

Sommaire

| | |
|---|-----|
| <i>Liste des abréviations</i> | 7 |
| <i>Liste des schémas, photos, figures et tableaux</i> | 11 |
| Avant-propos | 17 |
| <i>Chapitre 1: Contexte bibliographique</i> | 19 |
| I. Les armes chimiques | 21 |
| II. L'ypérite | 24 |
| III. Mécanismes à l'origine de la toxicité de l'ypérite..... | 42 |
| IV. Alkylation de l'ADN par l'ypérite et conséquences..... | 63 |
| <i>Chapitre 2: Du contexte aux objectifs</i> | 107 |
| <i>Chapitre 3: Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS</i> | 113 |
| I. Les méthodes de détection quantitative des dommages à l'ADN..... | 115 |
| II. Mise au point d'une méthode de détection des adduits de l'ypérite et de son analogue monofonctionnel par HPLC-MS/MS | 126 |
| <i>Chapitre 4: Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1</i> | 151 |
| I. Introduction | 153 |
| II. Formation et persistance des adduits de l'ypérite dans la peau | 155 |
| III. Formation et persistance des adduits dans les organes internes | 167 |
| IV. Conclusion..... | 181 |
| <i>Chapitre 5: Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation de l'ADN</i> | 187 |
| I. Introduction | 189 |
| II. Impact d'une exposition à l'ypérite sur certaines activités glycosylases du BER..... | 190 |
| III. Impact d'une exposition à l'ypérite sur la réparation de dommages par le BER et le NER | 194 |
| IV. Conclusion..... | 202 |
| <i>Chapitre 6: Vers de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite</i> | 205 |
| I. Introduction | 207 |
| II. Caractérisation d'un nouvel adduit à l'ADN formé par l'ypérite..... | 207 |
| III. Mise au point d'une méthode de quantification des conjugués formés par le CEES avec le glutathion, la N-acétylcystéine et la cystéine..... | 213 |
| IV. Conclusion..... | 228 |
| <i>Chapitre 7: Discussion générale</i> | 231 |

| | |
|--|------------|
| I. L'ypérite : une arme chimique toujours d'actualité | 233 |
| II. Toxicité de l'ypérite | 234 |
| III. Alkylation de l'ADN..... | 235 |
| IV. Positionnement du travail de thèse | 237 |
| V. Les adduits de l'ypérite..... | 238 |
| VI. Mise au point d'une méthode de quantification des adduits de l'ypérite sensible et haut débit..... | 239 |
| VII. Formation des adduits de l'ypérite <i>in vitro</i> | 242 |
| VIII. Le modèle animal choisi..... | 247 |
| IX. Les adduits de l'ypérite dans la peau..... | 248 |
| X. Les adduits de l'ypérite dans les organes internes | 253 |
| XI. Impact de l'ypérite sur les activités de réparation | 257 |
| Chapitre 8: Conclusion et perspectives | 261 |
| Chapitre 9: Conditions expérimentales | 269 |
| I. Culture cellulaire..... | 271 |
| II. Animaux et exposition à l'ypérite..... | 276 |
| III. Digestion de l'ADN..... | 284 |
| IV. Analyses HPLC-MS/MS..... | 285 |
| V. Mesure des activités de réparation | 286 |
| VI. Analyses statistiques | 289 |
| Liste des publications et des communications..... | 291 |
| Références bibliographiques..... | 295 |
| Annexe | 329 |

Liste des abréviations

$[Ca^{2+}]_c$: concentration de calcium cytosolique
 8-oxo-dGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
 ADN : acide désoxyribonucléique
 AGT : O6 alkylguanine transférase
 APE1 : *apurinic endonuclease 1*
 ARN : acide ribonucléique
 ARNm : acide ribonucléique messenger
 ATM : *ataxia telangiectasia mutated*
 ATP : adénosine triphosphate
 ATR : *ataxia telangiectasia mutated and rad-3 related*
 B[a]P : benzo[a]pyrène
 BER : réparation par excision de base (*base excision repair*)
 BPDE : benzo[a]pyrène diol époxyde
 CDK : kinase dépendante des cyclines (*cyclin-dependent kinase*)
 CEES : chloroethyl ethyl sulfide
 Chk : *checkpoint kinase*
 CHO : cellules d'ovaire de hamster chinois
 CIRC : centre international de recherche sur le cancer
 CPD : dimère cyclobutanique de pyrimidines (*cyclobutane pyrimidine dimers*)
 dCTP : 2'-désocytidine triphosphate
 DMSO : diméthylsulfoxyde
 DNA-PK : protéine kinase dépendante de l'ADN (*DNA-dependent protein kinase*)
 EMS : méthanesulphonate d'éthyle (*ethyl methanesulfonate*)
 ENU: éthyl-nitrosourée
 ERA : espèces réactives de l'azote
 ERO : espèces réactives de l'oxygène
 ETE-N3Ade : N3-éthylthioéthyl-adénine
 ETE-N3Ado : N3-éthylthioéthyl-adénosine
 ETE-N7Gua : N7-éthylthioéthyl-guanine
 ETE-N7Guo : N7-éthylthioéthyl-guanosine
 Gpx : glutathion peroxydase
 GR : glutathion réductase
 GSH : glutathion réduit
 GSSG : glutathion oxydé
 GST : glutathion-S-transférase
 H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
 HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
 HE-N7Gua : N7-hydroxyéthyl-guanine
 HETE-N3Ade : N3-hydroxyéthylthioéthyl-adénine
 HETE-N3Ado : N3-hydroxyéthylthioéthyl-adénosine

HETE-N7dGuo : N7-hydroxyéthylthioéthyl-désoxyguanosine
HETE-N7Gua : N7-hydroxyéthylthioéthyl-guanine
HETE-N7Guo : N7-hydroxyéthylthioéthyl-guanosine
HNE : 4-hydroxynonanal
HO[•] : radical hydroxyle
HPLC-MS/MS : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
HR : recombinaison homologue (*homologous recombination*)
MDA : malondialdéhyde
MMS: méthanesulphonate de méthyle (*methyl methanesulfonate*)
MNU: méthyl-nirosourée
MRM : multiple reaction monitoring
MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
N7Gua-ETE-N7Gua : bis[2-(guanin-7-yl)éthyl] sulfide
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NER : réparation par excision de nucléotide (*nucleotide excision repair*)
NFκB : facteur nucléaire kappa B (*nuclear factor kappa B*)
NHEJ : suture par jonctions d'extrémités (*non homologous end-joining*)
NO : monoxyde d'azote
NOS : monoxyde d'azote synthase
O₂⁻ : anion superoxyde
ONOO⁻ : peroxydinitrite
PARP : poly (ADP-ribose) polymérase
PBS : tampon phosphate salin (*phosphate buffer salin*)
PCNA : *proliferating cell nuclear factor*
RNase : ribonucléase
RPA : protéine de réplication A (*replicative protein A*)
SOD : superoxyde dismutase
SVF: sérum de veau fœtal
TA : température ambiante
Trx : thiorédoxine
TrxR : thiorédoxine réductase
TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labelling*
uma : unité de masse atomique
UV : ultraviolet

Rapport-Gratuit.com

**Liste des schémas, photos, figures et
tableaux**

Liste des Schémas

| | |
|--|-----|
| <i>Schéma 1 : Structures chimiques du 2-chlorobenzylidène malonitrile et du benzilate de 3-quinuclidinyle</i> | 21 |
| <i>Schéma 2 : Structures chimiques du phosgène et du sarin</i> | 23 |
| <i>Schéma 3 : Structures chimiques de la lewisite, de l'oxime de phosgène et de l'ypérite</i> | 24 |
| <i>Schéma 4 : Première synthèse de l'ypérite à partir de dichlorure de soufre et d'éthylène décrite par Despretz en 1822</i> | 25 |
| <i>Schéma 5 : Synthèse de l'ypérite en deux temps réalisée par Meyer en 1886</i> | 26 |
| <i>Schéma 6 : Synthèse de l'ypérite réalisée par Clarke en 1913</i> | 26 |
| <i>Schéma 7 : Anatomie de l'œil</i> | 32 |
| <i>Schéma 8 : Représentation d'une coupe transversale de l'épiderme humain</i> | 34 |
| <i>Schéma 9 : Hypothèse mécanistique la plus communément admise pour expliquer la toxicité de l'ypérite, l'alkylation multi-cibles</i> | 43 |
| <i>Schéma 10 : Structures chimiques des formes réduite et oxydée du glutathion</i> | 44 |
| <i>Schéma 11 : Synthèse du GSH en deux étapes par la γ-GCS et la GSH synthase</i> | 45 |
| <i>Schéma 12 : Les différents rôles du GSH</i> | 46 |
| <i>Schéma 13 : Mécanisme d'action du calcium dans la transduction du signal cellulaire</i> | 50 |
| <i>Schéma 14 : Conséquences de la perturbation de l'homéostasie calcique</i> | 51 |
| <i>Schéma 15 : Fonctionnement du système Trx/TrxR</i> | 57 |
| <i>Schéma 16 : Induction d'un stress oxydant par l'ypérite et ses conséquences</i> | 62 |
| <i>Schéma 17 : Structures des unités constitutives de l'ADN</i> | 64 |
| <i>Schéma 18 : Structure de la double hélice d'ADN</i> | 65 |
| <i>Schéma 19 : Formation d'un site abasique à partir de la 2'-désoxyadénosine</i> | 68 |
| <i>Schéma 20 : Désamination de la cytosine en uracile</i> | 68 |
| <i>Schéma 21 : Structures de quatre lésions oxydatives de l'ADN</i> | 69 |
| <i>Schéma 22 : Structures des adduits majoritaires du HNE et du MDA</i> | 70 |
| <i>Schéma 23 : Structures de la 3-méthyladénine et de la 7-méthylguanine</i> | 70 |
| <i>Schéma 24 : Structures du CPD et du 6-4 PP de thymines</i> | 71 |
| <i>Schéma 25 : Bases de l'ADN et sites auxquels se lient les agents chimiques</i> | 72 |
| <i>Schéma 26 : Structures chimiques des adduits de l'oxyde d'éthylène</i> | 73 |
| <i>Schéma 27 : Structures chimiques de l'isomère (+) anti BPDE ((+) - B[a]P(7R,8S) diol-(9S,10R) époxyde) et de l'adduit qu'il forme au niveau du groupement amine de la guanine</i> | 74 |
| <i>Schéma 28 : Structures chimiques des adduits de l'ypérite</i> | 75 |
| <i>Schéma 29 : Dépurination de la N7-hydroxyéthylthioéthyl-2'-désoxyguanosine en HETE-N7Gua</i> | 75 |
| <i>Schéma 30 : Structures chimiques du CEES et des adduits à l'ADN qu'il forme</i> | 76 |
| <i>Schéma 31 : Les quatre phases du cycle cellulaire</i> | 78 |
| <i>Schéma 32 : Blocage du cycle cellulaire en G1/S ou G2/M en réponse à l'apparition de dommages à l'ADN</i> ... | 79 |
| <i>Schéma 33 : Réparation de la O6-méthylguanine par l'AGT</i> | 80 |
| <i>Schéma 34 : Mécanisme d'action du système de réparation des mésappariements avec l'exemple G-T</i> | 82 |
| <i>Schéma 35 : Fonctionnement du BER via l'exemple d'une base endommagée et d'une cassure simple brin</i> | 84 |
| <i>Schéma 36 : Mécanisme d'action du GG-NER</i> | 86 |
| <i>Schéma 37 : Mécanisme de la recombinaison homologue</i> | 88 |
| <i>Schéma 38 : Mécanisme d'action du NHEJ</i> | 89 |
| <i>Schéma 39 : Mécanisme proposé par Parpimeister et al. faisant de l'alkylation de l'ADN l'étape initiale de l'endommagement des tissus</i> | 96 |
| <i>Schéma 40 : Principe de fonctionnement de l'ESI et d'un analyseur quadripolaire</i> | 122 |
| <i>Schéma 41 : Principe de fonctionnement du mode SIM</i> | 123 |
| <i>Schéma 42 : Principe de fonctionnement du mode SRM</i> | 124 |
| <i>Schéma 43 : Principe de fonctionnement du mode CNL</i> | 124 |
| <i>Schéma 44 : Principe de fonctionnement du mode « ion product »</i> | 125 |
| <i>Schéma 45 : Détection quantitative des lésions à l'ADN par HPLC-MS/MS au laboratoire</i> | 128 |
| <i>Schéma 46 : Calibration UV des adduits</i> | 138 |
| <i>Schéma 47 : Mode opératoire de l'étude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris SKH-1 après une exposition cutanée liquide</i> | 154 |
| <i>Schéma 48 : Principe de fonctionnement du système hydrochirurgical haute pression Versajet®</i> | 175 |
| <i>Schéma 49 : Mode opératoire pour l'étude de l'impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation de l'ADN</i> | 189 |
| <i>Schéma 50 : Principe de la mesure des activités d'excision avec la biopuce oligonucléotidique</i> | 191 |
| <i>Schéma 51 : Principe de la mesure des activités de réparation avec la biopuce plasmide</i> | 195 |

| | |
|--|-----|
| <i>Schéma 52 : Mode opératoire pour le dosage des adduits et des conjugués du CEES dans les kératinocytes primaires et les cellules A549</i> | 214 |
| <i>Schéma 53 : Perspectives à court et à moyen terme des travaux effectués avec l'ypérite</i> | 266 |
| <i>Schéma 54 : Système occlusif utilisé pour exposer les souris SKH-1 à des vapeurs saturantes d'ypérite</i> | 279 |
| <i>Schéma 55 : Cadre adhésif utilisé pour la biopuce plasmide</i> | 289 |

Liste des Photos

| | |
|--|-----|
| <i>Photo 1 : Flacons d'ypérite</i> | 27 |
| <i>Photo 2 : Illustration du port de masques de protection par les hommes et les animaux pendant la première guerre mondiale</i> | 28 |
| <i>Photo 3 : Conjonctivite après une exposition à l'ypérite</i> | 33 |
| <i>Photo 4 : Symptômes cutanés caractéristiques d'une exposition à l'ypérite</i> | 35 |
| <i>Photo 5 : Opacification et vascularisation retardées de la cornée après une exposition à l'ypérite</i> | 38 |
| <i>Photo 6 : Peaux des souris SKH-1 exposées à l'ypérite</i> | 155 |
| <i>Photo 7 : Les différentes zones de peau biopsiées</i> | 164 |
| <i>Photo 8 : Format plaque 96 puits de la biopuce oligonucléotidique</i> | 287 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 1 : Spectres de masse des adduits de l'ypérite sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés</i> 131 | 131 |
| <i>Figure 2 : Cinétique de dépurination de HETE-N7dGuo</i> | 133 |
| <i>Figure 3 : Détection semi-quantitative de HETE-N7dGuo après différents protocoles d'hydrolyse</i> | 134 |
| <i>Figure 4 : Chromatogrammes des monoadduits de l'ypérite sous forme de bases et de 2'-désoxyribonucléosides modifiés</i> | 136 |
| <i>Figure 5 : Cinétique de la stabilité des adduits à l'ARN de l'ypérite</i> | 137 |
| <i>Figure 6 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole de chacun des adduits de l'ypérite</i> | 139 |
| <i>Figure 7 : Spectres de masse des adduits du CEES sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés</i> ... | 140 |
| <i>Figure 8 : Cinétique de dépurination de ETE-N7dGuo</i> | 141 |
| <i>Figure 9 : Cinétique de la stabilité des adduits à l'ARN du CEES</i> | 142 |
| <i>Figure 10 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole de chacun des adduits du CEES</i> | 143 |
| <i>Figure 11 : Evaluation de la linéarité de la détection des adduits de l'ypérite et du CEES</i> | 144 |
| <i>Figure 12 : Evaluation de l'effet matrice sur la mesure des adduits de l'ypérite et du CEES</i> | 145 |
| <i>Figure 13 : Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans de l'ADN isolé</i> | 147 |
| <i>Figure 14 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'ADN extrait de monocytes THP1 exposés à 10 µM d'ypérite ou de CEES</i> | 148 |
| <i>Figure 15 : Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans les monocytes THP1</i> | 149 |
| <i>Figure 16 : Mesure de la perte insensible en eau au cours du temps après une exposition cutanée liquide</i> | 156 |
| <i>Figure 17 : Chromatogramme obtenu après l'analyse HPLC-MS/MS d'ADN extrait de peau de souris exposée à 2 mg/kg d'ypérite</i> | 157 |
| <i>Figure 18 : Formation des adduits de l'ypérite dans la peau traitée après une exposition cutanée liquide</i> | 158 |
| <i>Figure 19 : Formation des adduits de l'ypérite dans la peau traitée après une exposition cutanée vapeur</i> | 159 |
| <i>Figure 20 : Induction de l'apoptose par l'ypérite 24 h post-exposition</i> | 160 |
| <i>Figure 21 : Etude de la corrélation entre la fréquence des adduits déterminée 6 h post-traitement et le nombre de cellules apoptotiques quantifiées 24 h post-exposition à 6 et 60 mg/kg</i> | 161 |
| <i>Figure 22 : Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans la peau exposée</i> | 162 |
| <i>Figure 23 : Formation des adduits de l'ypérite dans la peau adjacente après une exposition cutanée liquide</i> . | 165 |
| <i>Figure 24 : Chromatogramme obtenu après l'analyse HPLC-MS/MS d'ADN extrait de cerveau de souris exposée à 2 mg/kg d'ypérite</i> | 168 |
| <i>Figure 25 : Formation de HETE-N7Gua dans différents organes internes après une exposition cutanée liquide</i> | 170 |
| <i>Figure 26 : Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans différents organes internes</i> | 173 |
| <i>Figure 27 : Effet de la déterision sur la persistance des adduits de l'ypérite dans le cerveau et les poumons</i> ... | 177 |

| | |
|--|-----|
| Figure 28 : Dosage de la 8-oxo-dGuo au cours du temps dans les organes internes après une exposition cutanée liquide | 179 |
| Figure 29 : Dosage de la 8-oxo-dGuo dans différents organes internes après une exposition cutanée vapeur. | 180 |
| Figure 30 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités d'excision des glycosylases à 4 h post-exposition | 192 |
| Figure 31 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités d'excision des glycosylases à 24 h post-exposition | 193 |
| Figure 32 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités de réparation de plusieurs lésions 4 h post-exposition | 196 |
| Figure 33 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités de réparation de plusieurs lésions 24 h post-exposition | 198 |
| Figure 34 : Corrélation entre le taux d'adduits à 6 h post-exposition et les activités de réparation des lésions CPD, CisP et Pso à 4 h post-exposition..... | 200 |
| Figure 35 : Corrélation entre les taux d'adduits et les activités de réparation des lésions CPD, CisP et Pso à 24 h post-exposition | 201 |
| Figure 36 : Spectre de masse de l'adduit GSH-HETE-N7Gua | 208 |
| Figure 37 : Chromatogramme obtenu après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole de GSH-HETE-N7Gua | 209 |
| Figure 38 : Quantification de l'adduit GSH-HETE-N7Gua dans les monocytes THP1 | 210 |
| Figure 39 : Formation de GSH-HETE-N7Gua dans différents organes internes après une exposition cutanée liquide | 211 |
| Figure 40 : Persistance de GSH-HETE-N7Gua au cours du temps dans différents organes internes | 213 |
| Figure 41 : Spectre de masse du conjugué GSH-CEES..... | 215 |
| Figure 42 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole des conjugués GSH-CEES, Nac-CEES et Cys-CEES | 216 |
| Figure 43 : Evaluation de la survie des kératinocytes primaires de trois donneurs après une exposition au CEES | 217 |
| Figure 44 : Cinétique de formation des adduits et des conjugués du CEES dans des kératinocytes primaires.. | 218 |
| Figure 45 : Effet de la dose de traitement sur la formation des adduits et des conjugués du CEES dans des kératinocytes primaires..... | 219 |
| Figure 46 : Cinétique de réparation des adduits et des conjugués du CEES dans des kératinocytes primaires | 220 |
| Figure 47 : Evaluation de la survie des cellules A549 après une exposition au CEES | 221 |
| Figure 48 : Cinétique de formation des adduits et des conjugués du CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires..... | 223 |
| Figure 49 : Effet de la dose de traitement sur la formation des adduits et des conjugués du CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires | 224 |
| Figure 50 : Effet de la dose de traitement sur la formation des adduits et des conjugués du CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires | 227 |

Liste des Tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Gradient optimisé pour la séparation des adduits de l'ypérite par HPLC..... | 131 |
| Tableau 2 : Caractérisation HPLC-MS/MS des adduits de l'ypérite sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés | 132 |
| Tableau 3 : Caractérisation HPLC-MS/MS des adduits du CEES sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés..... | 141 |
| Tableau 4 : Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la mesure des adduits de l'ypérite et du CEES..... | 144 |
| Tableau 5 : Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans la peau exposée..... | 163 |
| Tableau 6 : Constantes d'élimination des adduits de l'ypérite dans la peau exposée | 163 |
| Tableau 7 : Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans la peau adjacente..... | 166 |
| Tableau 8 : Formation de HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua dans différents organes internes après une exposition cutanée liquide..... | 169 |
| Tableau 9 : Constantes d'élimination des adduits de l'ypérite dans différents organes internes | 174 |
| Tableau 10 : Types de dommages à l'ADN contenus dans la biopuce plasmide et système de réparation les prenant en charge | 194 |

Avant-propos

Bien qu'ayant une histoire de près de 200 ans, l'ypérite, arme chimique de guerre, reste une menace d'actualité pour les populations civiles et militaires. Deux raisons principales expliquent cette menace, à savoir une synthèse relativement aisée, d'où son utilisation potentielle lors d'attaques terroristes, et l'absence d'antidote efficace. Après une exposition à l'ypérite, les organes majoritairement atteints sont la peau, l'appareil respiratoire et les yeux. De plus, du fait de ses propriétés lipophiles, elle est également capable de traverser la barrière cutanée et d'atteindre d'autres organes tels que le tractus gastro-intestinal ou la moelle osseuse. Les symptômes générés par l'ypérite au niveau de ces différentes cibles sont relativement bien documentés. En revanche, malgré des décennies de recherche, les mécanismes moléculaires par lesquels elle initie ces symptômes restent non élucidés même si de nombreux évènements clés ont pu être mis en évidence. Parmi ceux-ci, l'alkylation de l'ADN est une des hypothèses les plus communément admises pour tenter d'expliquer sa toxicité aiguë. En outre, l'alkylation de l'ADN est également impliquée dans la toxicité chronique de l'ypérite qui est classée cancérigène par le centre international de recherche sur le cancer. Elle aboutit à la modification des bases de l'ADN, formant des adduits.

