, pp 521–538
13. 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. *J Chromatogr A* 1572:106–111 . <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.035>
14. 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 Chromatogr B* 1028:42–50 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.003>
15. Koryagina NL, Savel'eva EI, Khlebnikova NS, Radilov AS (2018) Determination of Thiodiglycol and Its Oxide in Biomedical Samples by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Anal Chem* 73:1209–1216 . <https://doi.org/10.1134/S1061934818130075>
16. 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 Chromatogr B* 917–918:100–107 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.035>
17. 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 . <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.017>

18. 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>
19. 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. *Anal Bioanal Chem* 407:7037–7046 . <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8842-8>
20. 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>
21. 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. *J Anal Toxicol* 32:25–30
22. 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>
23. Ludlum DB, Austin-Ritchie P, Hagopian M, Niu T-Q, Yu D (1994) Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. *Chem Biol Interact* 91:39–49
24. 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. *Toxicol Lett* 233:1–7 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.001>
25. Zubeł T, Bürkle A, Mangerich A (2018) Mass spectrometric analysis of sulfur mustard-induced biomolecular adducts: Are DNA adducts suitable biomarkers of exposure? *Toxicol Lett* 293:21–30 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.014>
26. van der Schans GP, Mars-Groenendijk R, de Jong LPA, Benschop HP, Noort D (2004) Standard Operating Procedure for Immunoblot Assay for Analysis of DNA/Sulfur Mustard Adducts in Human Blood and Skin. *J Anal Toxicol* 28:316–319 . <https://doi.org/10.1093/jat/28.5.316>
27. 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 273:644–650 . <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.010>
28. 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. *Chem Res Toxicol* 28:532–540 . <https://doi.org/10.1021/tx5004886>
29. 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. *Chem Res Toxicol* 28:1224–1233 .
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00055>
30. 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 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, 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. *J Chromatogr B* 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 (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 .
<https://doi.org/10.1124/jpet.110.173708>
 33. 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 Radic Biol Med* 51:2272–2280 .
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.020>
 34. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* 134:489–492 . <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
 35. Gonçalves-Dias C, Morello J, Correia MJ, Coelho NR, Antunes AMM, Macedo MP, Monteiro EC, Soto K, Pereira SA (2019) Mercapturate Pathway in the Tubulocentric Perspective of Diabetic Kidney Disease. *Nephron* 143:17–23 . <https://doi.org/10.1159/000494390>
 36. Cooper AJL, Krasnikov BF, Niatsetskaya 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>
 37. 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 Chromatogr B* 917–918:100–107 . <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.035>
 38. Lee JY, Lee YH (2015) Solid-Phase Extraction of Sulfur Mustard Metabolites Using an Activated Carbon Fiber Sorbent. *J Anal Toxicol* bkv112 . <https://doi.org/10.1093/jat/bkv112>
 39. Sezigen S, Kenar L (2020) Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. *Toxicol Lett* 320:52–57 . <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.001>
 40. Hanna PE, Anders MW (2019) The mercapturic acid pathway. *Crit Rev Toxicol* 49:819–929 .
<https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1692191>
 41. 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>

42. Blair IA (2010) Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. *Biomed Chromatogr* 24:29–38 . <https://doi.org/10.1002/bmc.1374>
43. Watson W, Mutti A (2004) Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *BIOMARKERS* 9:211–242
44. Teichert J, Sohr R, Hennig L, Baumann F, Schoppmeyer K, Patzak U, Preiss R (2009) 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* 37:292–301 . <https://doi.org/10.1124/dmd.108.022855>
45. Black RM, Brewster K, Clarke RJ, Harrison JM (1992) 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* 71:49–58 . <https://doi.org/10.1080/10426509208034495>
46. Biemann A, Sambiagio N, Wehr N, Gerber-Lemaire S, Bochet CG, Curty C (2018) Synthesis of different glutathione–sulfur mustard adducts of verified and potential biomarkers. *RSC Adv* 8:23881–23890 . <https://doi.org/10.1039/C8RA03360A>
47. 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. *Toxicol Environ Chem* 95:260–276 . <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.758729>
48. 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>
49. Douki T, Odin F, Caillat S, Favier A, Cadet J (2004) Predominance of the 1,N2-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol Med* 37:62–70 . <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.013>
50. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2018) *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 44
51. (2013) Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol* 37:452–474 . <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>
52. 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>
53. Lawley P, Brookes P (1963) Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem J* 89:127–138 . <https://doi.org/10.1042/bj0890127>
54. Zube 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. *Arch Toxicol* 93:61–79 . <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2324-7>

55. Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J, Swenberg JA (2009) The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 678:76–94 . <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.006>
56. Gates KS, Nooner T, Dutta S (2004) Biologically Relevant Chemical Reactions of N7-Alkylguanine Residues in DNA. *Chem Res Toxicol* 17:839–856 . <https://doi.org/10.1021/tx049965c>
57. 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>
58. Nagy SM, Golumbic C, Stein WH, Fruton JS, Bergmann M (1946) The penetration of vesicant vapors into human skin. *J Gen Physiol* 29:441–469 . <https://doi.org/10.1085/jgp.29.6.441>
59. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390: . <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>
60. Hughey RP, Rankin BB, Elce JS, Curthoys NP (1978) Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 186:211–217 . [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90430-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90430-7)
61. Hanigan MH (1998) γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: Its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 111–112:333–342 . [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00170-1)
62. Griffith OW (1981) The Role of Glutathione Turnover in the Apparent Renal Secretion of Cystine. *J Biol Chem* 256:12263–12268
63. 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 RJF, 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, Ruokonen 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>
64. Hinchman CA, Rebbeor JF, Ballatori N (1998) Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 275:G612–G619 . <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.4.G612>

FIGURES

Figure 1: Reactivity of sulfur mustard with biomolecules

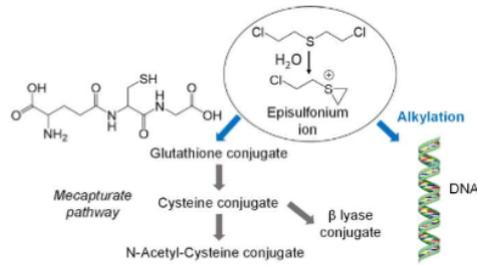


Figure 2: The structures of the targeted CEES biomarkers

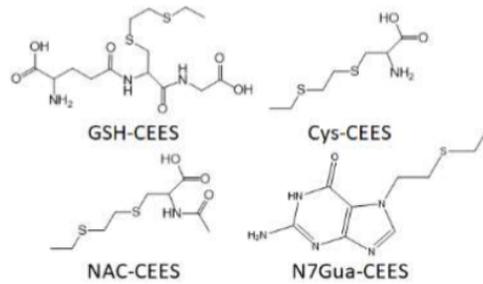


Figure 3: Survival of HaCaT cells exposed for 30 min to increasing concentrations of CEES, ranging between 0 and 100 mM. Survival was measured by a MTT assay performed 24 h after treatment. Result are mean \pm SEM (n=6)

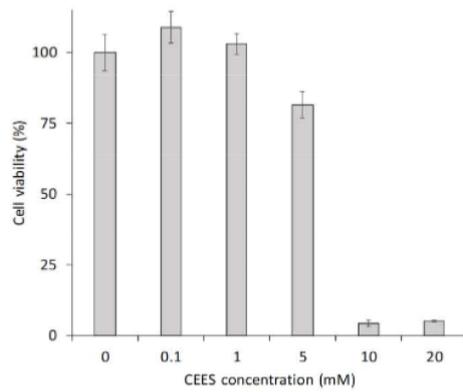


Figure 4: Formation of N7Gua-CEES in HacaT cells exposed to CEES concentration ranging between 0 and 10 mM. DNA adducts were quantified by UHPLC-MS/MS (n=9) after DNA extraction and hydrolysis. Results were normalized with respect to the amount of normal bases.

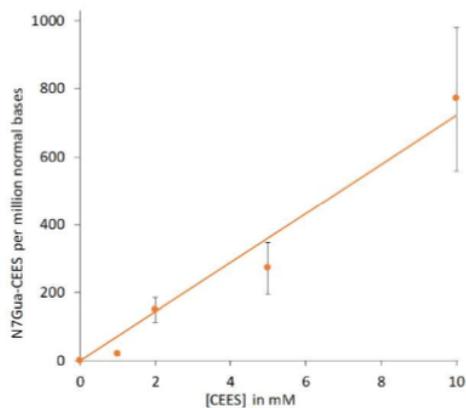


Figure 5: Detection and quantification of biomarkers in the culture medium of HaCat cells a) GSH and Cys conjugates, b) N7Gua adduct. Cells were exposed to 30 min to 0, 1, 2, 5, 10 mM of CEES After 6h incubation, the medium was collected, purified by SPE and analyzed by UHPLC-MS/MS (n=9). Results are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

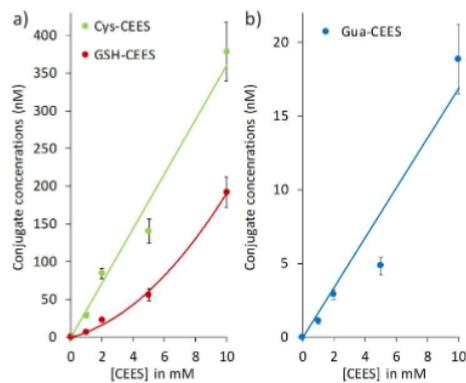


Figure 6: Time-course evolution of the level of biomarkers following exposure of human skin to 80 nmol of CEES a) N7Gua-CEES in the DNA and culture medium. DNA adducts were quantified by UHPLC-MS/MS after DNA extraction and digestions (n=6). For DNA, results were normalized with the respect to the amount 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).