L'étude de la formation et de la persistance chez l'animal des adduits générés par l'ypérite constitue l'axe principal de mon travail de thèse.

Celui-ci a été rendu possible par l'étroite collaboration des deux laboratoires auxquels j'ai été rattaché, le laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques » du commissariat à l'énergie atomique et aux énergies renouvelables de Grenoble et le laboratoire « Unité Brûlure Chimique » de l'institut de recherche biomédical des armées de La Tronche. Le premier possède une grande expertise dans la détection et la quantification de nombreux dommages à l'ADN et le second est spécialisé dans les brûlures cutanées induites par les armes chimiques de guerre.

Chapitre 1: Contexte bibliographique

I. Les armes chimiques

Les armes chimiques correspondent, d'après l'organisation pour l'interdiction des armes chimiques, aux « produits chimiques qui par leur action toxique sur des processus biologiques peuvent provoquer chez les êtres humains ou les animaux la mort, une incapacité temporaire ou des dommages permanents » (<http://www.un.org>). Il existe plusieurs types d'armes chimiques qui peuvent être regroupées en agents chimiques létaux et non létaux.

1. Les agents chimiques non létaux

1.1. Les neutralisants

Les agents neutralisants correspondent à des irritants sensoriels pouvant provoquer un larmoiement intense, une irritation de la peau et des voies respiratoires voire des nausées et des vomissements. Ils sont surtout utilisés pour la répression d'émeutes mais ont été aussi employés lors de la première guerre mondiale. Les agents neutralisants les plus connus sont les gaz lacrymogènes (ex : 2-chlorobenzylidène malonitrile, Schéma 1) (<http://www.un.org>).

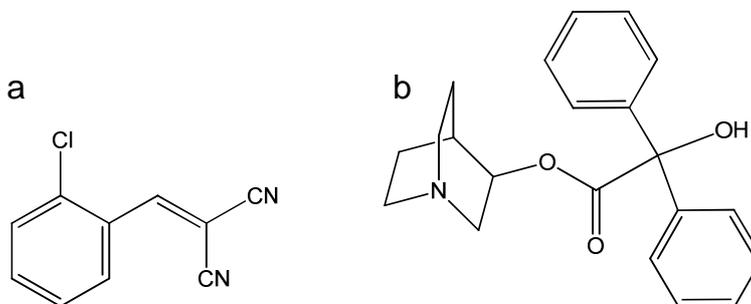


Schéma 1 : Structures chimiques du 2-chlorobenzylidène malonitrile et du benzilate de 3-quinuclidinyle

2-chlorobenzylidène malonitrile (a), benzilate de 3-quinuclidinyle (b)

1.2. Les incapacitants

Les agents incapacitants sont des agents provoquant, comme leur nom l'indique, une incapacité qui est temporaire (de quelques heures à quelques jours) et qui peut être d'ordre

Contexte bibliographique

mentale ou physique. L'agent incapacitant le plus connu est le benzilate de 3-quinuclidinyle (Schéma 1) qui est responsable, via son action anticholinergique, de troubles de la mémoire et de la compréhension.

2. Les agents chimiques létaux

2.1. Les suffocants

Les agents suffocants sont des agents qui attaquent le tissu pulmonaire en causant une accumulation de fluide dans les poumons à l'origine de la suffocation des victimes. Le chlore et le phosgène (Schéma 2) en font tous les deux parties et ont été utilisés pour la première fois pendant la première guerre mondiale par les Allemands. De nos jours, le phosgène continue d'être synthétisé à grande échelle car il sert de précurseur à la synthèse de différents polymères comme le polycarbonate ou le polyuréthane.

2.2. Les agents hémotoxiques

Les agents hémotoxiques sont des agents qui bloquent l'absorption de l'oxygène par le sang, entraînant une mort par asphyxie. La peau et les voies aériennes constituent les voies d'entrée de ces agents dans l'organisme. Le cyanure d'hydrogène, employé lors de la première guerre mondiale par les Français, est le plus connu des agents hémotoxiques.

2.3. Les neurotoxiques

Les agents neurotoxiques font partie des armes chimiques les plus mortelles. Ils ont été mis au point pour la première fois par les Allemands dans les années trente alors qu'ils cherchaient à synthétiser de nouveaux pesticides. Il en existe deux types, les agents G (tabun, sarin, soman, cyclohexyl sarin) et les agents V (VX), qui peuvent exercer leurs effets toxiques par absorption cutanée et inhalation. Ce sont des composés organophosphorés, inodores et incolores qui inhibent l'action de l'acétylcholinestérase. Cette dernière catalyse la dégradation de l'acétylcholine au niveau des fentes synaptiques. Son inhibition provoque une action

Contexte bibliographique

prolongée de l'acétylcholine qui est à l'origine de différents symptômes tels que secousses musculaires, myosis, insuffisance cardiaque ou coma. Tabun et sarin (Schéma 2) ont été utilisés lors de la guerre Iran-Irak par les Irakiens qui ont, de plus, employé le sarin contre leur propre population civile. La secte japonaise Aum Shinrikyo a également utilisé ce dernier lors d'une attaque terroriste dans le métro de Tokyo en 1995 (Hoffman *et al.*, 2007).

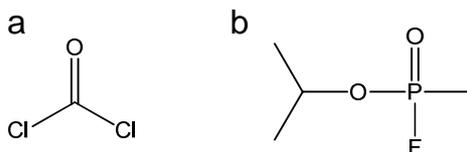


Schéma 2 : Structures chimiques du phosgène et du sarin

phosgène (a), sarin (b)

2.4. Les vésicants

Les agents vésicants se caractérisent par leur propension à former au niveau de la peau des phlyctènes ou vésicules. Ils regroupent la lewisite, l'oxime de phosgène et l'ypérite.

2.4.1. La lewisite

La lewisite ou 2-chlorovinylchlorarsine (Schéma 3) se présente sous la forme d'un liquide huileux à température ambiante. Elle doit son nom au capitaine W.L Lewis de l'armée des Etats-Unis qui a été un des premiers à la synthétiser. Peau, yeux et poumons sont les organes les plus touchés après une exposition à la lewisite. Les premiers symptômes se manifestent dans les secondes suivant l'exposition (Hurst *et al.*, 2008). Il existe un antidote à la lewisite, le dimercaprol également appelé « British anti-Lewisite » qui est un chélateur de métaux lourds. Il forme un complexe avec l'arsenic contenu dans la lewisite qui est alors plus facilement éliminée par l'organisme. Pendant la première guerre mondiale, la lewisite a été synthétisée en grande quantité par l'armée américaine mais n'a pas été utilisée. En effet, un bateau chargé en lewisite à destination de l'Europe était encore sur la mer quand l'armistice fut signé. En revanche, elle fut employée dans les années trente par le Japon lors de l'invasion de la Chine (Hilmas *et al.*, 2008).

2.4.2. L'oxime de phosgène

L'oxime de phosgène (Schéma 3) est classé parmi les agents vésicants mais n'en est pas vraiment un. Il ne provoque pas la formation de vésicules sur la peau. De part ses propriétés c'est plutôt un urticant. Il a été synthétisé pour la première fois en 1929 par les Allemands. Les organes cibles de l'oxime de phosgène sont les yeux, la peau et les poumons. Cette arme chimique n'a jamais été utilisée sur un champ de bataille.

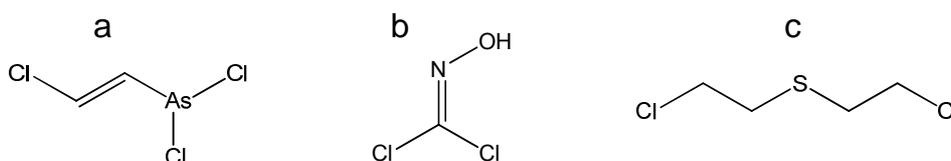


Schéma 3 : Structures chimiques de la lewisite, de l'oxime de phosgène et de l'ypérite

lewisite (a), oxime de phosgène (b), ypérite (c)

Après cette brève présentation des différentes familles d'armes chimiques, nous allons nous concentrer plus spécifiquement sur l'ypérite (Schéma 3) qui constitue de loin l'agent chimique de guerre le plus connu et le plus utilisé. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'historique de ses synthèses et de ses utilisations lors de différents conflits ainsi qu'aux symptômes qu'elle engendre. Dans un second temps, nous nous focaliserons sur les cibles moléculaires de l'ypérite mis en avant pour tenter d'expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine de ces symptômes, mécanismes non totalement élucidés à ce jour.

II. L'ypérite

1. Historique des synthèses

L'ypérite ou bis(2-chloroethyl) sulfide a été synthétisée pour la première fois en 1822 (Schéma 4). Elle est le fait d'un chimiste et physicien français du nom de César-Mansuète Despretz. Alors qu'il étudie la réaction entre l'éthylène et le dichlorure de soufre, il obtient

Contexte bibliographique

un liquide dont l'odeur est bizarre et lui rappelle celle de raifort ou de la moutarde (Szinicz, 2005). Cependant, il n'en expose pas les effets toxiques.

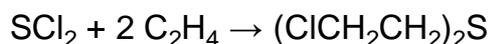


Schéma 4 : Première synthèse de l'ypérite à partir de dichlorure de soufre et d'éthylène décrite par Despretz en 1822

Quelques années plus tard, en 1860, réitérant la synthèse réalisée par Despretz, Albert Niemann, chimiste allemand connu pour être le premier à avoir extrait la cocaïne des feuilles de coca péruvienne, décrit les effets toxiques de l'ypérite (Duchovic and Vilensky, 2007) : « La propriété la plus caractéristique de cette huile est également très dangereuse. Elle consiste dans le fait que la plus minuscule trace qui pourrait accidentellement entrer en contact avec n'importe quelle partie de la peau, bien que ne causant aucune douleur, produit en quelques heures une rougeur et dans les jours suivant une ampoule sévère, qui suppure pendant un long moment et est très difficile à cicatriser. Un grand soin est par conséquent requis pour travailler avec ce composé ».

Les propriétés toxiques sont également décrites en 1860 par un physicien britannique, Frederick Guthrie. Toujours à partir de dichlorure de soufre et d'éthylène, celui-ci synthétise de l'ypérite qu'il appelle à l'époque bichlorosulfide d'éthylène et décrit ses propriétés comme suit : « Son odeur est âcre mais pas désagréable, elle ressemble à celle de l'huile de moutarde ; son goût est astringent et similaire à celui du raifort. Les petites quantités de vapeur qu'il diffuse attaquent les parties les plus fines de la peau, comme celles entre les doigts et autour des yeux, détruisant l'épiderme. S'il reste sous forme liquide sur la peau, il provoque une ampoule » (Duchovic and Vilensky, 2007).

En 1886, Victor Meyer, chimiste allemand, décrit une autre synthèse de l'ypérite en deux temps (Schéma 5). Il fait réagir tout d'abord du chloroéthanol avec du sulfure de potassium produisant ainsi du thiodiglycol qu'il traite alors avec du trichlorure de phosphore. Cette synthèse conduit à un produit plus pur et la description des ses propriétés par Meyer ressemble fortement à celles effectuées avant lui par Niemann et Guthrie. Meyer va encore plus loin en faisant tester le produit de sa synthèse sur des lapins. Ces derniers sont exposés à des vapeurs saturantes d'ypérite et meurent au bout de trois jours de pneumonie après avoir présenté dès le premier jour des signes cliniques tels que des rougeurs au niveau du nez et des yeux. Meyer écrit à ce sujet : « Le travail prévu avec les chlorures n'a pas été poursuivi en

Contexte bibliographique

raison des propriétés extrêmement toxiques du composé. Il est frappant qu'une substance apparemment inoffensive qui est seulement faiblement volatile, presque insoluble dans l'eau, et possède une très légère odeur [...], exerce un effet toxique spécifique. Sa constitution chimique n'aurait jamais conduit personne à présumer de ses propriétés agressives ». (Duchovic and Vilensky, 2007)

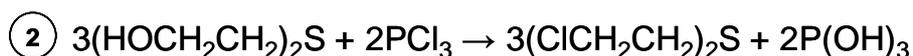
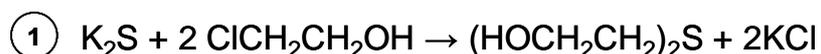


Schéma 5 : *Synthèse de l'ypérite en deux temps réalisée par Meyer en 1886*

Dans un premier temps, du thiodiglycol est synthétisé à partir de sulfure de potassium et de chloroéthanol, puis celui-ci est traité avec du trichlorure de potassium pour former de l'ypérite.

Dans le but de synthétiser du thiazan, Hans Clarke, biochimiste britannique, utilise comme précurseur en 1913 l'ypérite. Il synthétise cette dernière en reprenant la réaction de Meyer avec une légère modification (Schéma 6). En effet, il se rend compte, en remplaçant le trichlorure de phosphore par de l'acide chlorhydrique comme agent chlorant dans la deuxième étape, que la synthèse est plus rapide. Il rapporte du produit les mêmes effets toxiques que Meyer et pense malgré ces derniers que l'ypérite peut être manipulée en toute sécurité tant que ses vapeurs ne sont pas respirées ou qu'elle n'entre pas en contact avec la peau (Duchovic and Vilensky, 2007). Malgré ces précautions, il est la victime, lors de travaux de recherche menés en Allemagne, d'une grave brûlure à la jambe ayant nécessité une hospitalisation de deux mois.

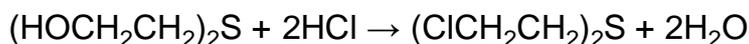


Schéma 6 : *Synthèse de l'ypérite réalisée par Clarke en 1913*

Le trichlorure de phosphore, agent chlorant utilisé par Meyer, est ici remplacé par de l'acide chlorhydrique.

2. Propriétés physico-chimiques

A température ambiante, l'ypérite se présente sous la forme d'un liquide huileux et incolore lorsqu'elle pure. En fonction du degré d'impuretés, sa couleur varie du jaune pâle au brunâtre (Photo 1). Les odeurs caractéristiques de moutarde, d'ail et d'oignon associées à

Contexte bibliographique

l'ypérite sont dues à ces impuretés. Elle est peu soluble dans l'eau mais sa solubilité dans l'éthanol est élevée (Kehe *et al.*, 2008a). L'ypérite possède une température de fusion de 14°C. Sa faible volatilité (75 mg/m³ à 0°C, 625 mg/m³ à 20°C et 1443 mg/m³ à 30°C) ainsi que sa température d'ébullition élevée (217°C) en font un agent persistant dans les zones tempérées où elle peut contaminer l'environnement pendant une semaine environ (Merat *et al.*, 2003; Paromov *et al.*, 2007). En revanche, lorsque la température dépasse les 37°C, l'ypérite ne persiste pas plus de 24 h.



Photo 1 : Flacons d'ypérite

Le degré de pureté de l'ypérite est fonction de sa couleur, plus l'ypérite contient d'impuretés et plus sa couleur vire au brunâtre (d'après IRBA/Département de toxicologie).

3. Historique des utilisations militaires

3.1. Première guerre mondiale

L'utilisation des armes chimiques remonte aux temps préhistoriques avec notamment l'utilisation de flèches empoisonnées. Toutefois, leur utilisation en tant qu'armes de destruction massive date de la première guerre mondiale (Szinicz, 2005). Celle-ci a d'ailleurs été surnommée « guerre chimique » ou « guerre des apothicaires » (Salem *et al.*, 2007). Au cours de la première guerre mondiale, les chimistes des deux camps ont examiné plus de 3000 substances chimiques pour une utilisation potentielle en tant qu'arme (Hilmas *et al.*, 2008). La grande majorité de celles retenues ont été synthétisées pour la première fois pendant le 19^{ème} siècle.

Les armes chimiques furent utilisées très tôt lors de ce conflit. En effet, les Français, premiers à utiliser ce type d'armes, employèrent dès août 1914 un gaz lacrymogène, le

Contexte bibliographique

bromoacétate d'éthyle (Hilmas *et al.*, 2008). Les Allemands utilisèrent à leur tour quelques mois plus tard des gaz lacrymogènes (bromure de xylyle) et des agents irritants (chlorosulfonate de dianisidine). Cependant, ni les gaz lacrymogènes, ni les agents irritants, chacun utilisés à petite échelle, ne se révélèrent efficaces. Ces échecs ne découragèrent aucun des deux camps qui continuèrent le développement de nouveaux types d'armes chimiques.

La première arme chimique utilisée à grande échelle est un agent suffocant, le dichlore. Elle fut utilisée par les Allemands le 22 avril 1915 lors de la deuxième bataille d'Ypres et a fait entre 3000 et 15000 victimes parmi les Alliés. Ceux-ci n'étaient pas préparés à une telle attaque dont le succès a également pris de court les troupes allemandes qui n'en ont pas profité. Après celle-ci, les Alliés ont développé leurs premiers masques à gaz (Photo 2) et ont utilisé à leur tour le dichlore.



Photo 2 : Illustration du port de masques de protection par les hommes et les animaux pendant la première guerre mondiale

(d'après Hilmas et al., 2008)

S'en est alors suivi une compétition entre les deux camps pour développer des armes de plus en plus toxiques et des masques de protection de plus en plus efficaces. Le dichlore fut par exemple très vite remplacé par le phosgène, autre agent suffocant beaucoup plus mortel. Cependant, l'efficacité des masques de protection à l'usage des hommes mais également des animaux limitèrent les pertes dues aux agents suffocants. Les recherches effectuées par les chimistes se sont alors orientées vers des armes capables de produire des effets toxiques via d'autres voies d'expositions que les voies aériennes.

Contexte bibliographique

Lommel et Steinkopf, deux chimistes allemands, furent les premiers à se tourner vers l'utilisation militaire de l'ypérite connue pour ses effets toxiques générés à la fois après respiration et après contact avec la peau. Elle fut synthétisée à grande échelle selon le procédé Meyer-Clarke. L'ypérite a été utilisée pour la première fois pendant la nuit du 12 au 13 juillet 1917 lors de la troisième bataille d'Ypres, d'où son nom. Cette première utilisation de l'ypérite par les Allemands contre les troupes britanniques a fait plus de 3000 blessés graves dont deux en sont morts. Une attaque à plus grande échelle fut lancée une semaine plus tard faisant près de 14000 victimes côté britannique dont 500 en moururent durant les trois semaines suivant l'offensive (Hilmas *et al.*, 2008). Le mois suivant, ce sont 20000 français qui furent blessés suite à l'explosion d'obus contenant de l'ypérite. Dès sa première utilisation, l'ypérite fut identifiée par les Alliés qui mirent plusieurs mois avant d'en utiliser eux-mêmes. Ils l'ont synthétisée selon le procédé Despretz-Meyer-Guthrie.

Bien qu'employée tardivement au cours de la première guerre mondiale, l'ypérite fut l'arme chimique la plus utilisée. Elle a d'ailleurs été surnommée « king of the war gases » (Hilmas *et al.*, 2008). La grande majorité des blessés par armes chimiques au cours de ce conflit est en effet due à l'ypérite. Sur les 1.3 millions de blessés par ces armes, plus de 70% l'ont été à cause de l'ypérite. La proportion de blessés par cette dernière atteint même 88% chez les Britanniques. Le « succès » de l'ypérite n'est pas en relation avec la mortalité qu'elle cause, celle-ci étant relativement faible. Par exemple, seulement 2.2 et 2.6% des Américains et des Britanniques exposés à l'ypérite en sont morts. Ce qui a conduit à l'utilisation massive de l'ypérite, c'est la longue convalescence engendrée chez ceux qui en ont été victimes, convalescence qui s'étendait sur plusieurs semaines mobilisant ainsi lits et personnel médical. L'effet psychologique de l'ypérite, découlant des symptômes occasionnés et de la longue convalescence associée, a également été déterminant dans son utilisation massive.

3.2. Entre les deux guerres

A la fin de la première guerre mondiale, le protocole de Genève, prévoyant l'interdiction de l'utilisation des armes chimiques sur les champs de bataille, fut signé. Cependant, ce traité n'interdisait ni la mise au point ni la possession de telles armes (<http://www.un.org>). De nombreuses armes ont continué à être synthétisées dont l'ypérite qui a été produite en grande quantité et stockée par de nombreux pays (Szinicz, 2005). Entre les deux guerres mondiales,

Contexte bibliographique

elle a été utilisée lors de différents conflits par plusieurs pays. C'est le cas de l'Espagne qui en a utilisée dans les années 20 lors de la guerre du Rif au Maroc (1921-1926) (Pita and Vidal-Asensi, 2010). Elle a également été employée lors de la colonisation de l'Abyssinie par l'Italie en 1935 à la fois sous forme de bombe et pulvérisée depuis des avions. En 1937, le Japon s'en est servi lors de l'invasion de la Chine (Salem *et al.*, 2007).

En outre, des efforts considérables ont été entrepris à la sortie de la première guerre mondiale afin de synthétiser des analogues d'armes chimiques connues plus efficaces (Szinicz, 2005). Ainsi, des analogues de l'ypérite ont été mis au point en remplaçant le soufre par l'azote. Les plus connus sont le tris-(2-chloroéthyl)amine, le méthyl- et l'éthyl-bis-(2-chloroéthyl)amine (Szinicz, 2005). On parle également de moutardes à l'azote ou moutardes azotées.

3.3. Deuxième guerre mondiale

En dehors du zyklon B utilisé dans les chambres à gaz des camps d'extermination, aucune arme chimique n'a été utilisée pendant la deuxième guerre mondiale. La production massive de ces armes par les différents belligérants pendant l'entre deux guerres aurait joué un effet dissuasif. De plus, Adolf Hitler, ayant été lui-même victime de l'ypérite lors de la première guerre mondiale, aurait répugné à utiliser de telles armes (Hurst *et al.*, 2008). Néanmoins, une exposition accidentelle de civiles eu lieu à Bari en Italie en 1943 suite au bombardement du « USS John Harvey » par l'aviation allemande. Celui-ci contenait plusieurs dizaines de tonnes d'ypérite et des lésions oculaires et cutanées ont été mises en évidence chez 617 victimes. Le nombre de morts suite à cette exposition s'est élevé à 89 (Hurst *et al.*, 2008).

3.4. Après la deuxième guerre mondiale

Après la deuxième guerre mondiale, l'ypérite a été employée pendant la guerre civile yéménite (1962-1970), les Egyptiens en ayant utilisée en soutien aux républicains contre les royalistes. La guerre Iran-Irak (1980-1988) constitue, après la première guerre mondiale, le second conflit où l'ypérite a été utilisée à grande échelle. Ce conflit a fait plus de 100000 blessés dus à l'ypérite côté iranien, dont 30000 en souffrent encore aujourd'hui (Aghanouri *et al.*, 2004; Balali-Mood and Hefazi, 2005b; Kehe and Szinicz, 2005; Khateri *et al.*, 2003). Les

Contexte bibliographique

Irakiens ont également employé l'ypérite contre leurs populations kurdes lors notamment du massacre de Halabja en 1988 (Paromov *et al.*, 2007).

3.5. Une molécule, plusieurs appellations

L'ypérite, nom qui provient de l'utilisation du sulfure de dichloroéthyle pour la première fois près de la ville d'Ypres en Belgique, peut être retrouvée sous différentes appellations (Kehe and Szinicz, 2005; Szinicz, 2005). Du fait de l'odeur caractéristique de moutarde associée à ce toxique de guerre, son nom le plus connu est le gaz moutarde. Elle peut également être retrouvée sous l'appellation LOST qui correspond à l'acronyme des deux premières lettres des noms des deux chimistes allemands ayant travaillé à son utilisation militaire, Lommel et Steinkopf. Pyro correspond au nom de code donné à l'ypérite par les Britanniques pendant la première guerre mondiale. Le nom de « yellow cross » est dû à la croix jaune dessinée par les allemands sur les obus chargés en ypérite. H ou HD est le nom de code militaire de l'ypérite utilisé par l'OTAN suivant qu'elle est distillée ou non et a pour origine le mot « huns » qui désigne les Allemands dans l'argot anglais. HT et HL représentent les mélanges d'ypérite et d'agent T (bis-[2-chloroethyl thioethyl]ether) ou de lewisite, respectivement. Ils ont été développés dans le but de pouvoir utiliser l'ypérite en hiver, l'agent T et la lewisite jouant le rôle d'antigel. HN 1, 2 et 3 sont les noms de code militaire respectifs pour les moutardes azotées méthyl- bis-(2-chloroethyl)amine, l'éthyl- bis-(2-chloroethyl)amine et tris-(2-chloroéthyl)amine.

3.6. Les effets d'une exposition à l'ypérite

Suite à une exposition à l'ypérite, les organes majoritairement atteints sont ceux en contact direct avec l'environnement extérieur à savoir la peau, les yeux et l'appareil respiratoire. En effet, parmi les survivants d'attaque à l'ypérite lors de la première guerre mondiale et de la guerre Iran-Irak, presque toutes les victimes ont souffert de brûlures au niveau des yeux et de la peau ainsi que de lésions respiratoires (Balali-Mood and Hefazi, 2005a). En plus de ces trois organes, l'ypérite est également capable d'atteindre d'autres cibles comme le tractus gastro-intestinal ou la moelle osseuse. L'apparition des premiers symptômes après une exposition à l'ypérite est toujours précédée par une période de latence

Contexte bibliographique

dont la durée varie. Cette durée, qui est généralement de quelques heures, est fonction de la dose d'exposition. En effet, la période de latence est inversement proportionnelle à la dose d'exposition (Kehe and Szinicz, 2005). D'autres facteurs comme le temps d'exposition, l'état de l'ypérite (liquide, gaz), le mode d'exposition, l'humidité ou encore la température (Firooz *et al.*, 2011) peuvent influencer sur la durée d'apparition des symptômes. En outre, cette dernière dépend également de la personne exposée, de son état immunitaire et du site corporel touché. Il en est de même pour ce qui est de la sévérité des symptômes (Balali-Mood and Hefazi, 2006). On peut distinguer deux types d'effets toxiques de l'ypérite, les effets à court terme ou toxicité aiguë et les effets à long terme ou toxicité chronique.

3.6.1. Toxicité à court terme ou toxicité aiguë

3.6.1.1. Yeux

Les yeux sont les organes les plus sensibles et les premiers touchés suite à une exposition vapeur à l'ypérite (Etezzad-Razavi *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1995b) (Hurst and Smith, 2007). Par exemple, après une exposition vapeur de moins d'une heure à seulement 0.0005 mg d'ypérite par litre d'air, une conjunctivite a été observée chez 8 personnes exposées sur 13 alors que seulement 3 ont développé des symptômes cutanés (Reed, 1920). Cette susceptibilité marquée des yeux à une exposition au gaz moutarde peut être attribuée à plusieurs caractéristiques anatomiques (Schéma 7).

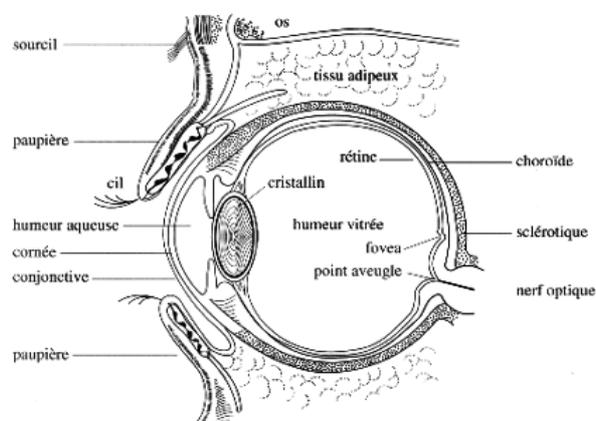


Schéma 7 : Anatomie de l'œil

Contexte bibliographique

La cornée et la conjonctive sont des voies d'absorption de l'ypérite facilitant son action toxique. En outre, du fait de ses propriétés lipophiles, le gaz moutarde a tendance à se concentrer dans la partie huileuse des larmes, d'où une interaction prolongée avec les cellules épithéliales de la cornée qui, de part leur métabolisme accru, constituent une des cibles les plus vulnérables de l'ypérite (Solberg *et al.*, 1997). Les symptômes faisant suite à une exposition de l'ypérite peuvent être classés en fonction de la dose d'exposition en symptômes légers, modérés et sévères. Pour des doses variant entre 50 et 100 mg min/m³, conjonctivite (Photo 3), granulosité sous la paupière et larmoiement sont observés entre 4 et 12h après exposition (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Kehe and Szinicz, 2005). Pour des doses comprises entre 100 et 200 mg min/m³, des symptômes tels que douleur intense, sécheresse des yeux, photophobie et blépharospasme (contraction involontaire de la paupière) apparaissent 6 h après exposition (Solberg *et al.*, 1997). Enfin, pour des doses supérieures à 200 mg min/m³ et des temps post-exposition entre 3 et 12h, œdème de la cornée, blépharospasme sévère, photophobie, vision floue voire cécité temporaire pour les cas les plus graves ont été relevés. Après une exposition liquide, les manifestations cliniques sont encore plus sévères. La cornée est en effet encore plus endommagée qu'après une exposition vapeur et peut même être perforée dans le cas d'une exposition importante. Le patient peut alors perdre la vue ou même son œil (Hurst and Smith, 2007).



Photo 3 : Conjonctivite après une exposition à l'ypérite
(d'après Willems *et al.*, 1989)

3.6.1.2. Peau

Parmi les facteurs environnementaux critiques à l'origine de la sévérité des symptômes au niveau de la peau, on retrouve la température et l'humidité. Plus la température et l'humidité

Contexte bibliographique

sont élevées et plus la sévérité des symptômes est importante. De plus, certains sites anatomiques sont plus susceptibles que d'autres. C'est le cas par exemple pour les aisselles, la sphère ano-génitale ou encore le cou qui correspondent à des sites où humidité et température de la peau sont plus élevées et où son épaisseur est plus fine (Cullumbine, 1947; Hurst and Smith, 2007; Naraghi *et al.*, 2005). Au niveau de ces zones, l'épaisseur épidermique est moindre ce qui favorise la pénétration de l'ypérite. Le taux de pénétration percutanée du gaz moutarde est de $1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ et de $2.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ suite à une exposition vapeur à 21 et 31°C respectivement. Il est plus rapide après une exposition liquide : 2.2 et $5.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ pour des températures respectives de 16 et 38°C (Nagy *et al.*, 1946). La concentration seuil d'ypérite pour l'apparition de symptômes au niveau de la peau varie pour une exposition vapeur entre 100 et 200 $\text{mg min}/\text{m}^3$ et entre 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour une exposition liquide. Pour ces doses et entre 4 et 8h post-exposition, un érythème (Photo 4), ressemblant à un coup de soleil, est visible. Cet érythème est souvent accompagné d'un prurit intense et de sensations de brûlure. La formation de l'érythème est suivie par celle d'un œdème sous-cutané. A des doses d'expositions plus importantes (1000-2000 $\text{mg min}/\text{m}^3$ pour une exposition vapeur et 40-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour une exposition liquide), les phlyctènes (Photo 4), qui se manifestent sous la forme de larges lésions bulleuses, sont observables (Ghanei *et al.*, 2010; Kehe and Szinicz, 2005; Momeni *et al.*, 1992; Naraghi *et al.*, 2005; Smith and Dunn, 1991). Leur apparition est la résultante de microvésicules qui se forment à la périphérie des zones érythémateuses et qui coalescent (Hurst and Smith, 2007). Ces phlyctènes sont entourées d'une fine membrane et sont remplies d'un liquide translucide et jaunâtre ne contenant pas d'ypérite. Bien qu'handicapant, ils ne sont pas douloureux *per se* (Balali-Mood and Hefazi, 2005a).

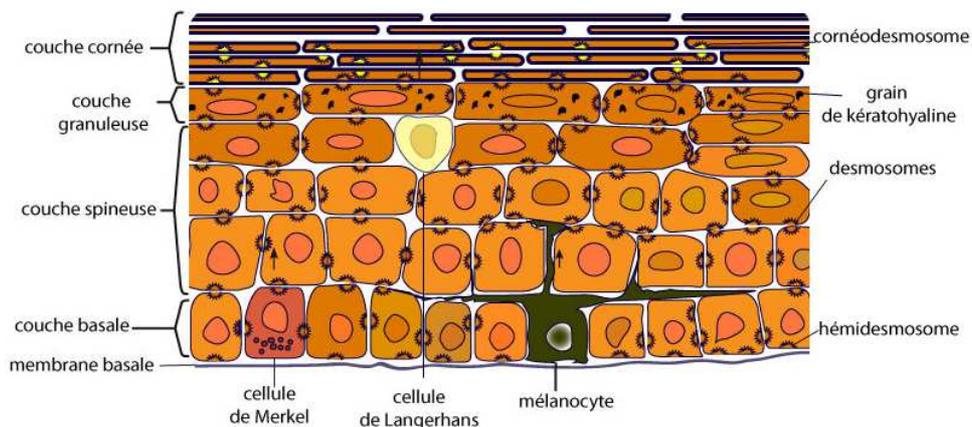


Schéma 8 : Représentation d'une coupe transversale de l'épiderme humain

(d'après <http://www.biologiedelapeau.fr>)

Contexte bibliographique

A l'instar des cellules épithéliales de la cornée pour les yeux, les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont les cibles principales de l'ypérite dans la peau. Ils sont ancrés à la membrane basale qui constitue la séparation entre le derme et l'épiderme (Schéma 8). En ciblant préférentiellement les kératinocytes de la couche basale, l'ypérite favorise leur destruction, d'où la séparation de l'épiderme et du derme et par suite la formation des phlyctènes. Les vésicules les plus importantes se rompent et conduisent à des nécroses (Photo 4) et des ulcérations. Outre la formation d'érythèmes et de vésicules, lésions caractéristiques d'une exposition au gaz moutarde (Momeni *et al.*, 1992; Smith and Dunn, 1991), celui-ci est également responsable de la formation de plages d'hyperpigmentation et/ou d'hypopigmentation (Ghanei *et al.*, 2010; Naraghi *et al.*, 2005). Ces changements de pigmentations sont à mettre en relation directe avec les effets de l'ypérite sur les mélanocytes. Une destruction de ces derniers entraîne la formation de plages d'hypopigmentation. En l'absence de destruction des mélanocytes, l'hyperpigmentation prévaut (Photo 4) (Emadi *et al.*, 2008a).



Photo 4 : Symptômes cutanés caractéristiques d'une exposition à l'ypérite

Erythème (en haut à gauche), phlyctènes (en haut à droite), plage d'hyperpigmentation (en bas à gauche) et nécrose (en bas à droite) (d'après Willems, 89).

3.6.1.3. Appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est, comme les yeux, essentiellement touché après une exposition vapeur à l'ypérite. Après l'irritation oculaire, le plus grand inconfort lié à une exposition au gaz moutarde résulte des lésions occasionnées au niveau de l'appareil respiratoire (Balali-Mood and Hefazi, 2005a). Dans la mesure où le taux de respiration influe directement sur la dose d'ypérite inhalée, il est difficile de corrélérer précisément les symptômes observés au niveau de l'appareil respiratoire à la concentration de gaz moutarde présent dans l'environnement (Kehe and Szinicz, 2005). Les premiers symptômes observés 4 à 16 h post-exposition sont les suivants: irritation de la muqueuse nasale, dysphonie (enrouement), éternuement et maux de gorge. Pour des doses d'exposition plus importantes, perte de l'odorat et du goût, toux douloureuse et productive, bronchospasme (contraction involontaire des bronches) et obstruction des bronches ont été relevés. Enfin, pour des expositions sévères, on note une nécrose de l'épithélium respiratoire, des difficultés respiratoires (dyspnée) et la formation d'œdèmes pulmonaires (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Kehe and Szinicz, 2005).

3.6.1.4. Toxicité systémique

Du fait de ses propriétés lipophiles, l'ypérite est capable de traverser la barrière cutanée. En effet, il a été rapporté qu'après une exposition liquide à l'ypérite en conditions non occlusive, 80% de la dose appliquée était évaporée. Sur les 20% restant, seul 10 à 15% restent fixés au niveau de la peau, les autres 85 à 90% rejoignant la circulation générale (Chilcott *et al.*, 2000; Cullumbine, 1947). Une fois dans le sang, l'ypérite est alors capable d'exercer ses effets toxiques au niveau d'autres cibles.

C'est le cas par exemple du tractus gastro-intestinal. Il a en effet été noté chez certaines victimes iraniennes d'une exposition au gaz moutarde des symptômes tels que nausée, vomissement, anorexie, douleur abdominale et diarrhée (Balali-Mood and Hefazi, 2005a). Toutefois, dans les 24 h suivant l'exposition, ces symptômes ne seraient pas dus à un endommagement de la muqueuse gastro-intestinale mais plutôt à l'activité cholinergique de l'ypérite ou à son odeur désagréable (Somani and Babu, 1989). Les nausées et vomissements persistant au-delà de 24 h seraient, quant à eux, initiés par la dégradation de cette muqueuse.

Les cellules prolifératives de la moelle osseuse constituent également une des cibles du gaz moutarde. Dans les premiers jours, une augmentation des globules blancs (ou

leucocytose) est observée puis leur nombre diminue rapidement (leucopénie) à partir du 3-4^{ème} jour post-exposition pour atteindre un minimum au bout du 9^{ème} jour (Balali-Mood and Hefazi, 2006). Une leucopénie sévère est un mauvais pronostic. En effet, il a été remarqué que toutes les victimes iraniennes ayant un taux de globule blancs inférieur à 200 cellules/mL décédaient (Willems, 1989).

Après des doses d'exposition sévères, le système nerveux central peut être aussi atteint par l'ypérite avec notamment des symptômes tels que maux de tête, anxiété, apathie, dépression et léthargie (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Hurst and Smith, 2007). Pour quelques cas, il a été observé des convulsions rappelant une crise d'épilepsie (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Dacre and Goldman, 1996).

3.6.2. Toxicité à long terme ou toxicité chronique

3.6.2.1. Yeux

Plusieurs semaines après une exposition à l'ypérite, on observe une atténuation des symptômes au niveau des yeux chez la plupart des victimes (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Kehe and Szinicz, 2005; Rowell *et al.*, 2009). Pour certains d'entre eux, comme la douleur intense et le blépharospasme, une atténuation spontanée et graduelle a été observée dès 48h post-exposition avec une régénération complète de l'épithélium de la cornée en 4 à 5 jours (Balali-Mood and Hefazi, 2005a).

Une opacité de la cornée peut toutefois perdurer sans qu'elle ne perturbe la vision (Khateri *et al.*, 2003; Solberg *et al.*, 1997). Cela a été démontré notamment chez des blessés iraniens reçus dans des hôpitaux Munichois 6 à 17 jours post-exposition. Après hospitalisation, 36% de ces victimes n'avaient plus aucun symptômes et 45% avaient une opacité persistante mais tous avaient une vue normale (Kehe *et al.*, 2009). D'autres symptômes peuvent également perdurer lorsque la cornée est plus sévèrement atteinte (Rowell *et al.*, 2009). Une étude a été menée par Khateri *et al.* sur 34000 vétérans iraniens de la guerre Iran-Irak 13 à 20 ans après leur exposition (Khateri *et al.*, 2003). Cette étude montre que sur ces 34000 vétérans, 20638 (60.7%) n'ont aucune lésion, 11900 (35%) ont des lésions légères, 1224 (3.6%) ont des lésions modérées qui incluent une implication de la cornée et 238 (0.7%) ont des lésions sévères. Parmi ces dernières, on note la vascularisation de la cornée qui est normalement

Contexte bibliographique

avasculaire (Photo 5). Une autre étude a été conduite par Balali-Mood *et al.* sur 40 vétérans iraniens sévèrement exposés à l'ypérite (Balali-Mood *et al.*, 2005). Les symptômes les plus couramment retrouvés chez ces 40 victimes sont une conjonctivite chronique, une hyperpigmentation périlimbique, un amincissement de la cornée ainsi que son opacité. En outre, il a été décrit chez moins de 1% des vétérans de la première guerre mondiale et des vétérans iraniens, une ulcération de la cornée 15-20 ans voire 40 ans après l'exposition sans que celle-ci ne donne lieu à des manifestations cliniques aiguës. Après une latence de plusieurs années, l'ulcération retardée de la cornée qui peut aboutir à la cécité se développe avec comme premiers symptômes un larmoiement intense, une vision diminuée et une photophobie (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Etezzad-Razavi *et al.*, 2006; Ghasemi *et al.*, 2012; Rowell *et al.*, 2009; Solberg *et al.*, 1997).