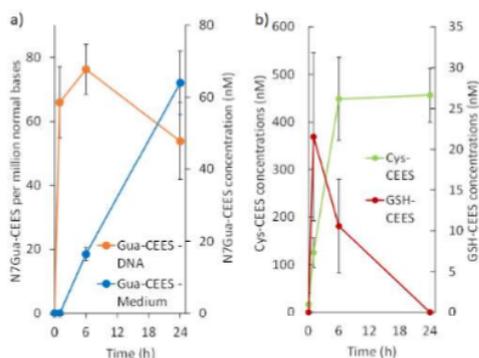
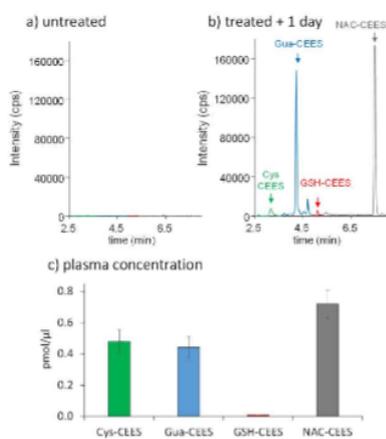


Figure 7: Detection of the biomarkers in blood plasma from mice. Chromatogram of the analysis of plasma from a) unexposed mice and b) mice 1 day after cutaneously exposure to vapors of CEES; c) concentration of the four biomarkers in the plasma of exposed mice. Results are expressed in pmol/ μ l. They are means \pm SEM (n=4)



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

By Marie Roser, David Béal, Camille Eldin, Leslie Gudimard, Fanny Caffin, Fanny Gros-
Désormeaux, Daniel Léonço, François Fenaille, Christophe Junot, Christophe Piérard and
Thierry Douki

Electronic Supplementary Material

Table S1: MRM transitions used for the UHPLC-MS/MS detection of the biomarkers and their internal standards, and the corresponding optimized mass spectrometry parameters.

Name	Transition (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CxP (V)	Dwell Time (msec)
Gua-CEES 61	240 → 61	50	8	50	10	50
Gua-CEES 89	240 → 89	45	15	20	10	50
Gua-CEES 55	240 → 55	45	8	50	5	50
<i>Gua-CEES* ID 61</i>	<i>245 → 61</i>	50	8	50	10	50
<i>Gua-CEES* ID 89</i>	<i>245 → 89</i>	45	15	20	10	50
<i>Gua-CEES* ID 55</i>	<i>245 → 55</i>	45	8	50	5	50
GSH-CEES 89	396 → 89	45	8	20	10	50
GSH-CEES 121	396 → 121	45	8	20	10	50
GSH-CEES 321	396 → 321	45	8	20	10	50
<i>GSH-CEES* ID 61</i>	<i>399 → 61</i>	45	8	70	10	50
<i>GSH-CEES* ID 89</i>	<i>399 → 89</i>	45	8	20	10	50
<i>GSH-CEES* ID 121</i>	<i>399 → 121</i>	45	8	20	10	50
Cys-CEES 61	210 → 61	45	8	60	10	50
Cys-CEES 89	210 → 89	45	8	20	10	50
Cys-CEES 120	210 → 120	45	8	20	5	50
<i>Cys-CEES* ID 61</i>	<i>214 → 61</i>	45	8	60	10	50
<i>Cys-CEES* ID 89</i>	<i>214 → 89</i>	45	8	20	10	50
<i>Cys-CEES* ID 93</i>	<i>214 → 93</i>	45	8	20	5	50
NAC-CEES 61	252 → 61	45	8	60	5	50
NAC-CEES 89	252 → 89	45	8	10	5	50
NAC-CEES 116	252 → 116	45	15	50	5	50
<i>NAC-CEES* ID 61</i>	<i>256 → 61</i>	45	8	60	5	50
<i>NAC-CEES* ID 89</i>	<i>256 → 89</i>	45	8	10	5	50
<i>NAC-CEES* ID 119</i>	<i>256 → 119</i>	45	15	50	5	50

Table S2: ¹H-NMR characterization of the GSH, NAC and Cys conjugates to CEES. Mobile protons were first replaced by deuterium by freeze-drying in D₂O. Samples were then solubilized in 99.95 % D₂O and the spectra recorded at 400 MHz. Identification of the signals was based on the analysis of the coupling constants (*J*) and the predicted spectra generated by the ChemDraw software. Additional information were obtained for GSH-CEES by comparison with published data for the corresponding sulfur mustard conjugate [46].

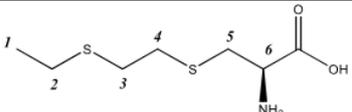
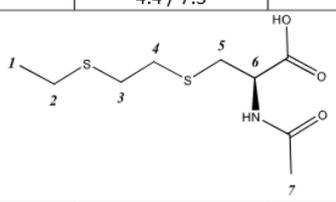
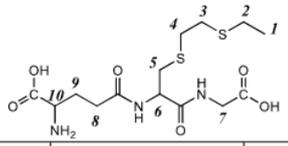
Cys-CEES				
Chemical shift (ppm)	Integration	Multiplicity	<i>J</i> (Hz)	Proton
1.17	3H	t	7.4	1
2.56	2H	q	7.4	2
2.79	4H	t	3.1	3 & 4
3.05	2H	m	/	5
3.87	1H	dd	4.4 / 7.3	6
NAC-CEES				
Chemical shift (ppm)	Integration	Multiplicity	<i>J</i> (Hz)	Proton
1.17	3H	t	7.4	1
2.00	3H	s	/	7
2.55	2H	q	7.2	2
2.76	4H	m	/	3 & 4
3.02 & 2.87	2H	m	/	5
4.36	1H	dd	4.6 / 8	6
GSH-CEES				
Chemical shift (ppm)	Integration	Multiplicity	<i>J</i> (Hz)	Proton
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

Table S3: Statistical validation of the method. Calculated concentration, accuracy and precision are reported for calibrators at the lowest and highest concentration. Conc.: concentration, Calc. Conc.: Calculated concentration.

	Sample	Conc. (μM)	Intra-day (n=6)			Inter-day (n=18)		
			Calc. Conc. (μM)	Accuracy (%)	RSD (%)	Calc. Conc. (μM)	Accuracy (%)	RSD (%)
GSH-CEES	Calibrator 1	0.1	0.11	111	9.6	0.10	101	13.9
	Calibrator 6	50	49.3	99	4.0	49.6	99	3.9
Cys-CEES	Calibrator 1	0.1	0.11	113	5.5	0.11	105	7.5
	Calibrator 6	50	49.2	98	4.7	49.8	100	4.6
NAC-CEES	Calibrator 1	0.1	0.11	114	8.2	0.10	104	11.8
	Calibrator 6	50	49.5	99	5.8	49.8	100	5.5
Gua-CEES	Calibrator 1	0.1	0.10	98	9.8	0.09	87.3	17.5
	Calibrator 3	0.5	0.51	101	7.6	0.50	99	7.1

Table S4: Intra-day validation of the quantification of the biomarkers in mouse plasma. Aliquot fractions of samples from mice exposed to CEES (day 1) were mixed to obtain an overall volume of 500 μL . The resulting solution was spiked with GSH-CEES the concentration of which is very low in plasma. The final concentration of the analytes was approximately 50 nM. Four aliquot fractions of the mixture were then purified by SPE and analyzed by UHPLC-MS/MS as described in the manuscript.

analyte	GSH-CEES	Cys-CEES	NAC-CEES	Gua-CEES
RSD (%)	5.7	9.2	12.4	9.0

Figure S1: Protocol of CEES exposure on hairless SKH-1 mice using vapor caps method. Caps containing CEES were maintained 30 minutes on back skin. For quantification of biomarkers, mice were sacrificed 1 day after CEES vapor exposure. Macroscopic investigation of the burn was followed up to 7 days. The wounds reached their maximal intensity at day 3 (D3).

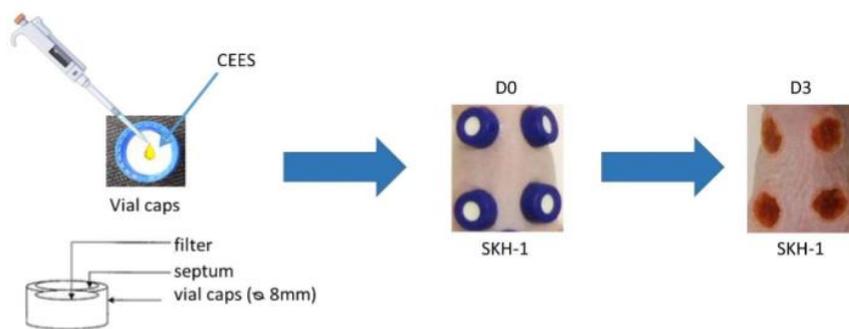


Figure S2: Fragmentation mass spectra of the targeted analytes and identification of the main fragments used for the UHPLC-MS/MS quantification.