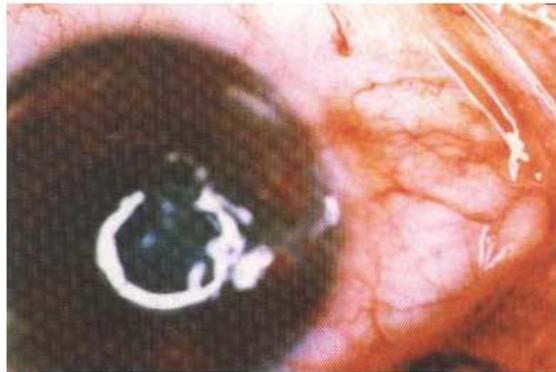


Photo 5 : Opacification et vascularisation retardées de la cornée après une exposition à l'ypérite

(d'après Balali-Mood *et al.*, 2005)

3.6.2.2. Peau

La persistance des lésions au niveau de la peau après une exposition au gaz moutarde dépend directement de la durée et de la sévérité de l'exposition. En effet, si les symptômes occasionnés par l'exposition ne sont pas accompagnés de la formation de phlyctènes, ils s'atténueront jusqu'à complètement disparaître (Chiesman, 1944). En revanche, si les symptômes dus à l'exposition s'accompagnent de la formation de vésicules et de nécrose, il y aura des effets résiduels permanents (Balali-Mood and Hefazi, 2005a; Ghasemi *et al.*, 2013; Rowell *et al.*, 2009). Sur les 34000 Iraniens examinés par Khateri *et al.*, 25670 vétérans (75.5%) n'ont montré aucune lésion, 7820 (23%) des lésions légères et 510 (1.5%) des lésions

Contexte bibliographique

modérés (Khateri *et al.*, 2003). Aucun n'a développé de lésions sévères. Parmi les lésions légères, on retrouve entre autres une démangeaison avec sensation de brûlure sans manifestation clinique, un eczéma limité, une peau sèche et des lésions vasculaires localisées. En ce qui concerne les lésions modérées, ont notamment été relevés une hypo- et/ou une hyperpigmentation recouvrant plus de 18% de la surface corporelle, des démangeaisons généralisées avec manifestation clinique, des lésions vasculaires généralisées et récurrentes ainsi qu'un eczéma sévère et diffus (Khateri *et al.*, 2003). Balali-Mood *et al.* ont montré que chez 40 Iraniens sévèrement exposés, les symptômes à long terme les plus courants étaient dans l'ordre : hyperpigmentation, zones érythémateuses, peau sèche, angiome cerise, atrophie, hypopigmentation et hypertrophie (Balali-Mood *et al.*, 2005). Ces symptômes ont été majoritairement retrouvés au niveau des zones génitales, du dos, de l'abdomen, de l'aîne, des aisselles, de la tête et du cou. L'hyperpigmentation a également été mise en évidence dans d'autres études sur plusieurs cohortes de vétérans iraniens (Davoudi *et al.*, 2009; Emadi *et al.*, 2008b; Moin *et al.*, 2009; Shohrati *et al.*, 2007). Bien qu'en proportion moins retrouvée, l'hypopigmentation se développe souvent près des zones hyperpigmentées. Ces changements de pigmentation de la peau sont en relation avec le degré d'atteinte des mélanocytes, l'hypopigmentation étant plus fréquente après une exposition à une forte dose d'ypérite (Naraghi *et al.*, 2005; Rowell *et al.*, 2009).

3.6.2.3. Appareil respiratoire

Les problèmes respiratoires constituent la cause majeure de morbidité et d'handicap à long terme suite à une exposition à l'ypérite (Aghanouri *et al.*, 2004; Balali-Mood and Hefazi, 2006; Ghanei and Harandi, 2011; Rowell *et al.*, 2009). Sur les 34000 vétérans examinés par Khateri *et al.*, les lésions pulmonaires représentent les dommages à long terme les plus fréquemment retrouvés (Khateri *et al.*, 2003). En effet, 42.5% de ces 34000 victimes souffrent 13 à 20 ans après exposition de lésions pulmonaires contre 39.3% et 24.5% pour les yeux et la peau, respectivement. Chez 197 vétérans victimes d'une seule exposition à l'ypérite, les symptômes observés 10 ans après sont une bronchite chronique (58%), une fibrose pulmonaire (12%), de l'asthme (10%) et une bronchiectasie (dilatation des bronches) (8%) (Emad and Rezaian, 1997). Seize à 20 ans post-exposition, les principales manifestations cliniques relevées chez 40 vétérans iraniens sévèrement exposés sont une maladie pulmonaire obstructive chronique (35%), une bronchiectasie, de l'asthme (25%), une fibrose

Contexte bibliographique

pulmonaire (7.5%) et une bronchite chronique (5%) (Hefazi *et al.*, 2005). De plus, il a été rapporté, toujours chez des vétérans iraniens, que même après une légère exposition à l'ypérite sans signe clinique immédiat, il était possible de développer des lésions pulmonaires à long terme (Ghanei *et al.*, 2004).

Le développement de cancers fait également parti des effets à long terme exercés par l'ypérite. Celui-ci sera discutée plus tard (voir p.91).

3.6.3. Prise en charge des victimes d'une exposition à l'ypérite

La prise en charge thérapeutique des victimes d'une exposition au gaz moutarde est essentiellement symptomatique (Smith *et al.*, 1995b).

3.6.3.1. Peau

Parmi les soins à apporter à un blessé, le plus important est de décontaminer les zones touchées le plus rapidement possible. En effet, l'ypérite, du fait de ses propriétés lipophiles, traverse rapidement la barrière cutanée et se fixe irrémédiablement pour une partie dans la peau pour y exercer ses effets délétères (Cullumbine, 1947). La décontamination n'est donc efficace que si elle est réalisée dans les 3 à 5 min suivant l'exposition (Dacre and Goldman, 1996; Kehe and Szinicz, 2005).

Toutefois, un des problèmes majeurs posé par l'exposition au gaz moutarde est que celui-ci ne provoque aucune douleur et que les premiers symptômes ne se font ressentir qu'après quelques heures. Une décontamination plus tardive servira tout de même à enlever d'éventuels reliquats d'ypérite et à protéger le personnel médical. Il n'existe pas de procédure de décontamination universelle qui soit efficace et sûre (Dacre and Goldman, 1996).

La décontamination peut être effectuée de différentes manières : avec de l'eau savonneuse, de l'hypochlorite (0.5%) ou encore avec des décontaminants développés pour les militaires comme la terre à Foulon (TAF, armée française) ou la RDSL (« reactive skin decontaminant lotion », armée canadienne) (ANSM, 2010; Dacre and Goldman, 1996; Kehe and Szinicz, 2005; Smith *et al.*, 1995b; Taysse *et al.*, 2007; Taysse *et al.*, 2011). La TAF est contenue dans un gant et permet une décontamination par voie sèche de l'ypérite diminuant

Contexte bibliographique

ainsi sa pénétration cutanée (Taysse *et al.*, 2007; Taysse *et al.*, 2011). Il a été montré que le dispositif canadien, qui associe une décontamination physique au moyen d'une éponge et une décontamination chimique à l'aide de la RDSL, était plus efficace que la TAF (Taysse *et al.*, 2007; Taysse *et al.*, 2011). L'utilisation limitée d'eau n'est pas recommandée car en sa présence, l'absorption de l'ypérite est augmentée (Kehe and Szinicz, 2005). Il a été cependant observé qu'avec des quantités importantes et des lavages prolongés, la décontamination à l'eau était efficace (Momeni *et al.*, 1992).

Outre la décontamination de la peau, un des grands principes de la prise en charge médicale des lésions cutanées générées par l'ypérite est d'assurer le confort du patient. Pour cela, les douleurs provoquées par les brûlures sont atténuées par la prise d'analgésiques et/ou de narcotiques (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Smith *et al.*, 1995b). La prise d'antihistaminiques permet de diminuer les démangeaisons et pour soigner les érythèmes, des corticostéroïdes sont employés (Balali-Mood and Hefazi, 2006). Le dernier principe de la prise en charge thérapeutique des victimes de l'ypérite consiste à prévenir la survenue d'infections secondaires notamment par la prescription d'antibiotiques (Kehe and Szinicz, 2005; Smith *et al.*, 1995b). Il est de plus conseillé de procéder à la détersion des petites vésicules (taille inférieure à 2 cm) une fois rompues. Cette dernière, qui consiste à éliminer les débris nécrotiques, facilite la cicatrisation (Boudana *et al.*, 2010; Evison *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2008). Pour les vésicules dont la taille est supérieure à 2 cm, il est recommandé avant de les ouvrir et de les débrider d'aspirer le fluide qu'elles contiennent (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Kehe and Szinicz, 2005).

3.6.3.2. Yeux

Au niveau des yeux, la décontamination rapide est indispensable pour diminuer les symptômes qu'induit l'ypérite. Elle peut être réalisée avec de l'eau, une solution saline (0.9%) ou encore avec une solution de bicarbonate de sodium (1.5%) (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Kehe and Szinicz, 2005; Smith *et al.*, 1995b). Pour traiter les lésions légères, les yeux sont lavés plusieurs fois par jour à l'aide d'une solution de lavage oculaire. Pour éviter que les paupières ne soient collées entre elles et favoriser le drainage du liquide lacrymal, la vaseline est employée. Pour des lésions modérées, l'utilisation de corticostéroïdes peut se révéler utile. La prise d'antibiotiques prévient la formation de synéchies (adhérence cicatricielle de deux

surfaces ulcérées). La transplantation de la cornée est pratiquée pour traiter les kératopathies retardées (Solberg *et al.*, 1997).

3.6.3.3. Appareil respiratoire

En ce qui concerne les symptômes de l'appareil respiratoire, ventilation assistée et oxygène constituent la base de la prise en charge thérapeutique (Willems, 1989). Afin de soulager enrrouement, toux non productive et irritation pharyngée, antitussif et inhalateur sont utilisés (Smith *et al.*, 1995b). L'humidification de l'air peut également soulager ces symptômes (Kehe and Szinicz, 2005). Dans le but d'éviter les infections secondaires telles que les infections bronchiques, des antibiotiques sont prescrits (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Kehe and Szinicz, 2005; Smith *et al.*, 1995b). Le bronchospasme est soigné à l'aide de bronchodilatateurs et s'ils se révèlent inefficaces, l'emploi de corticostéroïdes peut être envisagé (Smith *et al.*, 1995b). Ces derniers peuvent également prévenir la formation d'œdèmes pulmonaires (Balali-Mood and Hefazi, 2006).

Les mécanismes d'action par lesquels l'ypérite engendre les symptômes décrits ci-dessus ne sont toujours pas élucidés. Néanmoins, plusieurs évènements au niveau moléculaire ainsi que différentes voies de signalisation cellulaire ont été mises en évidence comme étant impliqués dans la toxicité induite par l'ypérite.

III. Mécanismes à l'origine de la toxicité de l'ypérite

Les hypothèses mécanistiques émises pour tenter d'expliquer la toxicité de l'ypérite ont toutes une origine commune, à savoir la réaction avec les biomolécules d'un ion épisulfonium résultant de la cyclisation de l'ypérite en présence d'eau (Schéma 9).

L'ion épisulfonium constitue une espèce électrophile et sous cette forme, l'ypérite est alors capable d'interagir avec les groupements nucléophiles rencontrés dans de nombreux constituants cellulaires comme ceux des protéines, du glutathion, de l'acide ribonucléique (ARN) ou encore de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

Contexte bibliographique

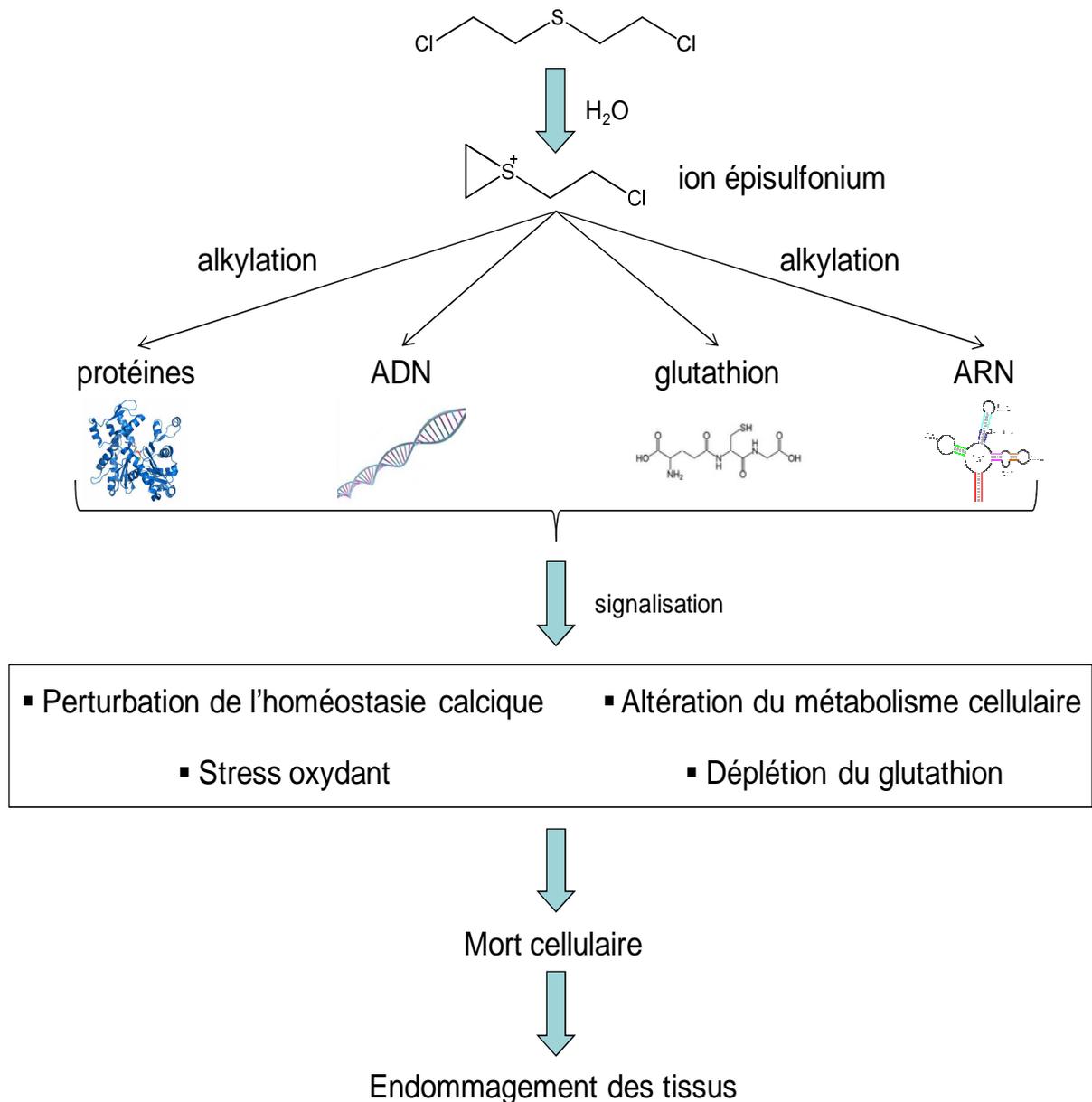


Schéma 9 : Hypothèse mécanistique la plus communément admise pour expliquer la toxicité de l'ypérite, l'alkylation multi-cibles

Ces interactions correspondent à des réactions d'alkylation, c'est-à-dire que l'ypérite va venir s'ajouter à ces différentes molécules. Le gaz moutarde est à ce titre un puissant agent alkylant. A l'heure actuelle, c'est ce processus d'alkylation multi-cibles qui est l'hypothèse la plus communément admise pour tenter d'expliquer les effets toxiques de l'ypérite (Kehe and Szinicz, 2005). Celui-ci aboutit notamment à la déplétion du glutathion, à la perturbation de l'homéostasie calcique, à la genèse d'un stress oxydant et à l'altération du métabolisme cellulaire (Balali-Mood and Hefazi, 2005b; Ghanei and Harandi, 2011; Kehe *et*

al., 2009; Papirmeister *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1995b). Tous ces événements sont plus ou moins liés entre eux. Ils concourent tous à la mort cellulaire et par suite à l'endommagement des tissus.

1. Déplétion du glutathion

1.1. Glutathion: généralités

Le glutathion est l'antioxydant de faible poids moléculaire le plus abondant dans les cellules (Forman *et al.*, 2009). C'est un tripeptide composé de résidus glutamate, cystéine et glycine (Schéma 10). La plupart du glutathion cellulaire se trouve sous forme libre dans le cytoplasme (85 à 90%), le restant étant compartimenté essentiellement dans les mitochondries, le noyau et les peroxysomes (Wu *et al.*, 2004). Il existe deux formes de glutathion, la forme réduite (notée GSH) et la forme oxydée (notée GSSG). Cette dernière est issue de la formation d'une liaison covalente entre deux molécules de glutathion réduit en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'espèces réactives de l'azote (ERA). En outre, une partie non négligeable du glutathion cellulaire est liée aux protéines via la formation de liaisons covalentes avec les résidus cystéine (Sies, 1999). Le ratio GSH/GSSG constitue un bon indicateur de l'état d'oxydoréduction de la cellule. Dans des conditions physiologiques normales, ce ratio est supérieur à 10 (Griffith, 1999).

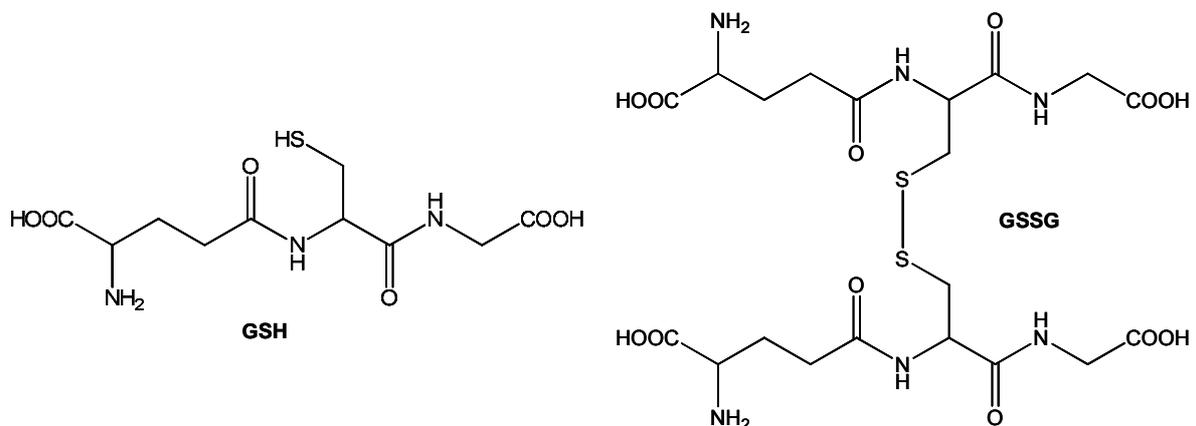


Schéma 10 : Structures chimiques des formes réduite et oxydée du glutathion

1.2. Glutathion: synthèse

La synthèse du glutathion à partir de glutamate, de cystéine et de glycine est catalysée séquentiellement par la γ -glutamylcystéine synthase (γ -GCS) et la glutathion synthase, deux enzymes cytoplasmiques (Schéma 11). Comme son nom l'indique la γ -GCS catalyse la formation du dipeptide γ -glutamylcystéine, le groupe γ -carboxyle du glutamate réagissant avec le groupement amine de la cystéine. La formation de la liaison peptidique γ entre le glutamate et la cystéine protège le GSH de l'hydrolyse par les peptidases intracellulaires (Wu *et al.*, 2004). Une fois le dipeptide γ -glutamylcystéine formé, il peut être utilisé dans la synthèse du glutathion par la GSH synthase mais aussi dans celle de la 5-oxo-L-proline, avec libération de cystéine, par la γ -glutamylcyclotransférase. Du fait d'une plus grande affinité et d'une plus grande activité de la glutathion synthase, plus de 95% de la glutamylcystéine est transformée en GSH (Griffith, 1999). La synthèse du GSH peut se dérouler dans tous les tissus mais le foie est celui qui en produit le plus (Wu *et al.*, 2004). En effet, dans la plupart des cellules la concentration en glutathion est de 1 à 2 mM alors que dans les hépatocytes elle peut atteindre 10 mM (Forman *et al.*, 2009). Trois facteurs au moins régulent la synthèse de glutathion *de novo*, à savoir le taux de γ -GCS cellulaire, la disponibilité en acides aminés précurseurs et le rétrocontrôle négatif exercé par le GSH sur la γ -GCS. Pour ce qui est des précurseurs, la disponibilité en cystéine est généralement limitante au cours de la synthèse du glutathion (Tateishi *et al.*, 1974).

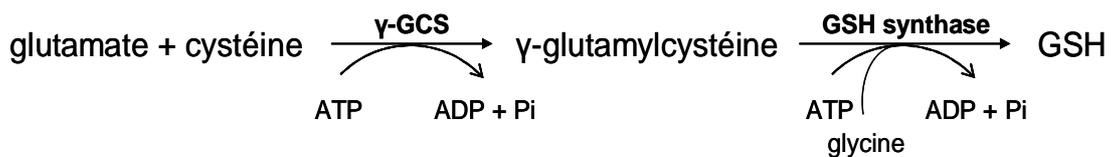


Schéma 11 : Synthèse du GSH en deux étapes par la γ -GCS et la GSH synthase

1.3. Glutathion : rôles

Le GSH est impliqué dans la protection des macromolécules (lipides, protéines, ADN) contre les dommages oxydatifs grâce à sa capacité à piéger les ERO et les ERA. Ce piégeage peut être réalisé de manière directe ou indirecte via l'action d'enzymes comme celle des glutathion peroxydases (Gpx) (Wu *et al.*, 2004). Ces dernières catalysent entre autres la

Contexte bibliographique

réduction du peroxyde d'hydrogène en eau. Le glutathion est alors oxydé en GSSG qui est à son tour réduit par la glutathion réductase (GR), ce qui permet de maintenir le ratio GSH/GSSG constant (Schéma 12).