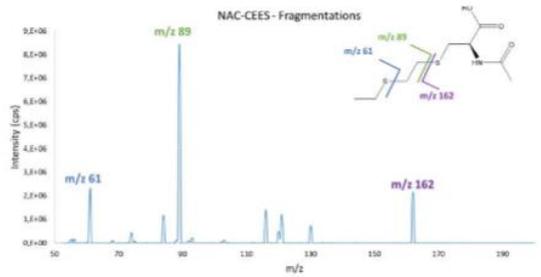
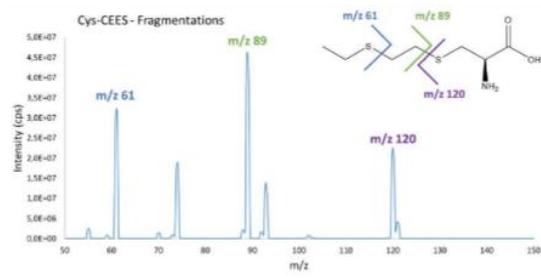
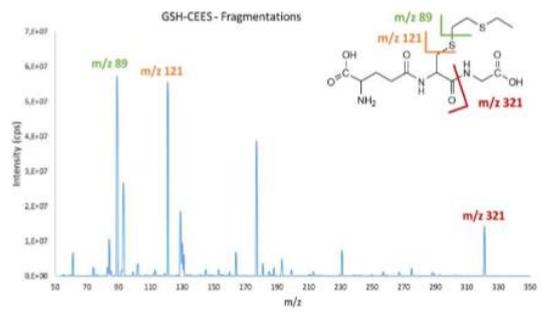
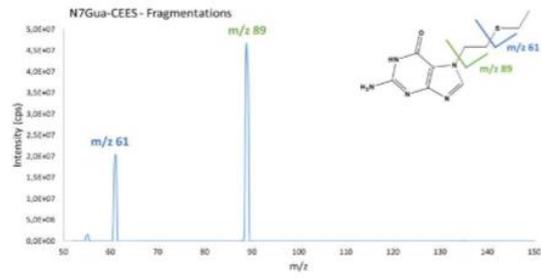


Figure S3: UHPLC chromatograms recorded in the product ion scan mode corresponding to the detection of Cys-CEES (210 m/z), Cys-CEES sulfoxide (226 m/z), Cys-CEES sulfone (242 m/z) in culture medium from skin exposed to 0.40 μmol of CEES during 0h, 1h, 6h or 24h. No peak at M+16 or M+32 with respect to Cys-CEES is observed.

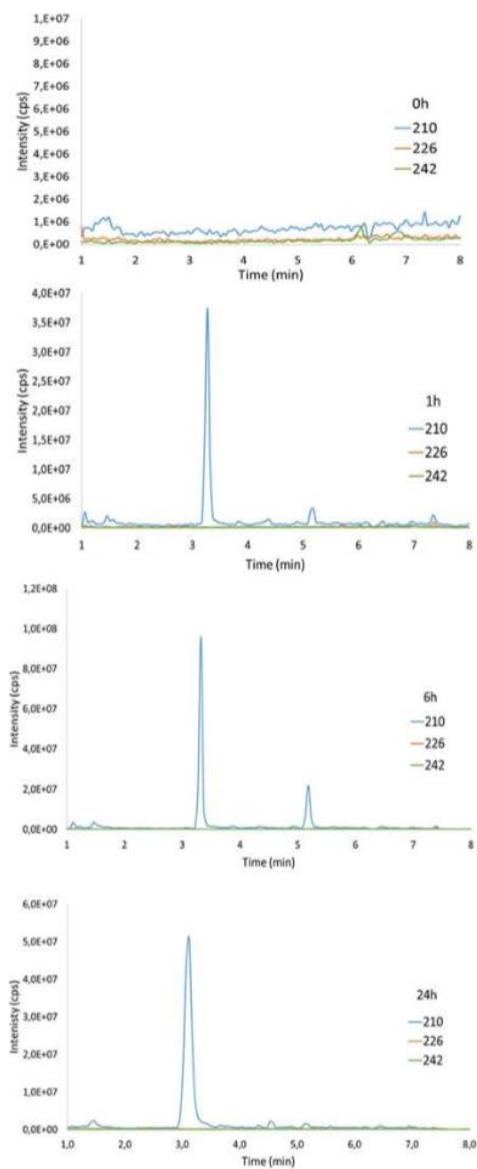
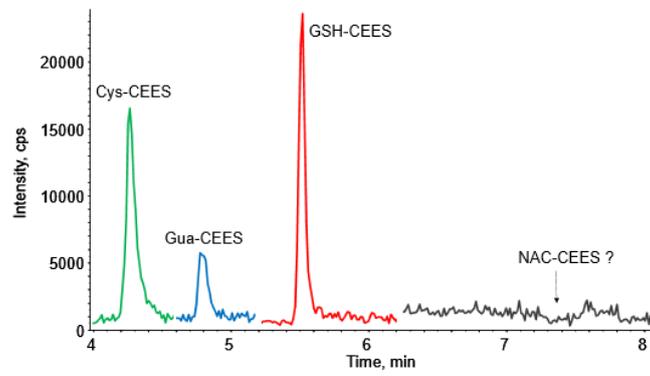


Figure S4: UHPLC-MS/MS MRM chromatogram of the analysis of N7Gua-CEES, Cys-CEES, GSH-CEES and NAC-CEES biomarkers determined in culture medium from HaCaT exposed to 1mM of CEES during 30min.



Annexe XI : Valorisation et formations

Publications internationales

- Gros-Désormeaux E, Béracochéa D, Dorandeu F, Piérard C. Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice. *Toxicol Lett*, 2018 Sep 1; 293:73-76.
- Gros-Désormeaux E, Caffin F, Baccus B, Piérard C. Therapeutic perspectives for the prevention and treatment of skin lesions and sequelae induced by sulfur mustard, *International Review of the Armed Forces Medical Services*, mars 2022, 95/1, p38-51
- Gros-Désormeaux E, Caffin F, Igert A, Guatto N, Piérard C. Is CEES a good analog of sulfur mustard? Macroscopic aspect, histology, and molecular biology comparisons between sulfur mustard and CEES-induced skin lesions », *Tox Lett*, Volume 361, 15 May 2022, Pages 21-28.
- Roser M, Béal D, Eldin C, Gudimard L, Caffin F, Gros-Désormeaux F, Léonço D, Fenaille F, Junot C, Piérard C, Douki T. Glutathione conjugates of the mercapturic acid pathway and guanine adduct as biomarkers of exposure to CEES, a sulfur mustard analog. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413: 1337-51
- 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 analog, and its deleterious effects in brain, *Toxicology* 462, 2021, 152950

Publication nationale :

- Gros-Désormeaux F. Diversité et propriétés des principales armes chimiques utilisées lors de la 1^{ère} guerre mondiale. *Médecine et Armées*, 2017, 45, 1, 041-046,

Communications orales :

- Gros-Désormeaux Fanny, Centenaire des « Premières attaques chimiques 1915-1918 de la surprise à la riposte », colloque du 23 septembre 2015, Val de Grâce, Paris.
- Gros-Désormeaux Fanny, Jaffré Nina, Piérard Christophe, A relevant model of sulfur mustard skin burns: the saturated-vapor caps of CEES, mai 2018, Congrès Bioscience Baltimore.
- Gros-Désormeaux Fanny : Journée des doctorants IRBA janvier 2020
- Gros-Désormeaux Fanny : Journée des doctorants IRBA janvier 2021
- Gros-Désormeaux Fanny : Journée des doctorants IRBA janvier 2022

Communications affichées :

- Gros-Désormeaux Fanny, Jaffré Nina, Piérard Christophe. A relevant model of sulfur mustard skin burns: the saturated-vapor caps of CEES, mai 2018, Congrès Bioscience Baltimore.
- Gros-Désormeaux Fanny, Caffin Fanny, Béracochéa Daniel, Piérard Christophe. Cognitive and emotional impairments induced by CEES after cutaneous intoxication in mice, 17th Medical Chemical defense Conference, mars 2019, Munich.
- Gros-Désormeaux Fanny, Caffin Fanny, Knoertzer Julie, Piérard Christophe. Improvement of a model of SM skin burns: the CEES gel vapor cap method, mai 2019, congrès CBRNe Nantes.
- Gros-Désormeaux Fanny, Caffin Fanny, Béracoché a Daniel, Piérard Christophe. Cognitive and emotional impairments induced by CEES after cutaneous intoxication in mice, mai 2019, congrès CBRNe Nantes.
- Leonço Daniel, Gros-Désormeaux Fanny, Caffin Fanny, Modeste Fabrice, Piérard Christophe, Roser Marie, Douki Thierry, Fenaille François, Junot Christophe. Development of a global untargeted metabolomics approach for identifying

biomarkers of exposure to sulfur mustard in rabbit tears, mai 2019, congrès CBRNe Nantes.