Le GSH, en plus d'être un des antioxydants cellulaires les plus importants, est également un détoxifiant. Il est capable en effet de réagir avec différents xénobiotiques, ce qui diminue leur cytotoxicité. Cette réaction, appelée conjugaison, est réalisée au niveau du groupement thiol du résidu cystéine. La conjugaison du glutathion aux xénobiotiques est assurée par les glutathion-S-transférases (GST) qui correspondent à des enzymes de la phase II de la métabolisation des xénobiotiques. Les enzymes de phase II permettent le greffage de molécules endogènes hydrophiles (glutathion, sulfate, acide glucuronique) afin de favoriser l'élimination des xénobiotiques hors de la cellule, celle-ci étant réalisée par les enzymes de phase III. Les enzymes de phase I, quant à elles, ont pour rôle de solubiliser les xénobiotiques lipophiles par modification chimique. Il a été par exemple observé que le GSH participait à la détoxification des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de l'aflatoxine B1 (mycotoxine cancérigène) ou de certaines amines hétérocycliques également cancérigènes (Zhao *et al.*, 2011).

Découlant de ses propriétés antioxydantes, le GSH est en outre impliqué dans différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, la transduction du signal, le métabolisme ou encore la synthèse de médiateurs de l'inflammation (Sies, 1999; Vivancos *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2011).

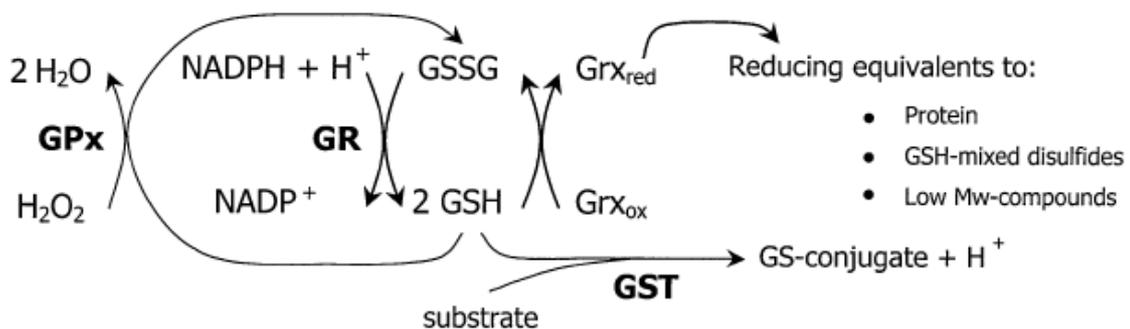


Schéma 12 : Les différents rôles du GSH

(d'après Nordberg, 2001)

1.4. Déplétion du glutathion par l'ypérite

Etant impliqué dans la détoxification des agents électrophiles, le GSH est capable d'interagir avec l'ypérite sous sa forme ion épisulfonium. Il a en effet été démontré que le GSH formait des conjugués avec le gaz moutarde chez la levure et que ceux-ci pouvaient dépasser 50% de produits de métabolisation de l'ypérite (Kinsey and Grant, 1947). En utilisant de l'ypérite marquée, Davison *et al.* ont mis en évidence chez des rongeurs qu'une grande partie du gaz moutarde réagissait quasi immédiatement avec le GSH (Davison *et al.*, 1961). Ces résultats ont été confirmés par Black *et al.*. Ces derniers ont montré qu'après injection intra-péritonéale d'ypérite chez des rats, 60% de la dose était excrétée 24 h après exposition dans les urines et que parmi les métabolites retrouvés, la majeure partie était issue de la conjugaison initiale avec le GSH (Black *et al.*, 1992a). Ces mêmes chercheurs ont également étudié les produits de la métabolisation de l'ypérite, toujours dans des urines de rats, après une exposition cutanée. Là, les métabolites issus de la conjugaison avec le GSH représentaient 2.5 à 5.3% de la dose d'exposition (Black *et al.*, 1992b). La conjugaison au GSH du gaz moutarde et de son analogue monofonctionnel, le chloroethyl ethyl sulfide (CEES), peut également être médiée par l'action des GST (Abel *et al.*, 2011).

De nombreuses études mettent en évidence la déplétion du GSH suite à sa conjugaison à l'ypérite *in vitro*. La déplétion du glutathion a été observée dans des lymphocytes humains exposés à l'ypérite ou au CEES (Gross *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1993; Han *et al.*, 2004). Dans des cellules de neuroblastomes murins, elle est de 20% et 34% après exposition à 300 μM d'ypérite pendant 1 h et 6 h, respectivement (Ray *et al.*, 1995). La déplétion du GSH atteint 15% 2h après exposition dans des macrophages de souris exposés à 200 μM de gaz moutarde (Amir *et al.*, 1998). Elle a de plus été notée dans des lignées cellulaires humaine et murine de peau (Tewari-Singh *et al.*, 2011).

In vivo, la déplétion du GSH a été visualisée dans le sang (Pant *et al.*, 2000), le foie (Gautam *et al.*, 2007; Jafari, 2007; Kumar *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2000; Pohanka *et al.*, 2013; Vijayaraghavan *et al.*, 2008), les poumons (Kumar *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2000), les reins (Pohanka *et al.*, 2013), le cerveau (Jafari, 2007) et les muscles (Pohanka *et al.*, 2013) après exposition d'ypérite vapeur (inhalation et percutanée) et liquide (intra-péritonéale et percutanée). En outre, il a été observé que le taux de glutathion baissait de 3.28 à 1.29 pmol/ μg dans la peau de souris sans poils SKH-1 exposée à 2 mg de CEES (Tewari-Singh *et al.*, 2011).

Contexte bibliographique

Shohrati *et al.* ont montré une diminution de la concentration du glutathion sanguin chez des vétérans de la guerre Iran-Irak ayant été exposés une seule fois à une forte dose de gaz moutarde. Cette étude a été conduite sur 250 victimes souffrant de lésions pulmonaires qui ont été séparées en deux groupes en fonction de la sévérité de leurs lésions (lésions légères et lésions modérées à sévères). Un groupe de 60 Iraniens en bonne santé a servi de contrôle. Le taux de glutathion sanguin mesuré dans le groupe contrôle est de $29.85 \pm 3.26 \mu\text{mol/mL}$. Il chute respectivement à 19.02 ± 2.36 et 17.89 ± 2.16 chez les groupes « lésions pulmonaires légères » et « lésions pulmonaires modérées à sévères » (Shohrati *et al.*, 2010).

Outre la déplétion du glutathion, l'ypérite peut également altérer l'activité de différentes enzymes qui en ont besoin pour exercer leurs fonctions. C'est le cas par exemple de la GST dont l'activité est augmentée dans les muscles de rats exposés par voie cutanée à des doses d'ypérite variant entre 0 et 160 mg/kg (Pohanka *et al.*, 2013). La même observation a été réalisée dans le foie de rats exposés par voie intra-péritonéale à des doses d'ypérite inférieures à 10 mg/kg. En revanche, lorsque les doses d'exposition dépassent les 10 mg/kg, l'activité de la GST diminue dans le foie et le cerveau (Jafari, 2007). Pour ces dernières doses, Jafari a également observé une diminution de l'activité GPx aussi bien dans le foie que dans le cerveau (Jafari, 2007). Celle-ci a aussi été relevée par Vijayaraghavan *et al.* dans le foie de souris exposées par voie cutanée (Vijayaraghavan *et al.*, 2008). Avec le même type d'exposition, Husain *et al.* ont, de plus, montré une diminution d'activité GPx dans le foie, la rate et les leucocytes de rats (Husain *et al.*, 1996). L'activité GR a été trouvée, quant à elle, augmentée dans les muscles pour une dose d'exposition de 160 mg/kg mais inchangée dans le foie et les reins par Pohanka *et al.* (Pohanka *et al.*, 2013). D'autres études montrent au contraire une diminution de l'activité GR dans le foie (Gautam and Vijayaraghavan, 2007; Jafari, 2007; Vijayaraghavan *et al.*, 2008).

La déplétion du glutathion ainsi que l'altération des activités GST, GPx et GR par l'ypérite sont à l'origine de la diminution du ratio GSH/GSSG. Or ce ratio est très important pour le maintien de l'équilibre oxydoréducteur de la cellule. Sa diminution va donc entraîner un déséquilibre de la balance oxydoréductrice qui va être à son tour à l'origine d'une perte des groupements thiols protéiques et par suite à la perturbation de l'homéostasie calcique cellulaire. Ce déséquilibre va, de plus, être impliqué dans l'induction d'un stress oxydant.

2. Perturbation de l'homéostasie calcique

2.1. Calcium : généralités

A l'intérieur des cellules, la concentration en calcium est d'environ 100 nmol/L (Clapham, 1995). Elle est 10000 fois moins importante que celle retrouvée dans le milieu extracellulaire. L'homéostasie calcique intracellulaire est assurée par des mécanismes de stockage et de pompage. Le calcium est essentiellement stocké dans le réticulum endoplasmique (RE) où il est séquestré en concentration importante par des protéines telles que la calséquestrine et la calréticuline (Clapham, 1995). La concentration en calcium dans le RE est approximativement de 100 $\mu\text{mol/L}$, soit 1000 fois plus élevée que dans le cytoplasme (Berridge *et al.*, 2000). Le stockage du calcium dans le RE est la résultante d'un pompage actif, consommateur d'adénosine triphosphate (ATP), réalisé par les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Le calcium peut aussi être stocké dans une moindre mesure dans les mitochondries. Le pompage du calcium vers le milieu extracellulaire est également consommateur d'énergie et est effectué par les pompes PMCA (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase).

2.2. Calcium : rôles

Le calcium est impliqué dans de très nombreuses fonctions telles que la contraction musculaire ou la propagation de l'influx nerveux. Ces fonctions sont notamment assurés par son rôle dans la transduction du signal une fois sa concentration cytosolique augmentée. Le mécanisme d'action du calcium dans les voies de signalisation peut être décomposé en quatre phases (Schéma 13) (Berridge *et al.*, 2000). La première phase concerne le signal déclenché par un stimulus générant la mobilisation du calcium. En réponse à ce stimulus, il y a accumulation du calcium dans le cytoplasme jusqu'à 10 fois sa concentration initiale, ce qui constitue la deuxième phase appelée « ON mechanisms ». La troisième phase est marquée par l'action du calcium en tant que messenger sur de multiples processus calcium dépendant. Enfin, la quatrième phase constitue la phase de retour à l'équilibre avec la diminution de la concentration calcique cytoplasmique. Elle est appelée « OFF mechanisms ». Via la transduction du signal, le calcium agit sur de nombreuses fonctions cellulaires comme la

différentiation, la prolifération, l'activation de facteurs de transcriptions ou encore la mort cellulaire (Berridge *et al.*, 2000).

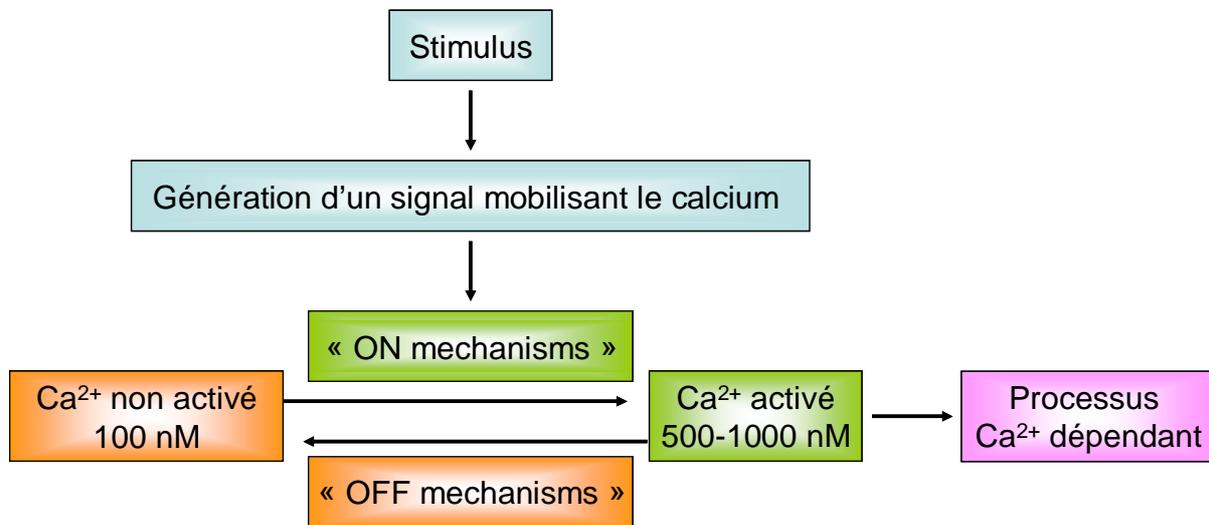


Schéma 13 : Mécanisme d'action du calcium dans la transduction du signal cellulaire
(adapté de Berridge *et al.*, 2000)

2.3. Perturbation de l'homéostasie calcique par l'ypérite

Orrenius et Nicotera ont proposé dans les années 80 une hypothèse mécanistique pour expliquer la toxicité de différents composés (Orrenius and Nicotera, 1987). Cette hypothèse a pour point de départ la déplétion du glutathion qui va générer une perte des groupements thiols protéiques. Parmi les protéines dont l'action est inhibée par la perte de leurs groupements thiols, on retrouve les pompes à calcium du RE (Bellomo *et al.*, 1983). Leur inhibition entraîne la libération dans le cytoplasme du calcium stocké, d'où la perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Cette dernière serait alors impliquée dans la cytotoxicité. De nombreuses études ont confirmé l'importance de l'altération de l'homéostasie calcique dans la toxicité cellulaire (Berridge *et al.*, 2000; Clapham, 1995; Nicotera *et al.*, 1992; Orrenius *et al.*, 2003; Reed, 1990; Trump *et al.*, 1989) qui est médiée notamment par l'activation de protéases (Sawyer and Hamilton, 2000; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2006), d'endonucléases (Jones *et al.*, 1989; Shiokawa *et al.*, 1994) et de phospholipases (Orrenius *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 1995). Ces activations ont pour conséquence respectivement la dégradation des protéines, l'endommagement de l'ADN et la perte de l'intégrité membranaire (Schéma 14).

Contexte bibliographique

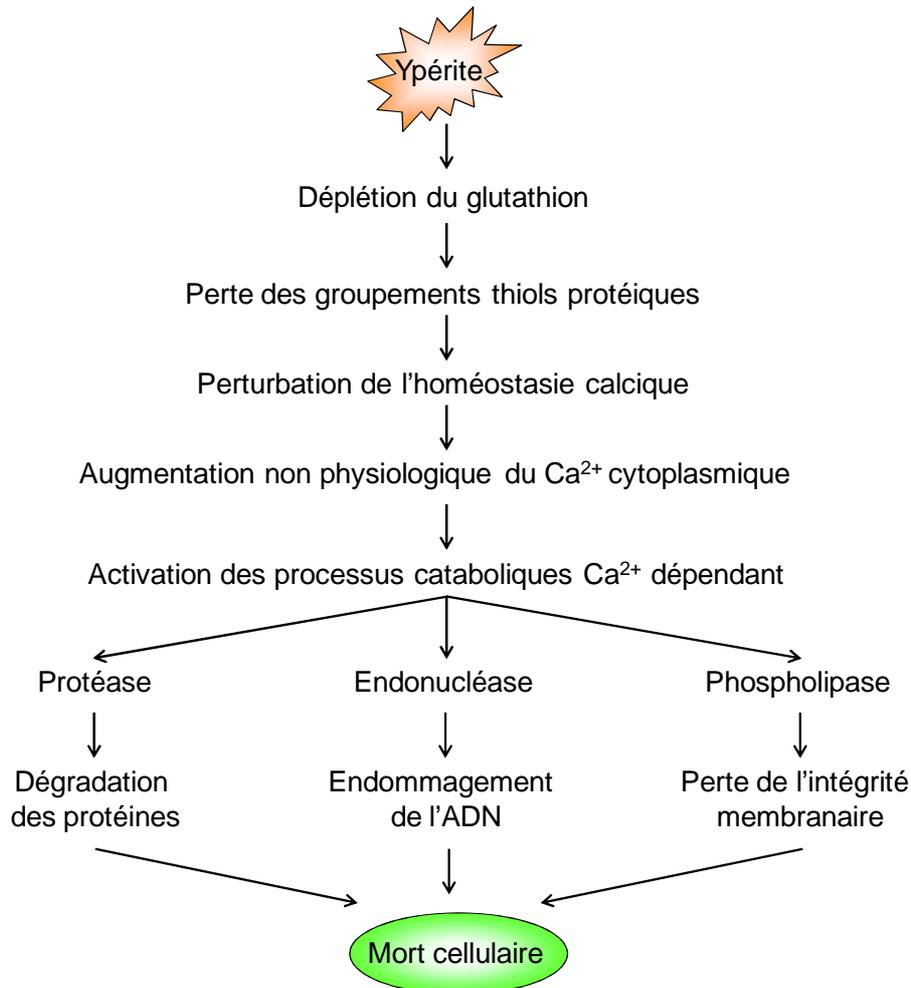


Schéma 14 : Conséquences de la perturbation de l'homéostasie calcique

Une autre conséquence importante de la déplétion du glutathion par l'ypérite est l'induction d'un stress oxydant.

L'augmentation de la concentration du calcium cytosolique ($[Ca^{2+}]_c$) faisant suite à la déplétion du glutathion induite par l'ypérite a été mise en évidence dans différents modèles. Elle a été, par exemple, observée dans des fibroblastes de souris (Hua *et al.*, 1993). Dans ce modèle, un effet dose-dépendant sur la $[Ca^{2+}]_c$ a été visualisée et obtenue dès 5 à 10 min post-exposition. De plus, Hua *et al.* ont montré que cette augmentation était prolongée par rapport à celle générée par un ajout de sérum (Hua *et al.*, 1993). Contrairement à ces résultats, Mol et Smith, qui ont étudié les effets de l'ypérite sur la $[Ca^{2+}]_c$ dans des kératinocytes humains, n'ont pas obtenu de réponse dose-dépendante (Mol and Smith, 1996). En outre, aucune augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ n'a pas été observée durant les 20 premières min après exposition des cellules de 200 à 800 μ M d'ypérite. En utilisant le même modèle cellulaire, Hamilton *et al.* ont rapporté des résultats complètement différents (Hamilton *et al.*, 1998). En effet, ils ont

Contexte bibliographique

noté une augmentation irréversible de la $[Ca^{2+}]_c$ dès 1 min post-exposition et un maximum atteint 10 à 15 min après exposition. Celle-ci était dose-dépendante avec obtention d'un plateau à partir de 1 mM d'ypérite. Hamilton *et al.* ont de plus montré que l'élévation du taux de calcium cytosolique était due au déstockage du calcium contenu dans le RE et non à un afflux de calcium extracellulaire (Hamilton *et al.*, 1998). En effet, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ était toujours visible en l'absence de calcium dans le milieu de culture. En revanche, elle ne l'était plus après inhibition des pompes calciques ATPases du RE par la thapsigargine. L'accroissement de la $[Ca^{2+}]_c$ a également été observée dans des kératinocytes humains issus de prépuce de nouveau-nés (Sawyer and Hamilton, 2000) et dans des cellules de neuroblastomes murins (Ray *et al.*, 1995). Dans ces dernières, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ a été de l'ordre de 30% 2 à 6 h après exposition à des doses d'ypérite allant de 0.1 à 1.3 mM. Cette augmentation est modérée et est assez similaire à celle relevée dans les études décrites plus haut (Hamilton *et al.*, 1998; Hua *et al.*, 1993; Mol and Smith, 1996). Mol et Smith ont également étudié le taux de calcium cytoplasmique après exposition des cellules à l'ypérite et à des stimuli mobilisateurs de calcium que sont l'ATP et l'histamine (Mol and Smith, 1996). Ils ont ainsi noté que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ était plus faible de 40 à 60 % par rapport aux cellules contrôles, c'est-à-dire soumises aux stimuli ATP et histamine sans exposition à l'ypérite. Ces résultats combinés à l'augmentation modérée de la $[Ca^{2+}]_c$ ont conduit ces chercheurs à décrire cette dernière comme exerçant une perturbation de la physiologie cellulaire plutôt qu'une action cytotoxique aiguë. Par opposition, Hamilton *et al.* ont montré une association entre l'accroissement de la $[Ca^{2+}]_c$, même modérée, et la mort cellulaire (Hamilton *et al.*, 1998). Le lien entre mort cellulaire et augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ a été confirmée par l'emploi de chélateur de calcium comme l'acide 1,2-bis(0-aminophénoxy)éthane-N, N, N', N'-tétraacétique (BAPTA) (Rosenthal *et al.*, 2000; Rosenthal *et al.*, 1998). En effet, l'utilisation de ce dernier diminue l'expression des marqueurs de mort cellulaire (voir p.93) en prévenant l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$. La calmoduline est une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui lorsqu'elle est liée au calcium change de conformation. C'est sous cette forme complexée à la calmoduline que le calcium exerce bon nombre de ses fonctions comme celle de médiateur de la mort cellulaire (Pan *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1996). Le prétraitement de kératinocytes humains avec des inhibiteurs spécifiques de la calmoduline a aussi pour conséquence l'atténuation de la toxicité induite par le gaz moutarde (Rosenthal *et al.*, 2000; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2006). Trois gènes codent pour la calmoduline chez l'homme. Dans les kératinocytes, la forme prédominante est la calmoduline 1 (CAM1). L'inhibition de l'expression de CAM1 entraîne également la

diminution de la cytotoxicité initiée par l'exposition à l'ypérite (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2006). L'inhibition de la calcineurine, phosphatase activée par la calmoduline et impliquée dans la transduction du signal de mort cellulaire (Orrenius *et al.*, 2003), conduit de même à une moindre cytotoxicité du gaz moutarde, ce qui illustre l'implication d'une voie de signalisation calcium-calmoduline-calcineurine dans cette dernière (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2006).