- Gros-Désormeaux Fanny, Caffin Fanny, Igert Alexandre, Piérard Christophe. Sulfur Mustard exposure: skin and eye animal models for countermeasure and biomarker researches. Sept 2021, congrès Eurotox Copenhague, Tox Lett, Volume 350, Supplement, p83
- Gros-Désormeaux Fanny, Caffin Fanny, Igert Alexandre, Guatto Nathalie, Piérard Christophe. Is CEES a good analog of Sulfur Mustard? Comparison of SM and CEES-induced skin lesions regarding macroscopic aspects, histology and molecular biology, mai 2022, congrès CBRNe Lille.
- Caffin Fanny, Gros-Désormeaux Fanny, Kang Clara-Lou, Dumas-Croset Clémence, Igert Alexandre, Navarre Eléana, Piérard Christophe. Sulfur Mustard induced ocular injuries: Pathophysiology study in rabbit model, mai 2022, congrès CBRNe Lille.

Formations :

- 2017 : Formation chirurgie expérimentale ; CNRS, Marseille
- 2017-2018 : DU NRBCe module chimique ; Sorbonne Université et Ecole du Val de Grâce, Paris
- 2018 : Conduite de projet ; CFMD Paris
- 2019 : Formation au logiciel ImageJ/Fiji ; IRBA, Brétigny-Sur-Orge
- 2019 : Formation « plaie et cicatrisation : prise en charge paramédicale » ; Hôpital d'Instruction des Armées Bégin, Paris

Bibliographie

1. Cavallo J-D, Fuilla C, Dorandeu F, Laroche P, Vidal D. Les risques Nrbc-e, savoir pour agir. 2e édition 2010
2. Wattana M, Bey T. Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital and Disaster Medicine*. 2009;24(1):19-29.
3. Mérat S, Perez JP, Rüttimann M, Bordier E, Lienhard A, Lenoir B, et al. Intoxication aiguë par arme chimique vésicante : l'ypérite. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 2003;22(2):108-18.
4. Szinicz L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*. 2005;214(3):167-81.
5. Duchovic RJ, Vilensky JA. Mustard gas: its pre-World War I history. *Journal of chemical education*. 2007;84(6):944.
6. 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(5):384-403.
7. Steinritz D, Thiermann H. Sulfur Mustard. In: Toxicology. BJeaeCC, editor. *Critical Care Toxicology*: Springer, Cham; 2017. p. 2683-712.
8. Mahmood Sadeghi, Balali-Mood B. Chemistry of mustard compounds. In: Balali-Mood M AM, editor. *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*: Springer International Publishing Switzerland; 2015. p. 1-27.
9. Young RA, Bast CB. Mustards and Vesicants. In: Gupta RC, editor. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Second edition 2015. p. 69-86.
10. Marc-Michael B. Investigation of Polysulfide Mustard Analogues and Reactive Intermediates from Levinstein Mustard by Density Functional Theory (DFT): OPCW; 2015 [Available from: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/Science_Technology/poster_MustardDFT.pdf].
11. Padley AP. Gas: the greatest terror of the Great War. *Anaesthesia and intensive care*. 2016;44(1_suppl):24-30.
12. Etemad L, Moshiri M, Balali-Mood M. History of use and epidemiology of mustard compounds. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds*: Springer; 2015. p. 29-47.
13. Lukey BJ, Romano Jr JA, Romano JA, Salem H, Lukey BJ. *Chemical warfare agents: chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics*: CRC press; 2007.
14. Feister AJ. *Medical defense against mustard gas: toxic mechanisms and pharmacological implications*. 1991.
15. Lejaille A. La guerre des gaz: <http://www.guerredesgaz.fr/lesgaz/vesicants/vesicants.htm>; [updated 18/01/15].
16. Ashmore MH, Nathanail CP. A critical evaluation of the implications for risk based land management of the environmental chemistry of Sulphur Mustard. *Environment International*. 2008;34(8):1192-203.
17. Sandí G, Brubaker KL, Schneider JF, O'Neill HJ, Cannon PL. A coulometric iodimetric procedure for measuring the purity of lewisite. *Talanta*. 2001;54(5):913-25.
18. Vilensky JA, Redman K. British anti-Lewisite (dimercaprol): an amazing history. *Ann Emerg Med*. 2003;41(3):378-83.
19. ANSM. Fiche Piratox n° 3: « Lewisite » https://archiveansm.integra.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6100db55b27c61e5e06db1ef0a46b367.pdf 2010.
20. Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg*. 1963;105:574-8.

21. Joensuu H. Systemic chemotherapy for cancer: from weapon to treatment. *The lancet oncology*. 2008;9(3):304.
22. Smith SL. War! What is it good for? Mustard gas medicine. *CMAJ*. 2017;189(8):E321-E2.
23. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. *StatPearls* [Internet]. 2021.
24. Vucinic S, Djurovic B, Antonijevic B. Occupational and Environmental Mustard Exposure, Prevention and Chemical Weapons Convention. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds*: Springer; 2015. p. 359-87.
25. Sawyer TW, McNeely K, Louis K, Lecavalier P, Song Y, Villanueva M, et al. Comparative toxicity of mono- and bifunctional alkylating homologues of sulphur mustard in human skin keratinocytes. *Toxicology*. 2017;382:36-46.
26. Balali-Mood M, Mathews R, R P, Rice P, Romano J, Thiermann H, et al. Practical Guide for Medical Management of Chemical Warfare Casualties. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons International Cooperation and Assistance Division Assistance and Protection Branch. 2019.
27. Pitschmann V. Overall view of chemical and biochemical weapons. *Toxins (Basel)*. 2014;6(6):1761-84.
28. F H. Projet d'une Déclaration internationale concernant les lois et coutumes de la guerre. *Actes de la Conférence de Bruxelles*. 1874:297.
29. OPCW. Les origines de la Convention sur l'interdiction des armes chimiques et de l'OIAC [Available from: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/Fact_Sheets/French/Fact_Sheet_1_-_History.pdf]
30. Grip L, Hart J. The use of chemical weapons in the 1935–36 Italo-Ethiopian War. *SIPRI Arms Control and Non-proliferation Programme*. 2009:8.
31. Borak J, Sidell FR. Agents of chemical warfare: sulfur mustard. *Annals of emergency medicine*. 1992;21(3):303-8.
32. Black R. Development, historical use and properties of chemical warfare agents. 2016.
33. Sezigen S, Kenar L. Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. *Toxicology Letters*. 2020;320:52-7.
34. Secretary-General UN. Report of the mission dispatched by the Secretary-General to investigate allegations of the use of chemical weapons in the conflict between the Islamic Republic of Iran and Iraq : note / by the Secretary-General.; 1988.
35. Weapons OftPoC. Convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques et sur leur destruction [updated 7 June 2020. Available from: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_fr.pdf].
36. Hart J, editor Looking back: The Continuing Legacy of Old and Abandoned Chemical Weapons. The 2008 Chemical Weapons Convention Review Conference; 2008.
37. OPCW. Evolution of the Status of Participation in the Convention <https://www.opcw.org/evolution-status-participation-convention2018> [
38. (IRSN) IdRedSN. Produits visés par la CIAC 2011 [updated 2019. Available from: <https://non-prolifération.irsln.fr/Chimie/Guide-exploitant/Pages/ProduitsvisésparlaCIAC.aspx>].
39. Sezigen S, Ivelik K, Ortatatli M, Almacioglu M, Demirkasimoglu M, Eyison RK, et al. Victims of chemical terrorism, a family of four who were exposed to sulfur mustard. *Toxicol Lett*. 2019;303:9-15.
40. J. L. Rapport d'information fait au nom de la commission des Lois constitutionnelles, de législation, du suffrage universel, du Règlement et d'administration générale sur le déminage. *senat.fr*2001.
41. Une famille hospitalisée après une fuite d'obus, au sud d'Arras [press release]. 13 sept 2021 update 14 sept 2021 09h09 2021.
42. Sawyer TW, McNeely K, Louis K, Lecavalier P, Song Y, Villanueva M, et al. Comparative toxicity of mono-and bifunctional alkylating homologues of sulphur mustard in human skin keratinocytes. *Toxicology*. 2017;382:36-46.