3. Induction d'un stress oxydant

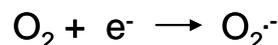
Dans des conditions physiologiques normales, l'état d'oxydoréduction de la cellule est défini par un équilibre entre espèces oxydantes et défenses antioxydantes.

3.1. Espèces oxydantes

Parmi les espèces oxydantes, on trouve les ERO. Celles-ci sont constituées de l'anion superoxyde (O_2^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($HO\cdot$). Comme leurs noms l'indiquent, les ERO dérivent de l'oxygène moléculaire. Celui-ci, provenant de la respiration et apporté au niveau des différentes cellules par les globules rouges sanguins, y est réduit en eau pour produire, avec la consommation de glucose notamment, de l'énergie. La réduction de l'oxygène moléculaire en eau est réalisée au niveau des chaînes de transporteurs d'électrons des membranes internes mitochondriales composées de 5 complexes notés de I à V. La majeure partie de l'oxygène respiré subit au niveau de ces chaînes une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

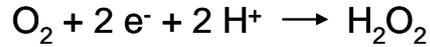


Une partie de cet oxygène, de 2 à 5%, peut toutefois être partiellement réduit et former O_2^- au niveau de la NADH déshydrogénase (complexe I) ou au niveau de l'ubiquinone (complexes II/III) (Gardès-Albert *et al.*, 2003; Tessier and Marconnet, 1995). De plus, O_2^- peut être aussi formé par l'action d'enzymes comme la NADPH oxydase qui catalyse l'oxydation du NADPH en $NADP^+$ en présence d'oxygène moléculaire (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

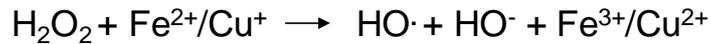


Contexte bibliographique

La production de H_2O_2 peut également être la résultante d'une réduction partielle de l'oxygène moléculaire. Il peut être, en outre, produit par la dismutation du $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou l'action d'enzymes comme la monoamine oxydase qui catalyse la désamination oxydative de certaines amines telle que la sérotonine qui agit en tant que neuromédiateur dans le cerveau.



Le H_2O_2 et le $\text{O}_2^{\cdot-}$ sont peu réactifs. En revanche, ils participent tous deux à la formation de HO^{\cdot} qui, lui, est très réactif (Nordberg and Arner, 2001). Le radical hydroxyle est formé à partir du H_2O_2 en présence de fer ferreux (Fe^{2+}) ou de cuivre (I), c'est la réaction de Fenton.



Le fer ferrique (Fe^{3+}) et le cuivre (II) (Cu^{2+}) formés lors de la réaction de Fenton sont transformés respectivement en fer ferreux et en cuivre (I) par $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui s'oxyde alors en oxygène moléculaire.



La réaction d'Haber-Weiss correspond à la somme de la réaction de Fenton et celle de la réduction de fer ferrique à partir du $\text{O}_2^{\cdot-}$.



L'hypochlorite (HOCl) fait également parti des ERO. Sa synthèse est catalysée par la myéloperoxydase, enzyme notamment sécrétée par les macrophages et les neutrophiles lors du processus de phagocytose. Au cours de ce dernier, les macrophages synthétisent en grande quantité du $\text{O}_2^{\cdot-}$ via la NADPH oxydase. Ce dernier est dismuté en H_2O_2 . A partir de H_2O_2 et d'ions chlore, la miéloperoxydase synthétise HOCl . Celui-ci est réactif et peut oxyder ou chlorer différentes macromolécules. Il peut également interagir avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ et former HO^{\cdot} au plus près du pathogène. En effet, la myéloperoxydase, qui est sécrétée dans la fente phagocytaire (espace séparant le macrophage et le pathogène), adhère à l'agent pathogène (Saran *et al.*, 1999). L'hypochlorite peut aussi être à l'origine de la formation de HO^{\cdot} en réagissant avec le Fe^{2+} (analogue de la réaction d'Haber-Weiss) (Nordberg and Arner, 2001).



L'oxygène singulet est de même un membre des ERO. Il correspond à un état excité de l'oxygène moléculaire et peut être produit par l'activation des macrophages, la peroxydation lipidique à l'origine de la perte de l'intégrité membranaire ou encore par l'action photosensibilisée des ultraviolets (UV) sur l'oxygène moléculaire (Kanofsky, 1989).

Contexte bibliographique

Parmi les espèces oxydantes, on trouve aussi les ERA. Le monoxyde d'azote (NO) et le peroxydinitrite (ONOO^-) en font parti. Le NO est synthétisé par les monoxydes d'azote synthase (NOS) dont il existe trois isoformes, deux sont constitutives (NOS1 et NOS3) et une est inductible (NOS2). Les NOS catalysent la production de NO et de citrulline à partir d'arginine. Elles utilisent pour cela plusieurs cofacteurs : la tétrahydrobioptérine (BH₄), le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) (Alderton *et al.*, 2001). La production du ONOO^- est issue de l'interaction du NO et du O_2^- . Le ONOO^- est très réactif, sa réactivité étant assez proche de celle du HO \cdot (Vamecq *et al.*, 2004).

3.2. Fonctions biologiques des espèces oxydantes

Les espèces oxydantes sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Les ERO participent, par exemple, à la régulation de l'expression génique via celle de facteurs de transcriptions comme le « facteur nucléaire-kappa B » (NF- κ B) (Dalton *et al.*, 1999; Nordberg and Arner, 2001). Le facteur de transcription NF κ B joue un rôle central dans la régulation de nombreux gènes impliqués notamment dans les mécanismes de défense cellulaire contre les pathogènes ou dans la régulation de l'inflammation via l'activation de la synthèse de cytokines (Dalton *et al.*, 1999). Ce facteur de transcription est inhibé dans le cytosol par son interaction avec la protéine I- κ B. L'activation et la translocation nucléaire de NF κ B passe par la dégradation de I- κ B. Les ERO jouent un rôle dans l'activation de NF κ B puisqu'en présence d'antioxydants, celle-ci n'a pas lieu (Dalton *et al.*, 1999; Nordberg and Arner, 2001). Les ERO sont de plus synthétisées en grande quantité par les macrophages afin d'éliminer les agents pathogènes (voir ci-dessus). Parmi les ERA, le NO intervient également dans de multiples processus cellulaires (Vamecq *et al.*, 2004). Un de ses effets les plus connus est son action vasodilatatrice. Le NO exerce en outre une action inhibitrice sur l'activité de plusieurs enzymes dont les NOS qui catalysent sa synthèse.

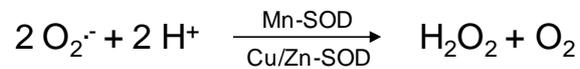
3.3. Défenses antioxydantes

Deux types de défenses anti-oxydantes peuvent-être distingués, les défenses antioxydantes enzymatiques et les défenses antioxydantes non enzymatiques.

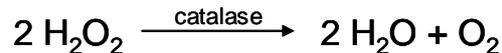
3.3.1. Défenses antioxydantes enzymatiques

Les défenses antioxydantes enzymatiques regroupent les réactions catalysées par les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, le système GPx/GR et le système thiorédoxine /thiorédoxine réductase.

Il existe plusieurs isoformes de SOD dont celles à manganèse (Mn-SOD) présentes dans les mitochondries et celles à cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD) qui sont cytosoliques. Les SOD catalysent la dismutation de l'anion superoxyde qui se produit aussi de manière spontanée. La réaction aboutit à la formation de H₂O₂ et d'oxygène moléculaire. A travers cette dismutation, les SOD limitent l'accumulation des O₂⁻ et indirectement la formation de HO[•] à travers la réaction de Haber-Weiss et celle de ONOO⁻ via l'interaction avec le NO.



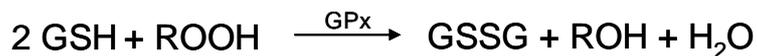
L'action de la catalase vise à prévenir la formation du HO[•] par la réaction de Fenton. En effet, elle catalyse la dismutation de H₂O₂ en eau et en oxygène moléculaire.



Deux types d'activité de la catalase peuvent-être différenciés, l'activité catalasique et l'activité peroxydasique. La première correspond à la réaction décrite ci-dessus. La seconde se produit lorsque les concentrations en H₂O₂ sont basses et assure la formation d'eau à partir de l'oxydation d'un substrat (Vamecq *et al.*, 2004).



L'activité anti-oxydante du système GPx/GR a été mentionnée plus haut dans le cas du H₂O₂. Toutes les glutathion peroxydases, il en existe 4 types notés de 1 à 4, sont en mesure de réduire H₂O₂. Certaines sont en plus en mesure de réduire d'autres peroxydes comme les peroxydes lipidiques en alcool (Nordberg and Arner, 2001).



Le système thiorédoxine /thiorédoxine réductase est, comme son nom l'indique, composé des enzymes thiorédoxine (Trx) et thiorédoxine réductase (TrxR) dont il existe plusieurs isoformes. Les Trx possèdent des groupements thiols qui leurs confèrent leur activité intrinsèque d'oxydoréductase. Grâce à ces groupements, elles peuvent réduire, tout en s'oxydant elles-mêmes, les ponts dissulfures de nombreuses protéines comme la GPx et le facteur de transcription NF-κB. Elles peuvent également réduire le GSSG en GSH et le H₂O₂

Contexte bibliographique

en H₂O (Nordberg and Arner, 2001). La réduction des Trx oxydées est assurée par les TrxR. Ces dernières utilisent comme co-facteurs pour leur activité catalytique le NADPH, H⁺. Elles l'oxydent en NADP⁺ pour réduire les Trx oxydées (Schéma 15). De plus, les TrxR peuvent directement participer à l'élimination des peroxydes lipidiques en les réduisant en alcools ou encore réduire des antioxydants non enzymatiques comme la vitamine C (Nordberg and Arner, 2001).

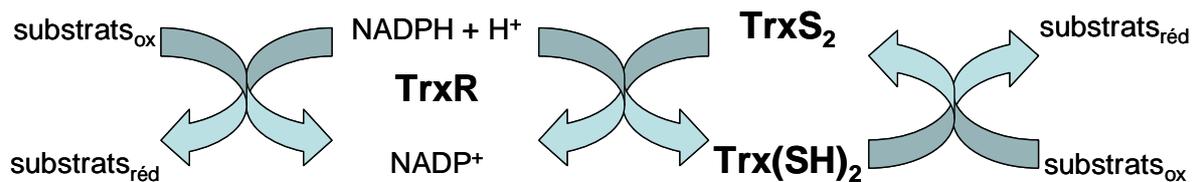


Schéma 15 : Fonctionnement du système Trx/TrxR

3.3.2. Défenses antioxydantes non enzymatiques

Il existe toute une variété d'agents antioxydants non enzymatiques qui sont endogènes ou qui proviennent de l'alimentation (Tessier and Marconnet, 1995; Vamecq *et al.*, 2004). Parmi les agents antioxydants non enzymatiques endogènes, on peut citer la mélatonine ou le coenzyme Q.

La mélatonine est une hormone connue pour son rôle central dans la régulation des rythmes chronobiologiques (Malhotra *et al.*, 2004). Elle a également des effets antioxydants via notamment la diminution de la peroxydation lipidique (Stetinova *et al.*, 2002), sa capacité à piéger les espèces oxydantes et à induire l'expression de la GPx (Martin *et al.*, 2002). Le coenzyme Q ou ubiquinone est connu pour son rôle de transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Il a de plus des effets antioxydants en prévenant la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs au niveau des protéines et de l'ADN (Ernster and Dallner, 1995).

Parmi les agents antioxydants non enzymatiques provenant de l'alimentation, citons les vitamines C et E. La vitamine E, abondante dans les huiles végétales est liposoluble et est présente dans toutes les membranes dont elle préserve l'intégrité en mettant fin à la peroxydation lipidique (Tessier and Marconnet, 1995; Vamecq *et al.*, 2004). Présente dans de nombreux fruits comme les agrumes et le kiwi, la vitamine C, qui est hydrosoluble, peut recycler la vitamine E oxydée. Elle est aussi capable de réagir directement avec les espèces

oxydantes et de diminuer leurs effets nocifs (Gardès-Albert *et al.*, 2003; Tessier and Marconnet, 1995; Vamecq *et al.*, 2004).

3.4. Stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre de la balance espèces oxydantes/ défenses antioxydantes. Il peut être du à une surproduction d'espèces oxydantes, à un déficit en défenses antioxydantes ou les deux à la fois (Droge, 2002). Ce déséquilibre penche donc en faveur des espèces oxydantes qui vont alors exercer leurs effets délétères au niveau des macromolécules cellulaires comme les protéines, les lipides et l'ADN.

L'oxydation des protéines par les espèces oxydantes peut avoir différents effets. Elle peut altérer leurs conformations, les dénaturer, inhiber leurs activités catalytiques (protéines enzymatiques) ou encore aboutir à leurs dégradations (Butterfield *et al.*, 1998; Nordberg and Arner, 2001; Stadtman, 1992). Parmi les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation, on trouve la cystéine et la méthionine dont les groupements thiols forment des ponts dissulfures. Outre ces derniers, on trouve également la proline, l'arginine, la lysine, l'histidine et la tyrosine (Stadtman, 1992). L'oxydation de ces acides aminés conduit à la formation de groupements carbonyles qui sont un des moyens utilisés pour évaluer le stress oxydant (Butterfield *et al.*, 1998). L'inactivation d'enzymes par le stress oxydant se produit notamment lorsque ce sont les acides aminés du site catalytique qui sont oxydés (Butterfield *et al.*, 1998; Stadtman, 1992).

L'oxydation des lipides membranaires par les espèces oxydantes est couramment appelée peroxydation lipidique. Ce sont surtout les acides gras insaturés et parmi eux le cholestérol ainsi que les phospholipides qui constituent les substrats de la peroxydation lipidique (Gueraud *et al.*, 2010). Il en existe deux mécanismes selon qu'elle est générée par les espèces oxydantes radicalaires ou par l'oxygène singulet (Cillard and Cillard, 2006).

Le mécanisme de la première se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Porter *et al.*, 1995). L'initiation correspond à la formation d'un radical alkyle via l'élimination d'un atome d'hydrogène de l'acide gras polyinsaturé situé au niveau d'une double liaison par une espèce oxydante. Le radical alkyle ainsi formé réagit avec l'oxygène moléculaire pour donner un radical peroxy. Ce dernier est transformé en hydroperoxyde via le transfert d'un atome d'hydrogène d'un acide gras voisin qui devient à son tour un radical

Contexte bibliographique

alkyle, c'est la propagation. La terminaison résulte de l'interaction d'espèces radicalaires entre elles pour donner des espèces non radicalaires.

L'oxygène singulet, quant à lui, s'additionne directement aux acides gras polyinsaturés formant des hydroperoxydes. Il n'y a donc pas d'étape de propagation. En revanche, les hydroperoxydes formés peuvent se décomposer et donner des radicaux libres à l'origine de l'initiation de la peroxydation lipidique décrite ci-dessus (Cillard and Cillard, 2006; Girotti, 2001).

Outre l'altération des membranes via la diminution de leurs fluidités notamment, il y a formation à la fin de la peroxydation lipidique d'hydroperoxydes qui en constituent les produits primaires (Cillard and Cillard, 2006; Gueraud *et al.*, 2010). L'instabilité de ces produits primaires aboutit à la formation de produits secondaires dont des aldéhydes réactifs comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (HNE) qui sont à même de provoquer des dommages au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN. Ces derniers peuvent-être quantifiés et servir de marqueurs du stress oxydant en général et de la peroxydation lipidique en particulier (Cillard and Cillard, 2006; Gueraud *et al.*, 2010).

Les espèces oxydantes sont capables d'attaquer l'ADN en oxydant ses constituants altérant ainsi sa structure (voir p.67). Les conséquences possibles de l'oxydation de l'ADN sont la mort cellulaire et l'apparition de mutations potentiellement cancérigènes (Marnett, 2000; Nordberg and Arner, 2001).

3.5. Induction d'un stress oxydant par l'ypérite

La déplétion du glutathion, puissant antioxydant, a été observée *in vitro* (Amir *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1993; Han *et al.*, 2004; Tewari-Singh *et al.*, 2011), chez plusieurs modèles animaux (Jafari, 2007; Kumar *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2000; Pohanka *et al.*, 2013; Vijayaraghavan *et al.*, 2008) et chez l'homme (Jafari and Ghanei, 2010; Shohrati *et al.*, 2010).

En réponse à la déplétion en glutathion, l'augmentation des espèces oxydantes a été observée dans de nombreux modèles.

Une série de données provient d'études utilisant l'analogue monofonctionnel de l'ypérite (CEES). Gould *et al.* ont par exemple montré dans des cellules épithéliales pulmonaires une augmentation des espèces oxydantes avec un pic 12h après traitement à 0.9 mM de CEES. Cette augmentation a été contrebalancée par l'adjonction dans le milieu de culture d'une

Contexte bibliographique

métalloporphyrine possédant à la fois les activités catalytiques de la SOD et de la catalase (Gould *et al.*, 2009). Les travaux de Han *et al.* ont indiqué dans un modèle de lymphocyte que l'accroissement des espèces oxydantes était temps-dépendant (Han *et al.*, 2004). Pour des concentrations de CEES allant de 0.1 à 10 mM, Gray *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la production de H₂O₂ (maximum obtenu pour la dose 0.3 mM) associée à l'inhibition de la NADPH cytochrome p450 réductase (Gray *et al.*, 2010). Une dose-dépendance de l'augmentation de la concentration en H₂O₂ a été observée par Jan *et al.* (Jan *et al.*, 2010). Produit constitutivement dans des kératinocytes murins, le taux de H₂O₂ a été multiplié de 5 à 10 suite à un traitement par 0.3 et 1 mM de CEES, respectivement (Black *et al.*, 2010b). Dans des kératinocytes humains, l'accroissement du H₂O₂ après un traitement à 1.5 mM de CEES pendant 6 h a été quasiment aboli par l'ajout de glutathion, que celui-ci ait été administré sous sa forme « libre » ou encapsulée dans des liposomes. Ce dernier a permis, de plus, d'atténuer la mortalité engendrée par l'exposition au CEES d'environ 15% (Paromov *et al.*, 2011). Le taux de O₂⁻ est également augmenté suite à une exposition de kératinocytes et de fibroblastes murins au CEES (Inturi *et al.*, 2011; Tewari-Singh *et al.*, 2012). Le prétraitement au glutathion permet de diminuer le taux d'anion superoxyde généré par le CEES de 47 et 96% dans les fibroblastes et les kératinocytes, respectivement. Avec le trolox (agent antioxydant), cette diminution est de 66% dans les fibroblastes (Inturi *et al.*, 2011). Utilisée 30 min après exposition, la silibinine, autre agent antioxydant, induit une diminution de ce taux à hauteur de 85% dans les kératinocytes (Tewari-Singh *et al.*, 2012).

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'ypérite. Les études de Steinritz *et al.* dans des kératinocytes humains ont révélé que la concentration en ONOO⁻, supérieure aux cellules contrôles, était à son maximum 3h après exposition à 100 µM d'ypérite et dès 1 h pour la dose 300 µM (Steinritz *et al.*, 2009). Ce taux de ONOO⁻, mesurée indirectement par celui de la nitrotyrosine (Hoeldtke *et al.*, 2002; Sodum *et al.*, 2000), se maintient jusque 6 h post-exposition. Ces chercheurs ont également montré que le stress oxydant, via la mesure du 8-isoprostane qui est un indicateur biochimique de peroxydation lipidique (Kankofer, 2002), était augmenté dès 1 h aux deux concentrations étudiées (Steinritz *et al.*, 2009). En outre, contrairement aux résultats obtenus par Qui *et al.* dans des macrophages murins (Qui *et al.*, 2006), Steinritz *et al.* ont montré une augmentation de la formation de NOS2 dose et temps-dépendant (Steinritz *et al.*, 2009).

L'inflammation joue également un rôle dans l'augmentation de la production d'espèces oxydantes. En effet, la toxicité cellulaire générée par l'ypérite induit une réponse inflammatoire importante (Kehe *et al.*, 2009; Shakarjian *et al.*, 2010). L'afflux de

Contexte bibliographique

neutrophiles au site intoxiqué a été observé *in vitro* et *in vivo* (O'Neill *et al.*, 2010; Tewari-Singh *et al.*, 2011; Tewari-Singh *et al.*, 2012; Tewari-Singh *et al.*, 2009). L'exposition liquide cutanée (Tewari-Singh *et al.*, 2011; Tewari-Singh *et al.*, 2012; Tewari-Singh *et al.*, 2009) ou vapeur par inhalation (O'Neill *et al.*, 2010) au CEES accroît l'activité myéloperoxydase des neutrophiles et par suite conduit à l'augmentation des espèces oxydantes dans la peau et les poumons, respectivement. Celle-ci est atténuée par le glutathion (Tewari-Singh *et al.*, 2011), la silibinine (Tewari-Singh *et al.*, 2012) et la métalloporphyrine AEOL 1050 (O'Neill *et al.*, 2010).