43. Ghorani-Azam A, Balali-Mood M. Clinical pharmacology and toxicology of mustard compounds. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds*: Springer; 2015. p. 63-99.
44. ANSM. Fiche Piratox 6 - Yperite et autres moutardes vésicantes. https://archiveansm.integra.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6d62ed6e00a5a870546dc5ebf802fba6.pdf2010 Mise à jour en 2016.
45. Maleki M, Layegh P. Dermatologic Aspects of Sulfur Mustard Exposure. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds*: Springer; 2015. p. 213-52.
46. McNutt P, Hamilton T, Nelson M, Adkins A, Swartz A, Lawrence R, et al. Pathogenesis of Acute and Delayed Corneal Lesions After Ocular Exposure to Sulfur Mustard Vapor. *Cornea*. 2012;31(3):280-90.
47. Solberg Y, Alcalay M, Belkin M. Ocular injury by mustard gas. *Survey of Ophthalmology*. 1997;41(6):461-6.
48. Gordon MK, Enzenauer RW, Babin MC. CHAPTER 39 - Ocular Toxicity of Sulfur Mustard. In: Gupta RC, editor. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. San Diego: Academic Press; 2009. p. 575-94.
49. White CW, Rancourt RC, Veress LA. Sulfur mustard inhalation: mechanisms of injury, alteration of coagulation, and fibrinolytic therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1378(1):87-95.
50. Ghorani-Azam A, Balali-Mood M. Clinical Pharmacology and Toxicology of Mustard Compounds. *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*: Springer International Publishing; 2015. p. 63-99.
51. Mostafalou S, Abdollah M. Basic Pharmacology and Toxicology. In: Balali-Mood M, Abdollahi M, editors. *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*: Springer, Cham; 2015. p. 49-61.
52. Ghanei M, Poursaleh Z, Harandi AA, Emadi SE, Emadi SN. Acute and chronic effects of sulfur mustard on the skin: a comprehensive review. *Cutan Ocul Toxicol*. 2010;29(4):269-77.
53. Kehe K, Balszuweit F, Emmler J, Kreppel H, Jochum M, Thiermann H. Sulfur mustard research-strategies for the development of improved medical therapy. *Eplasty*. 2008;8:e32.
54. Rose D, Schmidt A, Brandenburger M, Sturmheit T, Zille M, Boltze J. Sulfur mustard skin lesions: A systematic review on pathomechanisms, treatment options and future research directions. *Toxicol Lett*. 2018;293:82-90.
55. Hattersley IJ, Jenner J, Dalton C, Chilcott RP, Graham JS. The skin reservoir of sulphur mustard. *Toxicology in Vitro*. 2008;22(6):1539-46.
56. Smith KJ, Hurst CG, Moeller RB, Skelton HG, Sidell FR. Sulfur mustard: its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding its mechanism of action, its long-term health effects, and new developments for protection and therapy. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(5 Pt 1):765-76.
57. Tianyi G. Mechanism and treatment of sulfur mustard-induced cutaneous injury. *Chinese Journal of Traumatology*. 2014;17(6):6.
58. 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. *Toxicology Letters*. 2015;233(1):1-7.
59. Poursaleh Z, Ghanei M, Babamahmoodi F, Izadi M, Harandi AA, Emadi SE, et al. Pathogenesis and treatment of skin lesions caused by sulfur mustard. *Cutan Ocul Toxicol*. 2012;31(3):241-9.
60. Rebholz B, Kehe K, Ruzicka T, Rupec RA. Role of NF-kappaB/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard. *J Invest Dermatol*. 2008;128(7):1626-32.
61. vučinić S, Djurovic B, Antonijevic B. Occupational and Environmental Mustard Exposure, Prevention and Chemical Weapons Convention. In: Balali-Mood M, editor. *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*2015. p. 359-87.
62. Piratox/Piratome Gdt. Fiche Piratox n°6 : Ypérite et autres moutardes vésicantes www.ansm.sante.fr 2010 [updated 17 mai 2016 Available from:

https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6d62ed6e00a5a870546dc5ebf802fba6.pdf.

63. Steinritz D, Thiermann H. Verification of SM Exposure in Biological Samples. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds*: Springer; 2015. p. 349-58.
64. 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. *Toxicology Reports*. 2014;1:533-43.
65. Piérard C, Taudon N, Fenaille F, Douki T. Les biomarqueurs de l'intoxication par l'ypérite. *L'Actualité Chimique*. 2019;440:19-22.
66. Gilardoni M, Léonço D, Caffin F, Gros-Désormeaux F, Eldin C, Béal D, et al. Evidence for the systemic diffusion of (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide, a sulfur mustard analog, and its deleterious effects in brain. *Toxicology*. 2021;462:152950.
67. 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. *Journal of Chromatography B*. 2013;917-918:100-7.
68. 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(3):644-50.
69. Smith JR, Capacio BR, Korte WD, Woolfitt AR, Barr JR. Analysis for plasma protein biomarkers following an accidental human exposure to sulfur mustard. *Journal of analytical toxicology*. 2008;32(1):17-24.
70. van der Schans GP, Noort D, Mars-Groenendijk RH, Fidder A, Chau LF, de Jong LPA, et al. Immunochemical Detection of Sulfur Mustard Adducts with Keratins in the Stratum Corneum of Human Skin. *Chemical Research in Toxicology*. 2002;15(1):21-5.
71. Taysse L, Dorandeu F, Daulon S, Foquin A, Perrier N, Lallement G, et al. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse (II): Effects of some currently used skin decontaminants (RSDL and Fuller's earth) against liquid sulphur mustard and VX exposure. *Human & Experimental Toxicology*. 2011;30(6):491-8.
72. Taysse L, Daulon S, Delamanche S, Bellier B, Breton P. Skin decontamination of mustards and organophosphates: comparative efficiency of RSDL and Fuller's earth in domestic swine. *Human & Experimental Toxicology*. 2007;26(2):135-41.
73. Feschuk AM, Law RM, Maibach HI. Comparative efficacy of Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL): A systematic review. *Toxicology Letters*. 2021;349:109-14.
74. Explosif NBRC. NRBCe : décontamination immédiate. Le point sur RSDL (Reactif Skin Decontamination Lotion) 2015 [Available from: <http://nrbc.blogspot.com/2015/03/nrbce-decontamination-immEDIATE-le.html>].
75. Renaud P. NRBCe : décontamination immédiate. Le point sur RSDL (Reactif Skin Decontamination Lotion): OUVRY; 2015 [updated 08 Fév 2015. Available from: <https://www.ouvry.com/nrbce-decontamination-immEDIATE-le-point-sur-rsdl-reactif-skin-decontamination-lotion/>].
76. Schwartz MD, Hurst CG, Kirk MA, Reedy SJ, Braue EH, Jr. Reactive skin decontamination lotion (RSDL) for the decontamination of chemical warfare agent (CWA) dermal exposure. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(10):1971-9.
77. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg*. 2012;39(1):85-97.
78. Démarchez M. L'épiderme Biologie de la peau2019 [Available from: <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?rubrique32>].
79. Dréno B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2009;136:S247-S51.

80. Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat.* 2009;214(4):516-59.
81. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2002;88(1-2):1-12.
82. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30(1):30-41.
83. Jaitley S, Saraswathi T. Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):239-44.
84. Abraham J, Mathew S. Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts. *Int J Appl Basic Med Res.* 2019;9(1):9-13.
85. Brown TM KK. Histology, Dermis. StatPearls2021 [updated 2021 May 10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>.
86. Robins SP, Milne G, Duncan A, Davies C, Butt R, Greiling D, et al. Increased skin collagen extractability and proportions of collagen type III are not normalized after 6 months healing of human excisional wounds. *The Journal of investigative dermatology.* 2003;121(2):267-72.
87. Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of dermatological science.* 2018;90(1):3-12.
88. Gonzalez ACDO, Costa TF, Andrade ZDA, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2016;91(5):614-20.
89. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-28.
90. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford).* 2008;26(2):31-7.
91. Gabbiani G, Le Lous M, Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1976;21(2):133-45.
92. Izadi K, Ganchi P. Chronic wounds. *Clinics in plastic surgery.* 2005;32(2):209-22.
93. Lagache L, Vernet S, Herlin C, Téot L. Les difficultés de l'évaluation de la brûlure. *Revue Francophone de Cicatrisation.* 2019;3(2):15-8.
94. Abazari M, Ghaffari A, Rashidzadeh H, Badeleh SM, Maleki Y. A Systematic Review on Classification, Identification, and Healing Process of Burn Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2020:1534734620924857.
95. Adair FE, Bagg HJ. Experimental and Clinical Studies on the Treatment of Cancer by Dichlorethylsulphide (Mustard Gas. *Ann Surg.* 1931;93(1):190-9.
96. Bennion SD, David-Bajar K. Cutaneous reactions to nuclear, biological, and chemical warfare. In: JAMES WD, editor. *Military Dermatology*1994. p. 97.
97. Balali-Mood M, Mousavi SH, Balali-Mood B. Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans. *Emerging Health Threats Journal.* 2008;1(1):7068.
98. Balali-Mood M, Hefazi M, Mahmoudi M, Jalali I, Attaran D, Maleki M, et al. Evaluation of delayed toxic effects of sulfur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans: a cross-sectional study. *J Med CBR Def.* 2005;3:0301.
99. Emadi SN, Mortazavi M, Mortazavi H. Late cutaneous manifestations 14 to 20 years after wartime exposure to sulfur mustard gas: a long-term investigation. *Archives of dermatology.* 2008;144(8):1059-61.
100. Richard G. Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol.* 2000;9(2):77-96.
101. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006;394(Pt 3):527-43.
102. Laird DW, Lampe PD. Therapeutic strategies targeting connexins. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2018;17(12):905-21.
103. Meda P. Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *médecine/sciences* 1996 12 (8-9):12.

104. Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol.* 1991;115(5):1357-74.
105. Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *The Journal of investigative dermatology.* 2007;127(11):2516-24.
106. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):228-32.
107. Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. Selective permeability of gap junction channels. *Biochimica et biophysica acta.* 2004;1662(1-2):96-101.
108. Wang HZ, Veenstra RD. Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. *J Gen Physiol.* 1997;109(4):491-507.
109. Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR, Girao H. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication - gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *Journal of cell science.* 2017;130(21):3619-30.
110. Garcia-Vega L, O'Shaughnessy EM, Albuloushi A, Martin PE. Connexins and the Epithelial Tissue Barrier: A Focus on Connexin 26. *Biology.* 2021;10(1):59.
111. Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit Assembly of an Integral Plasma Membrane Channel Protein, Gap Junction Connexin43, Occurs after Exit from the ER. *Cell.* 1993;74:1065-77.
112. Musil LS. Regulation of Connexin Degradation As a Mechanism to Increase Gap Junction Assembly and Function. *Journal of Biological Chemistry.* 2000.
113. Bell CL, Shakespeare TI, Smith AR, Murray SA. Visualization of Annular Gap Junction Vesicle Processing: The Interplay Between Annular Gap Junctions and Mitochondria. *International journal of molecular sciences.* 2018;20(1).
114. Dunn CA, Lampe PD. Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 2):455-64.
115. Solan JL, Lampe PD. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett.* 2014;588(8):1423-9.
116. Coutinho P, Qiu C, Frank S, Tamber K, Becker D. Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol Int.* 2003;27(7):525-41.
117. Montgomery J, Ghatnekar G, Grek C, Moyer K, Gourdie R. Connexin 43-Based Therapeutics for Dermal Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(6):1778.
118. Goliger JA, Paul DL. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular biology of the cell.* 1995;6(11):1491-501.
119. Mendoza-Naranjo A, Cormie P, Serrano AE, Hu R, O'Neill S, Wang CM, et al. Targeting Cx43 and N-cadherin, which are abnormally upregulated in venous leg ulcers, influences migration, adhesion and activation of Rho GTPases. *PLoS one.* 2012;7(5):e37374.
120. Brandner J, Houdek P, Hüsing B, Kaiser C, Moll I. Connexins 26, 30, and 43 Differences Among Spontaneous, chronic and accelerates human wound healing. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):13.
121. Wong P, Tan T, Chan C, Laxton V, Chan YW, Liu T, et al. The Role of Connexins in Wound Healing and Repair: Novel Therapeutic Approaches. *Front Physiol.* 2016;7:596.
122. Sutcliffe JE, Chin KY, Thrasivoulou C, Serena TE, O'Neil S, Hu R, et al. Abnormal connexin expression in human chronic wounds. *Br J Dermatol.* 2015;173(5):1205-15.
123. Ghatnekar GS, O'Quinn MP, Jourdan LJ, Gurjarpadhye AA, Draughn RL, Gourdie RG. Connexin43 carboxyl-terminal peptides reduce scar progenitor and promote regenerative healing following skin wounding. *Regen Med.* 2009;4(2):205-23.
124. Qiu C, Coutinho P, Frank S, Franke S, Law L-y, Martin P, et al. Targeting Connexin43 Expression Accelerates the Rate of Wound Repair. *Current Biology.* 2003;13(19):1697-703.
125. Coutinho P, Qiu C, Frank S, Wang CM, Brown T, Green CR, et al. Limiting burn extension by transient inhibition of Connexin43 expression at the site of injury. *Br J Plast Surg.* 2005;58(5):658-67.

126. Grek CL, Montgomery J, Sharma M, Ravi A, Rajkumar JS, Moyer KE, et al. A Multicenter Randomized Controlled Trial Evaluating a Cx43-Mimetic Peptide in Cutaneous Scarring. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(3):620-30.
127. Grek CL, Prasad GM, Viswanathan V, Armstrong DG, Gourdie RG, Ghatnekar GS. Topical administration of a connexin43-based peptide augments healing of chronic neuropathic diabetic foot ulcers: A multicenter, randomized trial. *Wound Repair Regen*. 2015;23(2):203-12.
128. Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O'Quinn M, Yost MJ, Gourdie RG. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends Biotechnol*. 2008;26(4):173-80.
129. 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(3):532-40.
130. Batal M, Rebelo-Moreira S, Hamon N, Bayle PA, Mouret S, Clery-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):1-7.
131. Wang X, Michaelis E. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2010;2(12).
132. Jafari M. Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology*. 2007;231(1):30-9.
133. Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2008;22(8):1156-9.
134. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience Research*. 2010;68(4):261-75.
135. Namazi S, Niknahad H, Razmkhah H. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in intoxicated Iranian veterans. *J Med Toxicol*. 2009;5(4):191-5.
136. Darchini-Maragheh E, Nemati-Karimooy H, Hasanabadi H, Balali-Mood M. Delayed Neurological Complications of Sulphur Mustard and Tabun Poisoning in 43 Iranian Veterans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012;111(6):426-32.
137. Razavi SM, Negahban Z, Pirhosseinloo M, Razavi MS, Hadjati G, Salamati P. Sulfur Mustard Effects on Mental Health and Quality-of-Life: A Review. *Iran J Psychiatry Behav Sci*. 2014;8(3):11-21.
138. Hashemian F, Khoshnood K, Desai MM, Falahati F, Kasl S, Southwick S. Anxiety, depression, and posttraumatic stress in Iranian survivors of chemical warfare. *Jama*. 2006;296(5):560-6.
139. Isono O, Kituda A, Fujii M, Yoshinaka T, Nakagawa G, Suzuki Y. 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. *Toxicology Letters*. 2018;293:9-15.
140. Craske MG, Rauch SL, Ursano R, Prenoveau J, Pine DS, Zinbarg RE. What Is an Anxiety Disorder? *FOCUS*. 2011;9(3):369-88.
141. Liebowitz M.R., Barlow D.H., Ballenger J.C., Davidson J., Foa E., Fyer A. *DSM-IV-TR Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux*. Masson, editor. American Psychiatric association 2005.
142. Peretti C-S, Ferreri F. *Anxiété et troubles cognitifs. Anxiété, anxiolytiques et troubles cognitifs* Paris: Elsevier SAS. 2004.
143. C.L. C, F. S. *Mise au point sur l'anxiété*
- Le trouble anxieux généralisé : approche nosographique,
cognitive, épidémiologique et économique. *Act Méd Int - Psychiatrie*. 2000;17(6).
144. Fink G. Chapter 1 - Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety. In: Fink G, editor. *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 3-11.

145. Steimer T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*. 2002;4(3):231-49.
146. Bordbar MRF, Faridhosseini F, Saghebi A. Psychiatric Complications of Sulfur Mustard (SM) Poisoning. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds*: Springer; 2015. p. 291-315.
147. Levy F, Petit A, Peretti C-S, Karila L. Troubles anxieux (hors TCC). *La revue du praticien MG janv*. 2013;893.
148. Baxter MG, Murray EA. The amygdala and reward. *Nature reviews neuroscience*. 2002;3(7):563-73.
149. Staub F, Bruggimann L, Magistretti P, Bogousslavsky J. Anatomie des émotions. *Archives suisses de neurologie et de psychiatrie*. 2002;153(8):344-53.
150. Kolb B, Whishaw IQ, Teskey GC. *Cerveau et comportement: De Boeck Supérieur*; 2019.
151. Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*. 2015;517(7534):284-92.
152. Murray EA. The amygdala, reward and emotion. *Trends in Cognitive Sciences*. 2007;11(11):489-97.
153. LeDoux J. The amygdala. *Current biology*. 2007;17(20):R868-R74.
154. LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*. 2003;23(4):727-38.
155. Lotstra F. Le cerveau émotionnel ou la neuroanatomie des émotions. *Cahiers critiques de thérapie familiale et de pratiques de réseaux*. 2002(2):73-86.
156. Torrico TJ, Munakomi S. Neuroanatomy, thalamus. StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan- Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542184/>. 2019.
157. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia AS, White L, et al. *Neurosciences: De Boeck Supérieur*; 2019.
158. Devau G. Introduction à une approche biologique de la peur. *Gerontologie et société*. 2016;38(2):17-29.
159. Bannerman D, Rawlins J, McHugh S, Deacon R, Yee B, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & biobehavioral reviews*. 2004;28(3):273-83.
160. Dorey R. Involvement of corticosteroids and their hippocampal receptors in fast and delayed effects of stress on memory retrieval
- Implication des corticoïdes et de leurs récepteurs hippocampiques dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel mnésique: Université Sciences et Technologies - Bordeaux I; 2013.
161. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*. 1971.
162. Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences*. 1979;2(3):313-22.
163. Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(6):417-28.
164. Devau G. Introduction à une approche biologique de la peur. *Gérontologie et société*. 2016;vol. 38 / 150(2):17-29.
165. Fanselow MS, Dong H-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*. 2010;65(1):7-19.
166. Pierard C, Dorey R, Henkous N, Mons N, Béracochéa D. Different implications of the dorsal and ventral hippocampus on contextual memory retrieval after stress. *Hippocampus*. 2017;27(9):999-1015.
167. Piérard C, Dorey R, Corio M, Béracochéa D. Lesion of the dorsal hippocampus alters the time-course evolution of corticosterone rise in the ventral hippocampus after stress. *NeuroReport*. 2019;30(10):707-12.