Outre la déplétion du GSH et la baisse d'activité d'enzymes l'utilisant pour exercer leurs fonctions, Gpx et GR notamment (Gautam and Vijayaraghavan, 2007; Husain *et al.*, 1996; Jafari, 2007; Vijayaraghavan *et al.*, 2008), l'ypérite entraîne aussi la diminution de l'activité d'autres antioxydants. C'est le cas des SOD et de la catalase dont les diminutions d'activité ont été relevées dans le foie, le cerveau, les poumons et/ou la rate de différents modèles (souris, rats, cochon d'Inde) après des expositions percutanée, intra-péritonéale et intra-trachéale à l'ypérite ou au CEES (Husain *et al.*, 1996; Jafari, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2009; Vijayaraghavan *et al.*, 2008). L'instillation de liposomes contenant du glutathion, la SOD et/ou la catalase permet de diminuer significativement les lésions pulmonaires chez le rat (McClintock *et al.*, 2006). Les travaux de Jan *et al.* ont montré que la TrxR, autre composante des défenses antioxydantes, était inhibée de manière dose et temps-dépendant par le CEES dans des cellules pulmonaires. En utilisant la TrxR de foie de rat purifiée, ces chercheurs ont montré que le CEES inhibait spécifiquement la forme réduite de l'enzyme en ciblant une sélénocystéine du site actif (Jan *et al.*, 2010).

La genèse du stress oxydant (Schéma 16) consécutif à la déplétion en glutathion par l'ypérite a également été observée au travers des effets délétères causés par les espèces oxydantes comme la formation des groupements carbonyles au niveau des protéines (Black *et al.*, 2010b; Pal *et al.*, 2009; Paromov *et al.*, 2008; Pohanka *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2009; Tewari-Singh *et al.*, 2012), l'augmentation du MDA et du HNE par la peroxydation lipidique (Jafari, 2007; Kumar *et al.*, 2001; Lomash *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Vijayaraghavan *et al.*, 2008; Vijayaraghavan *et al.*, 1991) et l'altération de la structure de l'ADN (Gould *et al.*, 2009; O'Neill *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2009; Tewari-Singh *et al.*, 2012).

Des données obtenues chez les vétérans iraniens mettent également en évidence le stress oxydant comme un mécanisme impliqué dans la toxicité à long terme de l'ypérite. Shohrati *et al.* ont en effet montré une corrélation entre la déplétion du glutathion et la sévérité des

Contexte bibliographique

lésions pulmonaires chez 250 vétérans (Shohrati *et al.*, 2010). Parallèlement à cette dernière, une augmentation de la peroxydation lipidique via la mesure de la teneur en MDA a été relevée. Une étude menée sur 144 vétérans iraniens exposés à l'ypérite et divisés en deux groupes de 72, un groupe ayant reçu le traitement et l'autre un placebo, a révélé que la prise quotidienne de N-acétylcystéine (précurseur dans la biosynthèse du glutathion en plus de ses propriétés antioxydantes intrinsèques) pendant 4 mois atténuait les symptômes pulmonaires comme la dyspnée ou la toux (Shohrati *et al.*, 2008). Pour Ghanei et Harandi, le stress oxydant est même considéré comme un des mécanismes les plus importants dans la maladie pulmonaire obstructive chronique, une des principales lésions pulmonaires à long terme causées par l'ypérite (Ghanei and Harandi, 2011).

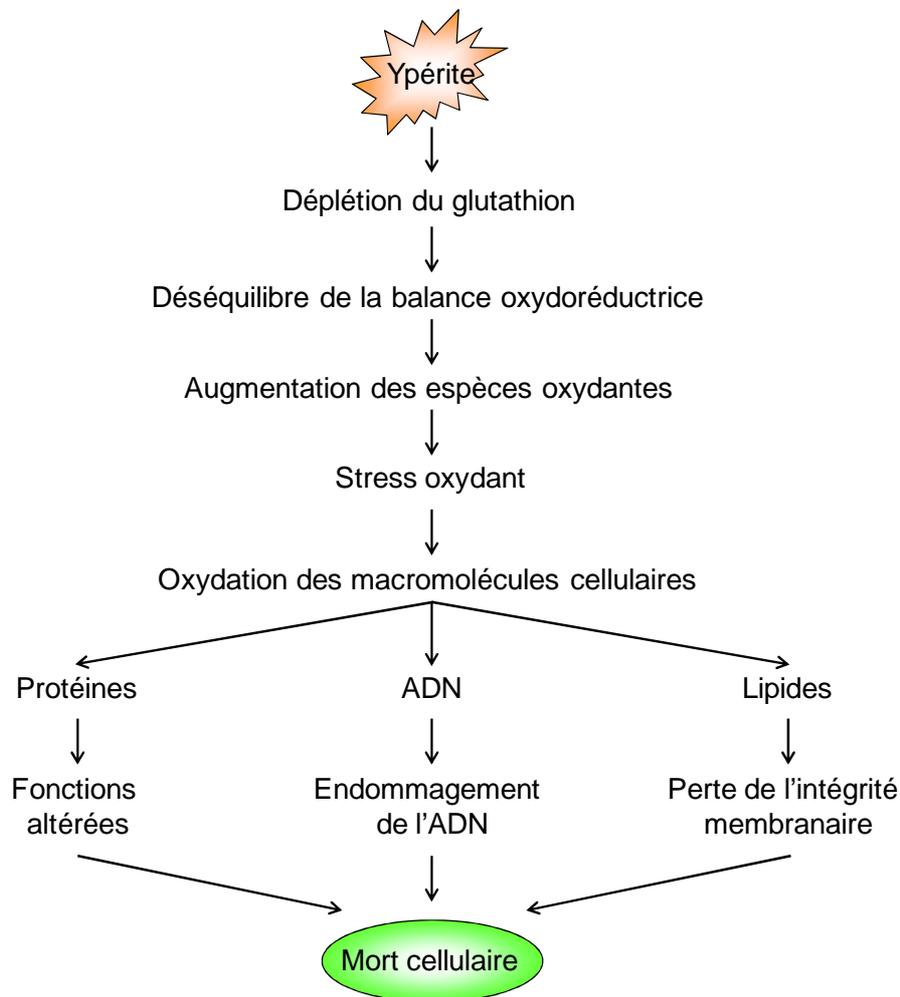


Schéma 16 : Induction d'un stress oxydant par l'ypérite et ses conséquences

L'altération du métabolisme cellulaire est une des conséquences de l'alkylation de l'ADN et sera détaillée plus tard (voir p.95). L'alkylation de l'ADN constitue un des événements clés pour expliquer la toxicité à court et à long terme de l'ypérite.

IV. Alkylation de l'ADN par l'ypérite et conséquences

1. L'ADN

1.1. Structure

Cela fait désormais 60 ans que la structure de l'ADN a été découverte. Cette dernière est le fruit de dizaines d'années de recherche. En 1869, Friedrich Miesher isole une substance riche en phosphore et qui n'est pas une protéine. Il la nomme nucléine parce qu'isolée à partir du noyau (Dahm, 2005). En découvrant ses propriétés acides, Richard Altmann, en 1889, renomme la nucléine acide nucléique. En 1896, Albricht Kossel, prix Nobel de médecine et physiologie en 1910, découvre que l'acide nucléique est constitué de quatre bases : l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine (Dahm, 2005). En 1919, Phoebus Levene découvre que l'acide nucléique est composé, en plus des bases, d'un sucre, le 2-désoxyribose et de groupements phosphates (Levene, 1919). Erwin Chargaff constate en 1949 que la composition en base de l'ADN varie d'une espèce à l'autre mais que le ratio des bases adénine et thymine d'une part et cytosine et guanine d'autre part est toujours identique (Dahm, 2005). C'est en s'appuyant sur les travaux par diffraction aux rayons X de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins que James Watson et Francis Crick, co-lauréats du prix Nobel de médecine et physiologie en 1962, ont découvert la structure de l'ADN telle que nous la connaissons de nos jours (Watson and Crick, 1953).

La structure primaire de l'ADN correspond à l'enchaînement de nucléotides qui constituent l'unité de base du biopolymère. Chaque nucléotide est constitué du 2-désoxyribose, d'un groupement phosphate et d'une base (Schéma 17). La liaison N-glycosidique relie la base au 2-désoxyribose et l'ensemble est appelé 2'-désoxyribonucléoside. Il existe deux types de base, les bases puriques (guanine et adénine) et

Contexte bibliographique

les bases pyrimidiques (cytosine et thymine). Les nucléotides sont reliés entre eux via la formation de liaisons phosphodiesteres qui concernent les positions 3' et 5' de deux 2'-désoxyribonucléosides adjacents.

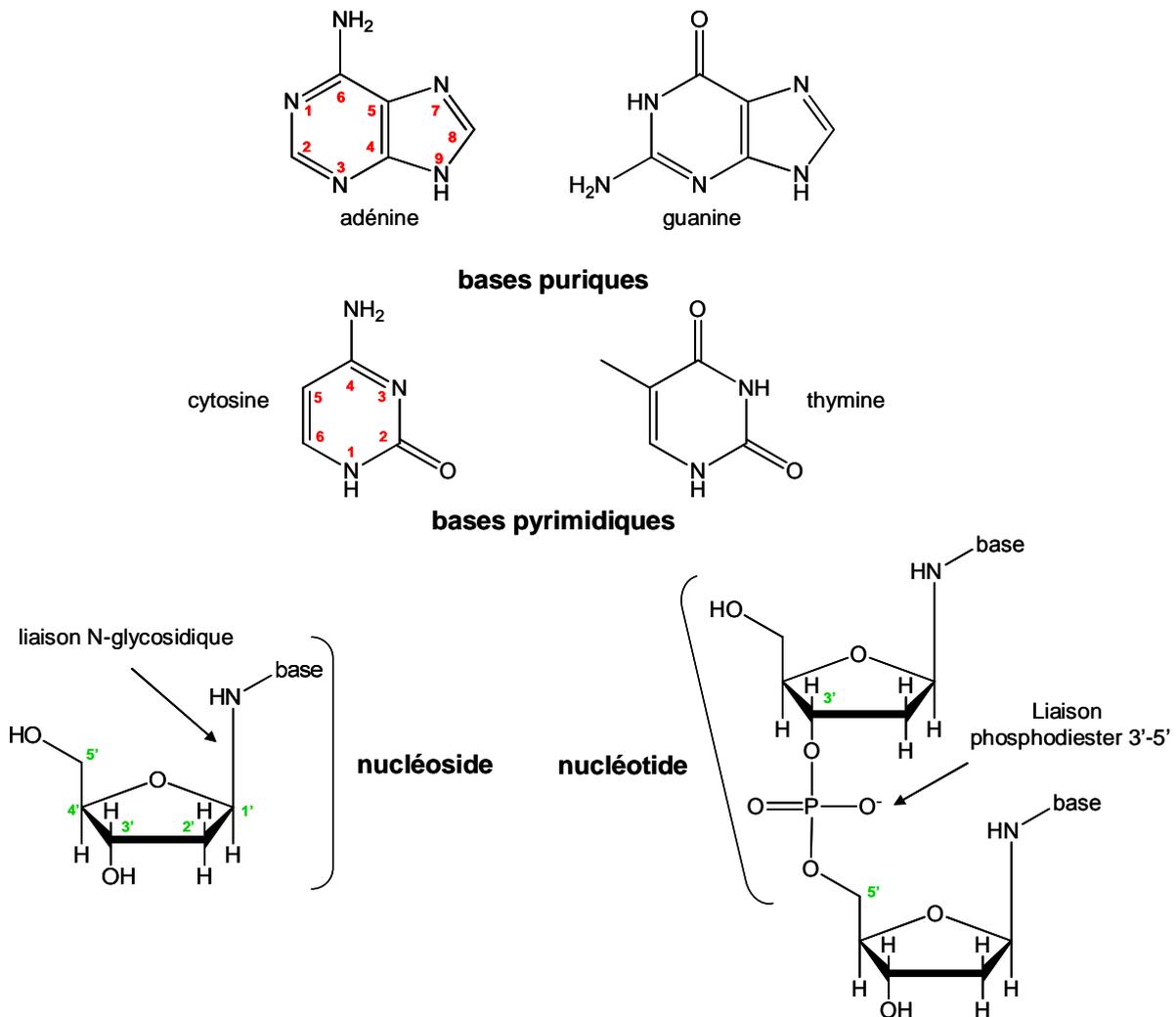


Schéma 17 : Structures des unités constitutives de l'ADN

Bases (adénine, guanine, cytosine et thymine), nucléoside (base + 2-désoxyribose) et nucléotide (base + 2-désoxyribose + phosphate).

La structure secondaire de l'ADN (Schéma 18) consiste en deux brins hélicoïdaux dextrogyres antiparallèles (orientation 5'-3' opposée) s'enroulant autour d'un axe avec un angle de 36° , formant ainsi une double hélice de 2 nm de diamètre. Les bases sont dirigées vers l'intérieur de la double hélice (plan des bases perpendiculaire à l'axe de la double hélice) et la complémentarité des brins est assurée par l'appariement d'une base purique avec une base pyrimidique. Les paires de bases adénine-thymine et guanine-cytosine sont appariées par

Contexte bibliographique

respectivement deux et trois liaisons hydrogène. La distance séparant deux bases est de 3,4 Å. Celle du pas de la double hélice, constituée de 10 paires de bases, est de 34 Å. Du fait de l'espacement asymétrique de ses deux brins antiparallèles, la molécule d'ADN présente des petits et des grands sillons.

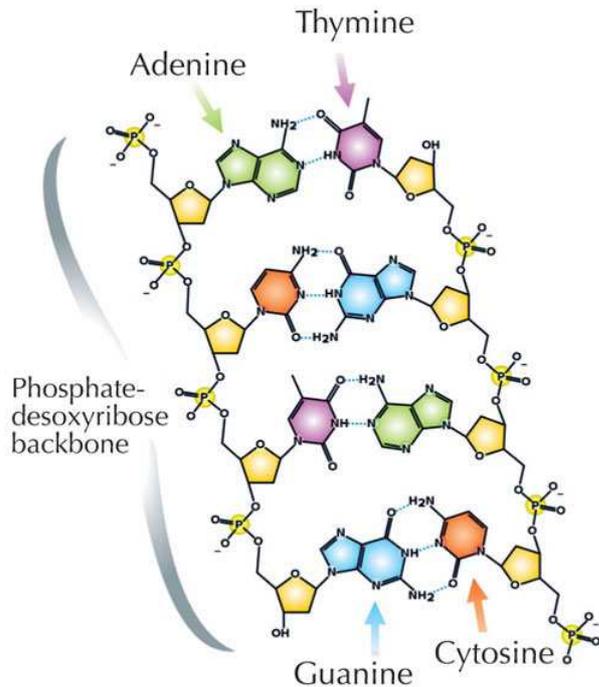


Schéma 18 : *Structure de la double hélice d'ADN*

A gauche : schéma représentant la structure de l'ADN et ses constituants ; A droite : photo illustrant Watson et Crick avec leur modèle de la structure de la double hélice.

La structure tertiaire de l'ADN correspond à son état compacté sous forme de chromosome. En effet, ce biopolymère est contenu dans le noyau grâce à son surenroulement pour lequel il existe différents niveaux. Les nucléosomes constituent des octamères d'histones autour desquels sont enroulées 146 paires de base. Ces nucléosomes sont eux-mêmes regroupés et enroulés sous la forme d'une fibre de 30 nm de diamètre. Ces fibres sont à leur tour condensées par enroulement en spirales pour donner le chromosome.

Contexte bibliographique

1.2. Fonctions

L'ADN assure deux fonctions cellulaires primordiales, à savoir la transmission de l'information génétique et la synthèse des protéines.

1.2.1. Transmission de l'information génétique

Dès 1865, Johann Gregor Mendel, après avoir étudié la formation des hybrides végétaux dans des plants de petit pois, pose les bases de la génétique moderne avec la notion de caractère héréditaire. Dans les dizaines d'années qui suivent ces travaux fondateurs, la majorité des scientifiques de l'époque pensent que les protéines sont les vecteurs de l'hérédité. Ce sont les expériences réalisées par Avery *et al.* ainsi que celles de Hershey et Chase qui permirent d'établir définitivement l'ADN comme étant la molécule de l'hérédité (Avery *et al.*, 1944; Hershey and Chase, 1952). La transmission de l'information génétique est assurée au cours de la division cellulaire pendant laquelle l'ADN est dédoublé. Les cellules filles nouvellement formées contiennent chacune une copie de la molécule d'ADN identique à celle de la cellule mère. Le doublement de la quantité d'ADN est réalisé par le processus de réplication faisant intervenir de nombreux acteurs protéiques dont les ADN polymérase et reposant sur la complémentarité des bases. Ainsi, chaque brin de la double hélice est utilisé comme matrice pour la synthèse *de novo*. Ce mode de réplication de l'ADN a été découvert par Meselson et Stahl en 1958 et est qualifié de semi-conservatif (Meselson and Stahl, 1958).

1.2.2. Synthèse des protéines

Les protéines sont composées d'un enchaînement d'acides aminés (quelques dizaines à plusieurs centaines) reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Elles constituent des éléments essentiels assurant le bon fonctionnement des cellules en jouant des rôles multiples : rôle structurel (ex : actine), rôle dans la mobilité (ex : myosine), rôle catalytique (enzymes), rôle de régulation dans la compaction de l'ADN (histones) ou encore rôle dans l'expression génique (facteurs de transcription).

Chaque protéine est codée par une séquence d'ADN ou gène. Cette séquence est tout d'abord transcrite en ARN messager (ARNm) via l'action notamment d'une ARN

Contexte bibliographique

polymérase. L'ARN est simple brin et diffère de l'ADN par la nature du sucre, le ribose remplaçant le 2-désoxyribose, et celle d'une des bases, la thymine étant remplacée par l'uracile. L'ARNm, nouvellement synthétisé, subit un épissage (pour les eucaryotes uniquement), c'est-à-dire l'élimination des parties non codantes de l'ADN transcrit ou introns. L'ARNm quitte alors le noyau pour le cytoplasme où il est traduit en protéines par les ribosomes. Ces derniers, avec l'aide des ARN de transfert (ARNt) traduisent l'ARNm codon par codon, un codon étant constitué de trois nucléotides adjacents et correspond à un acide aminé particulier. La correspondance entre codon et acide aminé constitue le code génétique.

Bien que protégée par sa localisation nucléaire, la molécule d'ADN subit continuellement des altérations de séquence aux conséquences biologiques diverses et pouvant être initiées par des facteurs d'origine endogène ou exogène.

2. Modifications de la structure d'ADN

Les modifications (aussi appelées dommages ou lésions) de la structure de la double hélice, d'origine endogène ou exogène, regroupe quatre grandes classes de dommages à l'ADN : les bases modifiées, les cassures simple et double brin, les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines.

2.1. Modifications d'origine endogène

Les modifications endogènes de l'ADN correspondent à des lésions induites par les produits ou sous-produits du métabolisme cellulaire. Elles regroupent différents types de lésions à savoir les sites abasiques, les désaminations, les lésions oxydatives, les méthylations et les mésappariements (Pourquier, 2006).

L'hydrolyse de l'ADN conduit à l'apparition de sites abasiques (Schéma 19). Ils résultent de la rupture de la liaison N-glycosidique, c'est-à-dire la liaison reliant la base au désoxyribose. Il y a donc perte du codage de l'information génétique contenue dans la séquence des bases consécutivement à leur « détachement » du squelette sucre-phosphate de la double hélice. Ce sont principalement la guanine et l'adénine qui sont concernées, d'où le terme de dépurination.

Contexte bibliographique

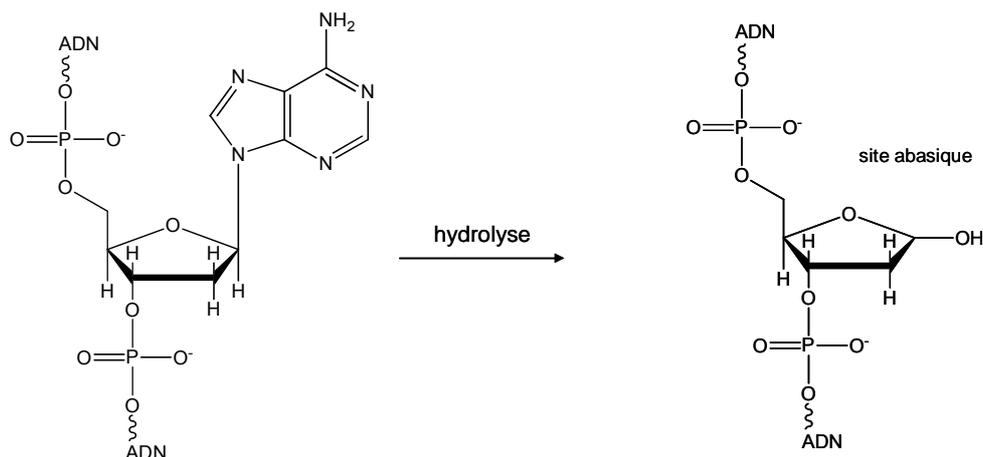


Schéma 19 : Formation d'un site abasique à partir de la 2'-désoxyadénosine

Il a été estimé que dans chaque cellule humaine près de 10000 sites abasiques étaient formés par jour (Nakamura *et al.*, 1998). Ces derniers sont très labiles et peuvent donner spontanément naissance à des cassures simples brins au sein de la molécule d'ADN qui sont cytotoxiques (Friedberg, 2003; Scharer, 2003).

A l'instar de l'hydrolyse et des sites abasiques subséquentment formés, les réactions de désamination génèrent une modification de l'information génétique. Elles concernent les groupements amine exocyclique et par conséquent l'adénine, la guanine et la cytosine les transformant respectivement en hypoxanthine, xanthine et uracile (Lindahl, 1993). Parmi ces désaminations, la plus fréquente est celle de la cytosine (Schéma 20) en uracile qui se produit 100 à 500 fois par jour dans une cellule humaine (Frederico *et al.*, 1990).