168. Dorey R, Piérard C, Chauveau F, David V, Béracochéa D. Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(13):2870-80.
169. Segal M, Richter-Levin G, Maggio N. Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: A hypothesis. *Wiley Online Library*; 2010. p. 1332-8.
170. Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, Lopez J, Cosquer B, Geiger K, et al. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Structure and Function*. 2012;217(1):93-106.
171. Fuster JM. The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron*. 2001;30(2):319-33.
172. Galinowski A, L o H. Biologie du stress. *Annales M edico-psychologiques, revue psychiatrique*. 2003;161(10):797-803.
173. Ninan PT. The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. *Journal of Clinical Psychiatry*. 1999;60:12-7.
174. Vedder A, Smigielski L, Gutyrchik E, Bao Y, Blautzik J, P oppel E, et al. Neurofunctional Correlates of Environmental Cognition: An fMRI Study with Images from Episodic Memory. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0122470.
175. Roozendaal B. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2003;27(8):1213-23.
176. Tronche C, Piérard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Béracochéa D. Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2010;93(3):343-51.
177. Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, et al. Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus*. 2010;20(1):196-207.
178. Bourin M. Bases anatomiques et neurobiologiques de l'anxiété. *PSN*. 2013;11(3):39-52.
179. Behl C. Effects of glucocorticoids on oxidative stress-induced hippocampal cell death: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*. 1998;33(7):689-96.
180. Landfield PW, Blalock EM, Chen K-C, Porter NM. A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: implications for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 2007;4(2):205-12.
181. Moisan M-P, Le Moal M. Le stress dans tous ses  tats. *médecine/sciences*. 2012;28(6-7):612-7.
182. Squire LR. Declarative and Nondeclarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning and Memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 1992;4(3):232-43.
183. Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science*. 1991;253(5026):1380-6.
184. Squire LR, Kandel ER. *La mémoire: de l'esprit aux molécules*: De Boeck Supérieur; 2002.
185. Jaffard R. La mémoire déclarative et le modèle de Squire. *Revue de neuropsychologie*. 2011;3(2):83-93.
186. Tulving E. Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annual Review of Psychology*. 2002;53(1):1-25.
187. Brand M, Markowitsch HJ. Chapter 3.5 The role of the prefrontal cortex in episodic memory. In: Dere E, Easton A, Nadel L, Huston JP, editors. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 18: Elsevier; 2008. p. 317-619.
188. Clayton NS, Dickinson A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*. 1998;395(6699):272-4.
189. Eustache F, Desgranges B. MNESIS: Towards the Integration of Current Multisystem Models of Memory. *Neuropsychology Review*. 2008;18(1):53-69.
190. Baddeley A. Working Memory. *Science*. 1992;255(5044):556-9.

191. Davidson RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biological psychiatry*. 2002;51(1):68-80.
192. Curtis CE, D'Esposito M. Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in Cognitive Sciences*. 2003;7(9):415-23.
193. Funahashi S. Working Memory in the Prefrontal Cortex. *Brain Sciences*. 2017;7(12):49.
194. Monnier C, Roulin J-L. À la recherche du calepin visuo-spatial en mémoire de travail. *L'Année psychologique*. 1994;94(3):425-60.
195. Degiorgio C, VdBD, Watelet A. Comprendre la mémoire de travail. In: *Ambulatoire CdRFN*, editor.: Lundbeck
196. Fournier S, Monjauze C. La mémoire de travail. *La mémoire: Rééducation Orthophonique Rencontres, Données actuelles, Examens et interventions, Perspectives*. 2000:19-43.
197. Baddeley A. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in Cognitive Sciences*. 2000;4(11):417-23.
198. Eysenck MW, Calvo MG. Anxiety and performance: The processing efficiency theory. *Cognition & emotion*. 1992;6(6):409-34.
199. Darke S. Anxiety and working memory capacity. *Cognition and Emotion*. 1988;2(2):145-54.
200. Moran TP. Anxiety and working memory capacity: A meta-analysis and narrative review. *Psychological bulletin*. 2016;142(8):831.
201. Ikin JF, Sim MR, McKenzie DP, Horsley KWA, Wilson EJ, Moore MR, et al. Anxiety, post-traumatic stress disorder and depression in Korean War veterans 50 years after the war. *British Journal of Psychiatry*. 2007;190(6):475-83.
202. Vasterling JJ, Duke LM, Brailey K, Constans JI, Allain Jr AN, Sutker PB. Attention, learning, and memory performances and intellectual resources in Vietnam veterans: PTSD and no disorder comparisons. *Neuropsychology*. 2002;16(1):5.
203. McNally RJ. Cognitive abnormalities in post-traumatic stress disorder. *Trends in cognitive sciences*. 2006;10(6):271-7.
204. Tewari-Singh N, Rana S, Gu M, Pal A, Orlicky DJ, White CW, et al. Inflammatory biomarkers of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced skin injury in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Sci*. 2009;108(1):194-206.
205. Bartelt-Hunt SL, Knappe DR, Barlaz MA. A review of chemical warfare agent simulants for the study of environmental behavior. *Critical reviews in environmental science and technology*. 2008;38(2):112-36.
206. Bartelt-Hunt SL, Knappe DRU, Barlaz MA. A Review of Chemical Warfare Agent Simulants for the Study of Environmental Behavior. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2008;38(2):112-36.
207. Bennett SR. Environmental hazards of chemical agent simulants. *US Army Armament, Munitions, and Chemical Command, Aberdeen Proving Ground, MD. CRDCTR-84055*; 1984.
208. (CDC) CfDCaP. SULFUR MUSTARD : Blister Agent 2011 [updated May 12, 2011. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH):[Available from: https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750008.html].
209. Nawała J, Józwiak P, Popiel S. Thermal and catalytic methods used for destruction of chemical warfare agents. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(7):3899-912.
210. River C. MODÈLES ET SERVICES DE RECHERCHE Catalogue 2018. In: River C, editor. 2018. p. 24.
211. Benavides F, Oberyszyn TM, VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci*. 2009;53(1):10-8.
212. Clery-Barraud C, Nguon N, Vallet V, Sentenac C, Four E, Arlaud C, et al. Sulfur mustard cutaneous injury characterization based on SKH-1 mouse model: relevance of non-invasive methods in terms of wound healing process analyses. *Skin Res Technol*. 2013;19(1):e146-56.

213. Moloney SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Learn DB. The Hairless Mouse Model of Photoaging: Evaluation of the Relationship between Dermal Elastin, Collagen, Skin Thickness and Wrinkles. *Photochemistry and Photobiology*. 1992;56(4):505-11.
214. Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*. 2006;15(7):483-92.
215. De Paepe K, Houben E, Adam R, Wiesemann F, Rogiers V. Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol*. 2005;11(1):61-9.
216. Papp A, Lahtinen T, Harma M, Nuutinen J, Uusaro A, Alhava E. Dielectric measurement in experimental burns: a new tool for burn depth determination? *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(3):889-98; discussion 99-901.
217. Pietersz GA, Li W, Apostolopoulos V. A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway. *Vaccine*. 2001;19(11-12):1397-405.
218. Dominguez G, Belzung C, Pierard C, David V, Henkous N, Decorte L, et al. Alcohol withdrawal induces long-lasting spatial working memory impairments: relationship with changes in corticosterone response in the prefrontal cortex. *Addiction biology*. 2017;22(4):898-910.
219. Gould T, Dao D, Kovacsics C. The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice. *Neuromethods*. 2009;42:1-20.
220. Ibarra A, Feuillere N, Roller M, Lesburgere E, Beracochea D. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine*. 2010;17(6):397-403.
221. Béracochéa D, Cagnard B, Célérier A, le Merrer J, Pérès M, Piérard C. First evidence of a delay-dependent working memory-enhancing effect of modafinil in mice. *Neuroreport*. 2001;12(2):375-8.
222. Piérard C, Liscia P, Valleau M, Drouet I, Chauveau F, Huart B, et al. Modafinil-induced modulation of working memory and plasma corticosterone in chronically-stressed mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2006;83(1):1-8.
223. Béracochéa D, Celerier A, Borde N, Valleau M, Peres M, Pierard C. Improvement of learning processes following chronic systemic administration of modafinil in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002;73(3):723-8.
224. Filliat P, Coubard S, Pierard C, Liscia P, Beracochea D, Four E, et al. Long-term behavioral consequences of soman poisoning in mice. *NeuroToxicology*. 2007;28(3):508-19.
225. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322-8.
226. Chauveau F, Célérier A, Ognard R, Pierard C, Béracochéa D. Effects of ibotenic acid lesions of the mediodorsal thalamus on memory: relationship with emotional processes in mice. *Behavioural Brain Research*. 2005;156(2):215-23.
227. Costa AA, Morato S, Roque AC, Tinós R. A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. *J Neurosci Methods*. 2014;236:44-50.
228. Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-related behaviors in mice. 2009.
229. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in pharmacological sciences*. 1995;16(2):33-6.
230. Engineers M. Elevated Plus Maze. youtube; 2017.
231. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice. 2009:1-20.
232. Khoomsab K, Janseeda T, Saicomton P. Using Circular Open Field Thigmotaxis to Test Fermented Plant Extracts as Rat Repellents. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 2019;19(2):98-103.
233. Vandesquille M, Baudonnat M, Decorte L, Louis C, Lestage P, Béracochéa D. Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiology of Aging*. 2013;34(6):1599-609.

234. Dorandeu F, Taysse L, Boudry I, Foquin A, Herodin F, Mathieu J, et al. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse. (I) Development of a model for screening studies in skin decontamination and protection. *Human & experimental toxicology*. 2011;30(6):470-90.
235. Gros-désormeaux F, Jaffré N, Piérard C. A relevant model of sulfur mustard skin burns: the saturated-vapor caps of CEES - Poster. *Bioscience USMRICD, Baltimore*. 2018.
236. Vallet V, Poyot T, Clery-Barraud C, Coulon D, Sentenac C, Peinnequin A, et al. Acute and long-term transcriptional responses in sulfur mustard-exposed SKH-1 hairless mouse skin. *Cutan Ocul Toxicol*. 2012;31(1):38-47.
237. Gros-désormeaux F, Caffin F, Knoertzer J, Piérard C. Improvement of a model of SM skin burns: the CEES gel vapor cap method - Poster. *CBRN-E Nantes*. 2019.
238. Dalton CH, Maidment MP, Jenner J, Chilcott RP. Closed Cup Vapor Systems in Percutaneous Exposure Studies: What is the Dose? *Journal of Analytical Toxicology*. 2006;30(3):165-70.
239. Jain AK, Tewari-Singh N, Orlicky DJ, White CW, Agarwal R. 2-Chloroethyl ethyl sulfide causes microvesication and inflammation-related histopathological changes in male hairless mouse skin. *Toxicology*. 2011;282(3):129-38.
240. Pal A, Tewari-Singh N, Gu M, Agarwal C, Huang J, Day BJ, et al. Sulfur mustard analog induces oxidative stress and activates signaling cascades in the skin of SKH-1 hairless mice. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(11):1640-51.
241. Sawyer TW. Chapter 19 – A century of sulphur mustard research: a time for recalibration? . NATO - Technical Report RDP; 2020. Report No.: STO-TR-HFM-253.
242. Géraut C, Tripodi D, Dupas D. Brûlures cutanées chimiques Progrès en dermatologie-allergologie: Strasbourg 2003. 2003;9:109.
243. Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C. Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6J mice. *PLOS ONE*. 2018;13(9):e0203559.
244. Ousey K, Cutting K, Rogers AA, Rippon MG. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *Journal of wound care*. 2016;25(3):122-30.
245. Svensjö T, Pomahac B, Yao F, Slama J, Eriksson E. Accelerated Healing of Full-Thickness Skin Wounds in a Wet Environment. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2000;106(3):602-12.
246. Zhang XF, Cui X. Connexin 43: Key roles in the skin. *Biomed Rep*. 2017;6(6):605-11.
247. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naïk A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(3):339-58.
248. Ongstad EL, O'Quinn MP, Ghatnekar GS, Yost MJ, Gourdie RG. A Connexin43 Mimetic Peptide Promotes Regenerative Healing and Improves Mechanical Properties in Skin and Heart. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(2):55-62.
249. François J-C, Trojan J. Thérapies antisens dirigées contre le récepteur de l'IGF-I. *médecine/sciences*. 2001;17(12):1343-8.
250. Smith KJ, Casillas R, Graham J, Skelton HG, Stemler F, Hackley BE. Histopathologic features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *Journal of Dermatological Science*. 1997;14(2):126-35.
251. 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(2):450-9.
252. Wang JD. Actions of the sulfur mustard analogue, nitrogen mustard, on mouse skin and post exposure treatment with Connexin 43 antisense oligodeoxynucleotides: Rutgers The State University of New Jersey-New Brunswick and University of ...; 2014.
253. Tewari-Singh N, Jain AK, Inturi S, White CW, Agarwal R. Clinically-relevant cutaneous lesions by nitrogen mustard: useful biomarkers of vesicants skin injury in SKH-1 hairless and C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2013;8(6):e67557.

254. Kehe K, Schrettl V, Thiermann H, Steinritz D. Modified immunoslotblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. *Chemico-Biological Interactions*. 2013;206(3):523-8.
255. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*. 2010;87(17-18):521-36.
256. Yang Y, Mailman RB. Strategic neuronal encoding in medial prefrontal cortex of spatial working memory in the T-maze. *Behavioural Brain Research*. 2018;343:50-60.
257. McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*. 1995;5(2):205-16.
258. Gros-Désormeaux F, Caffin F, Baccus B, Piérard C. Therapeutic perspectives for the prevention and treatment of skin lesions and sequelae induced by sulfur mustard. *International Review of the the Armed Forces Medical Services*. 2022;95(1):38-51.
259. Eclancher F, Karli P. Effects of early amygdaloid lesions on the development of reactivity in the rat. *Physiology & Behavior*. 1979;22(6):1123-34.
260. Whittaker AL, Howarth GS. Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing? *Applied Animal Behaviour Science*. 2014;151:1-12.
261. Grippo AJ, Beltz TG, Johnson AK. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiology & Behavior*. 2003;78(4):703-10.
262. Vaugeois JM, El Yacoubi M, Costentin J. À propos d'un modèle animal de la dépression. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2004;62(5):332-42.
263. Hashemian F, Khoshnood K, Desai MM, Falahati F, Kasl S, Southwick S. Anxiety, Depression, and Posttraumatic Stress in Iranian Survivors of Chemical Warfare. *JAMA*. 2006;296(5):560.
264. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2012(59):e3769.
265. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 1985;85(3):367-70.
266. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1997;75(10-11):1149-63.
267. Ornell F, Valvassori SS, Steckert AV, Deroza PF, Resende WR, Varela RB, et al. Modafinil Effects on Behavior and Oxidative Damage Parameters in Brain of Wistar Rats. *Behavioural Neurology*. 2014;2014:1-7.
268. Gros-Désormeaux F, Béracochéa D, Dorandeu F, Piérard C. Cognitive and emotional impairments after cutaneous intoxication by CEES (a sulfur mustard analog) in mice. *Toxicology Letters*. 2018;293:73-6.
269. Achanta S, Chintagari NR, Brackmann M, Balakrishna S, Jordt S-E. TRPA1 and CGRP antagonists counteract vesicant-induced skin injury and inflammation. *Toxicology Letters*. 2018;293:140-8.
270. Wohlman IM, Composto GM, Heck DE, Heindel ND, Lacey CJ, Guillon CD, et al. Mustard vesicants alter expression of the endocannabinoid system in mouse skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016;303:30-44.
271. Korkmaz A, Kunak ZI, Paredes SD, Yaren H, Tan D-X, Reiter RJ. The use of melatonin to combat mustard toxicity. *Neuroendocrinology Letters*. 2008;29(5):614.
272. Romero A, Gil Martín E, De Los Rios C, Egea J, Ramos E, López-Muñoz F, et al. Impact of melatonin effects on toxicology of vesicant chemical warfare agents: When science meets reality. *Melatonin Research*. 2020;3(1):101-19.
273. Korkmaz A, Reiter RJ. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? *Journal of Pineal Research*. 2007;0(0):071027215641001.
274. Balszuweit F, Menacher G, Schmidt A, Kehe K, Popp T, Worek F, et al. Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line. *Toxicology Letters*. 2016;244:35-43.
275. Siegert M, Kranawetvogl A, Thiermann H, John H. N-Acetylcysteine as a chemical scavenger for sulfur mustard: New insights by mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 2018;10(2):243-53.

276. Mullot J, Bousquet A, Burnat P. L'AP4C: caractéristiques d'un nouvel appareil de détection des toxiques chimiques de guerre et de certains toxiques industriels. *médecine et armées*. 2010;38(5):x459-64.
277. Cao Y, Hui X, Zhu H, Elmahdy A, Maibach H. In vitro human skin permeation and decontamination of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) using Dermal Decontamination Gel (DDGel) and Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL). *Toxicol Lett*. 2018;291:86-91.
278. He Q, Song J, Li H, Zhao B, Zhang Y, Wang N, et al. Chloroperoxidase-catalyzed oxidative degradation of sulfur mustard. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;225:112715.
279. Liu J, Powell KL, Thames HD, Macleod MC. Detoxication of Sulfur Half-Mustards by Nucleophilic Scavengers: Robust Activity of Thiopurines. *Chemical Research in Toxicology*. 2010;23(3):488-96.
280. Holmgren KH, Hok S, Magnusson R, Larsson A, Åstot C, Koester C, et al. Synthesis route attribution of sulfur mustard by multivariate data analysis of chemical signatures. *Talanta*. 2018;186:615-21.