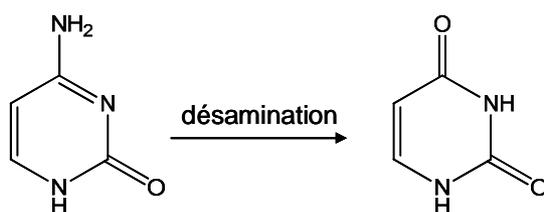


Schéma 20 : Désamination de la cytosine en uracile

Comme mentionné plus haut (voir p.58), les espèces oxydantes, issues de la réduction partielle de l'oxygène moléculaire, sont capables d'oxyder les bases de l'ADN. Parmi celles-ci, le radical hydroxyle est capable d'interagir avec les quatre bases de la double hélice (Cadet *et al.*, 1997; Steenzen, 1989). En revanche, l'anion superoxyde, qui constitue la principale ERO générée par les complexes constitutifs de la chaîne respiratoire mitochondriale, ne réagit

Contexte bibliographique

pas directement avec l'ADN tout comme le peroxyde d'hydrogène, produit de sa dismutation (Cadet *et al.*, 2010). Tous deux endommagent l'ADN indirectement en participant à la formation de radicaux hydroxyles à travers les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. L'oxygène singulet est, quant à lui, capable de réagir directement avec l'ADN en oxydant spécifiquement la guanine qui possède le potentiel d'ionisation le plus faible parmi les quatre bases de l'ADN (Cadet *et al.*, 1997; Steenken and Jovanovic, 1997). A ce jour, ce sont plus d'une centaine de lésions oxydatives qui ont été caractérisées (Beckman and Ames, 1997; Cadet *et al.*, 1999). Parmi celles-ci, on trouve par exemple les diols de thymine, la 5-hydroxycytosine, la 8-oxoadénine et la 8-oxo-guanine (Schéma 21). Cette dernière constitue le biomarqueur du stress oxydant au niveau de l'ADN.

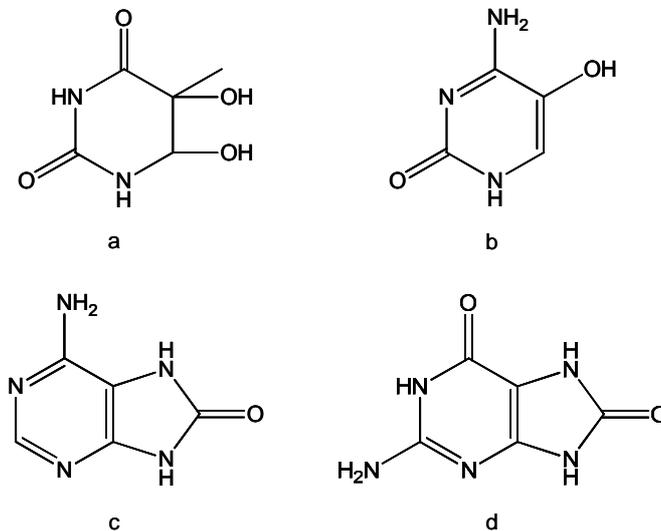


Schéma 21 : Structures de quatre lésions oxydatives de l'ADN

Diol de thymine (a), 5-hydroxycytosine (b), 8-oxoadénine (c) et 8-oxoguanine(d)

Le 2-désoxyribose est aussi une cible du radical hydroxyle et sa dégradation conduit aux dégradations d'ADN. Si deux cassures sont générées dans moins d'un tour d'hélice, il y a formation d'une cassure double-brin.

Les espèces oxydantes peuvent, de plus, former des lésions de manière indirecte au niveau de l'ADN via la peroxydation lipidique et ses produits secondaires comme le MDA et le HNE. Ces deux derniers sont en effet capables d'interagir directement avec la double hélice et de produire des adduits (addition de la molécule sur les bases de l'ADN) exocycliques comme entre autres une pyrimidopurinone (adduit majeur du MDA) (Marnett, 1999) et des adduits propano (adduit majeur du HNE) (Schéma 22) (Douki *et al.*, 2004).

Contexte bibliographique

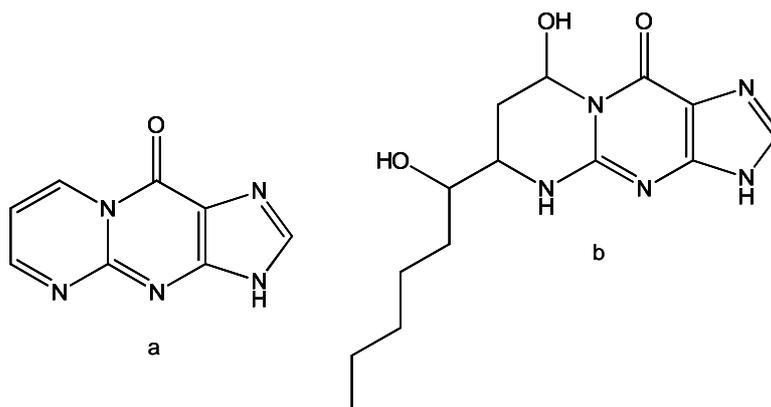


Schéma 22 : Structures des adduits majoritaires du HNE et du MDA
adduit majoritaire du HNE (a), adduit majoritaire du MDA

Outre les sites abasiques, les bases désaminées, les lésions oxydatives et les cassures, on trouve également parmi les modifications endogènes de l'ADN celles induites par des cofacteurs enzymatiques comme la S-adénylméthionine (SAM). Cette dernière est un cofacteur de méthyltransférases (ex : ADN méthyltransférase, histones méthyltransférase), enzymes qui comme leur nom l'indique catalysent le transfert d'un groupement méthyle en utilisant la SAM comme donneur. Il y a alors production de S-adénylhomocystéine (SAH) qui peut être recyclée en SAM. Ce donneur de groupement méthyle peut accidentellement méthylé l'ADN et formé la 7-méthylguanine ainsi que la 3-méthyladénine (Schéma 23) (Rydberg and Lindahl, 1982).

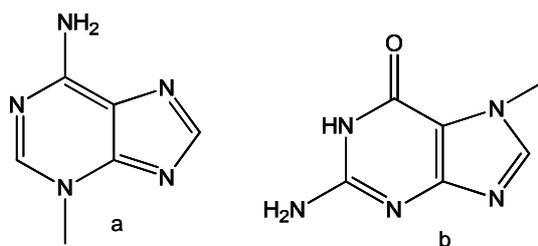


Schéma 23 : Structures de la 3-méthyladénine et de la 7-méthylguanine
3-méthyladénine (a), 7-méthylguanine (b)

Les mésappariements ne constituent pas à proprement parler des modifications endogènes mais plutôt des altérations de séquence de la double hélice du fait, comme leur nom l'indique, du mauvais appariement entre bases. Ils sont dus à des dysfonctionnements des ADN polymérases lors de la réplication.

2.2. Modifications d'origine exogène

L'ADN, en plus d'être la cible de modifications endogènes dues au métabolisme cellulaire et à ses sous-produits, est également sujet à des modifications d'origine exogène occasionnées par des agents environnementaux. On peut distinguer deux types d'agents environnementaux : les agents physiques et les agents chimiques.

2.2.1. Agents physiques

Les rayonnements UV sont un exemple bien connu d'agent physique responsable de modifications exogènes de l'ADN. Ils correspondent à des rayonnements électromagnétiques dont la longueur est comprise entre 100 et 400 nm et sont subdivisés en trois classes : les UVA (320-400 nm), les UVB (280-320 nm) et les UVC (100-280 nm). Les bases de l'ADN sont en mesure d'absorber des photons dont la longueur d'onde est comprise entre 230 et 290 nm soit dans le domaine des UVC et dans une moindre mesure des UVB. Toutefois, les UVC ne sont pas biologiquement pertinents du fait de leur absorption par la couche d'ozone. Les UVB et les UVA constituent respectivement 0.3 et 5.1% du rayonnement UV solaire parvenant à la terre (Sage, 1993). L'absorption de photons dans le domaine des UVB et des UVC, ces derniers étant malgré tout largement employés en laboratoire et dans les lampes germicides (Douki, 2013), conduit à la formation d'un état excité des bases de l'ADN et va permettre la formation de liaisons covalentes entre deux bases pyrimidiques (thymine et/ou cytosine) adjacentes. On parle de dimères de pyrimidines dont il existe principalement deux types : les photoproduits 6-4 (6-4PP) et les dimères cyclobutaniques de pyrimidine (« cyclobutane pyrimidine dimers » ou CPD) (Schéma 24).

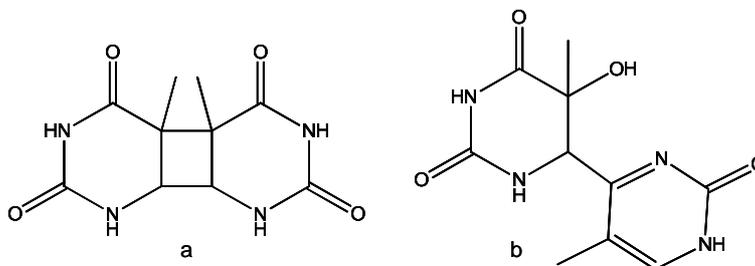


Schéma 24 : Structures du CPD et du 6-4 PP de thymines

CPD de thymines (a), 6-4PP de thymines (b)

Contexte bibliographique

La nature et le taux de ces lésions est fortement dépendant de la longueur d'onde des photons absorbés. Par exemple, il a été montré dans des kératinocytes et des explants de peau irradiés par les UVB que les dimères de pyrimidines prédominant étaient les CPD. Parmi eux, le CPD de thymines, totalisant près de 40% toutes lésions confondues, était le plus fréquent (Mouret *et al.*, 2006).

2.2.2. Agents chimiques

Il existe de nombreux agents chimiques capables d'altérer la structure de l'ADN. Ils peuvent modifier la structure des bases puriques et pyrimidiques mais aussi les groupements phosphates par alkylation ou addition. La guanine constitue la base la plus communément et la plus extensivement modifiée avec des interactions en N2, N3, O6, N7 et C8 (Phillips, 2007). L'adénine, l'autre base purique, est alkylée par les agents chimiques au niveau de ses atomes d'azote 1, 3, 6 et 7 (Schéma 25). On peut distinguer les agents chimiques en fonction du type d'alkylation qu'ils réalisent, l'alkylation directe et l'alkylation après leur métabolisation.

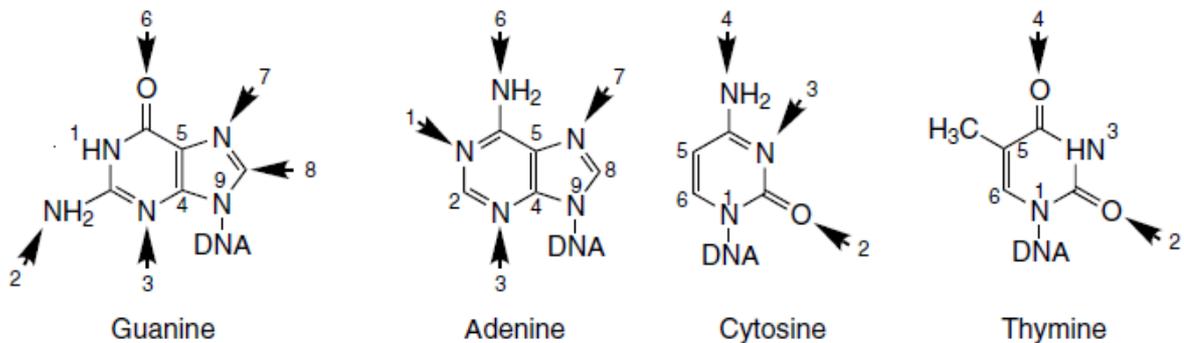


Schéma 25 : Bases de l'ADN et sites auxquels se lient les agents chimiques
(d'après Phillips, 2007)

2.2.2.1. Alkylation directe de l'ADN

L'oxyde d'éthylène ou 1,2-époxyéthane est un exemple d'agent chimique capable d'alkyler directement l'ADN. C'est le composé le plus simple de la famille des époxydes. A température ambiante, il se présente sous la forme d'un gaz incolore et dont l'odeur s'apparente à celle de l'éther. Il est employé massivement dans l'industrie chimique

Contexte bibliographique

notamment comme intermédiaire dans la synthèse de l'éthylène glycol qui est utilisé comme antigel. L'oxyde d'éthylène est également employé en mélange avec d'autres gaz pour la stérilisation de matériels médicaux ou de nourriture. Il forme majoritairement des adduits en position N7 de guanine (N7-hydroxyéthyl-guanine ou HE-N7Gua) et dans une moindre mesure avec les positions N3 d'adénine (N3-hydroxyéthyl-adénine ou HE-N3Ade) et O6 de guanine (O6-hydroxyéthyl-guanine ou HE-O6Gua) (Schéma 26).

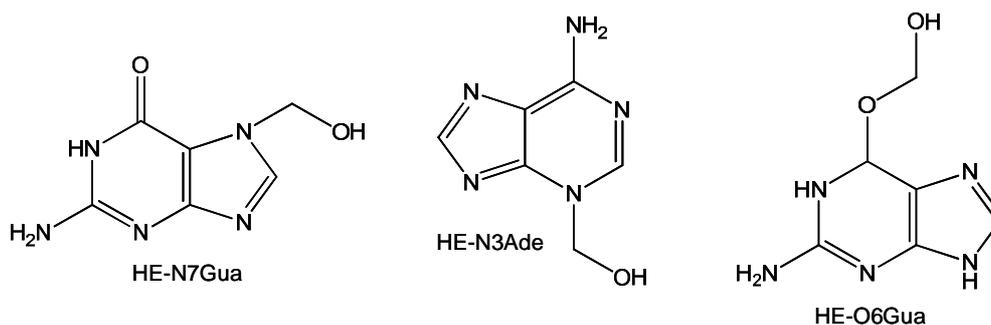


Schéma 26 : Structures chimiques des adduits de l'oxyde d'éthylène

2.2.2.2. Attaque de l'ADN après métabolisation

Afin d'illustrer l'alkylation de l'ADN par un agent chimique après sa métabolisation, prenons l'exemple des HAP. Les HAP, composés organiques constitués d'au moins deux cycles benzéniques fusionnés, constituent une des principales familles de polluants atmosphériques. Ils sont formés par la combustion incomplète de matières organiques et retrouvés dans les gaz d'échappement, la fumée de cigarette, les grillades au barbecue, le chauffage au bois ou encore la production d'énergie à partir de la combustion du charbon. La famille des HAP regroupe plus d'une centaine de composés dont le plus connu est le benzo[a]pyrène (B[a]P). Il existe essentiellement deux voies d'exposition aux HAP qui sont la voie digestive par ingestion d'aliments contaminés et la voie pulmonaire via le tabagisme et la pollution atmosphérique. A côté de ces deux voies principales, il existe une troisième voie, la voie cutanée qui est impliquée lors d'un contact direct avec des éléments souillés par les HAP ou par retombée de poussières en suspension. Une fois à l'intérieur de l'organisme, les HAP, parce qu'ils sont lipophiles, sont capables de traverser les membranes plasmiques des cellules. Ils sont alors pris en charge par les systèmes de détoxification des xénobiotiques et notamment les cytochromes P450 (enzymes de phase I) qui catalysent la mono-oxygénation des HAP en époxyde, les rendant plus hydrosolubles (Shimada and Guengerich, 2006). Les

enzymes de phase II dont la GST (Sheehan *et al.*, 2001) catalysent alors leur conjugaison permettant ainsi leur excrétion via les enzymes de phase III. Une des voies de la métabolisation du B[a]P conduit à la formation de B[a]P diol époxyde (BPDE) (il existe quatre isomères) capables d'interagir avec l'ADN et notamment avec le groupement amine de la guanine (Schéma 27).

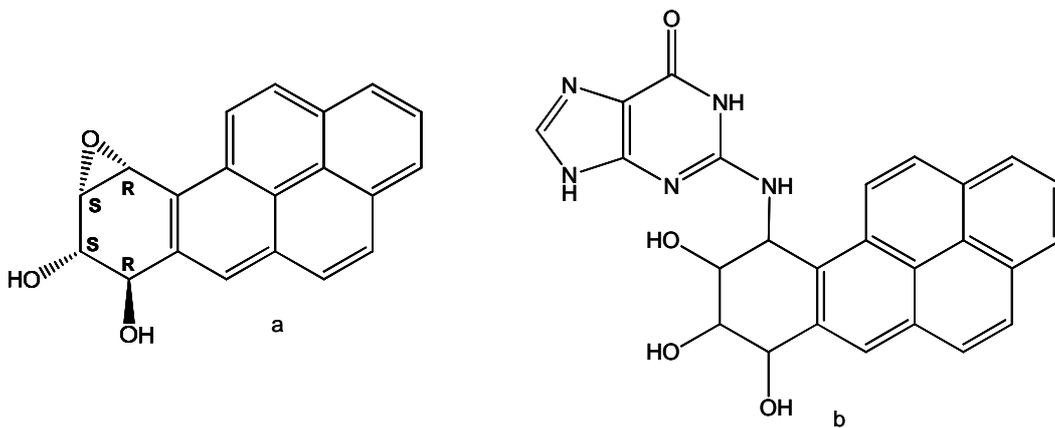


Schéma 27 : Structures chimiques de l'isomère (+) anti BPDE ((+) - B[a]P(7R,8S) diol-(9S,10R) époxyde) et de l'adduit qu'il forme au niveau du groupement amine de la guanine B[a]P(7R,8S) diol-(9S,10R) époxyde (a), adduit en N2 de guanine (b)

Le B[a]P est le seul membre de la famille des HAP classé cancérigène par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) (IARC, 2010). L'initiation d'un processus cancéreux est une des conséquences biologiques possibles de l'altération de la structure de la double hélice (voir p.91).

2.3. Alkylation de l'ADN par l'ypérite

L'ypérite, en plus d'induire l'endommagement de l'ADN via la déplétion en GSH et ses conséquences (lésions d'origine oxydative notamment), est en mesure de réagir sans métabolisation avec l'ADN via son alkylation, ce qui aboutit à la formation d'adduits. Les premiers travaux illustrant l'alkylation de l'ADN par l'ypérite remontent aux débuts des années 1960 avec ceux de Brookes et Lawley (Brookes and Lawley, 1960, 1961b, 1963). Ces chercheurs ont effet mis en évidence la formation de trois types d'adduits générés par l'ypérite comprenant deux monoadduits et un biadduit ou pontage (Schéma 28).

Contexte bibliographique

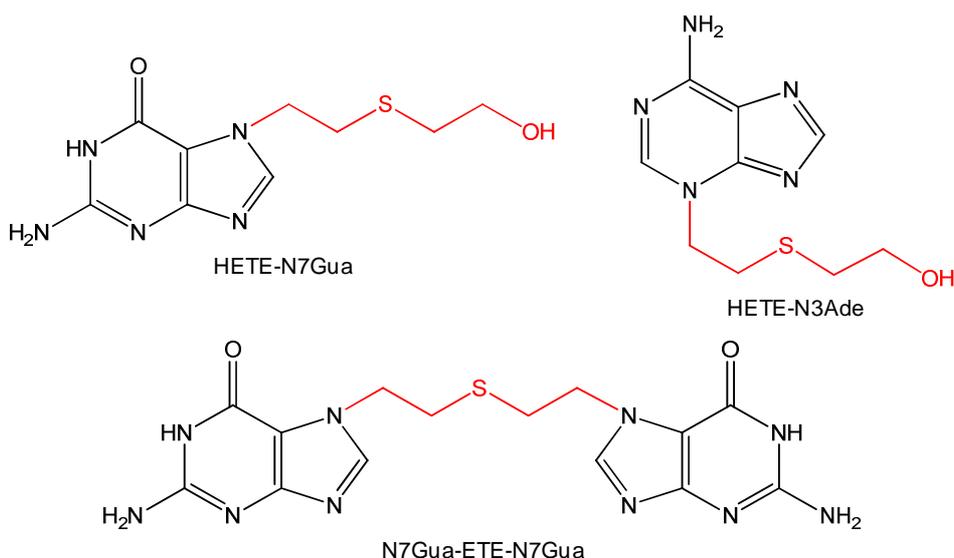


Schéma 28 : Structures chimiques des adduits de l'ypérite

Les deux monoadduits, c'est-à-dire qu'une seule molécule d'ypérite interagit avec une seule base de l'ADN, concernent les positions N7 de guanine (N7-hydroxyéthylthioéthyl-guanine ou HETE-N7Gua) et N3 d'adénine (N3-hydroxyéthylthioéthyl-adénine ou HETE-N3Ade). Le biadduit, c'est-à-dire une molécule d'ypérite qui relie deux bases, se forme entre les positions N7 de guanines adjacentes (bis[2-(guanin-7-yl)éthyl] sulfide ou N7Gua-ETE-N7Gua), qu'elles se trouvent sur le même brin d'ADN (pontage intra-brin) ou sur des brins opposés (pontage inter-brin).

Les positions de la guanine et de l'adénine sur lesquelles se fixe l'ypérite une fois cyclisée en ion épisulfonium provoquent l'apparition d'une charge positive sur l'atome d'azote ayant réagi, ce qui fragilise la liaison N-glycosidique et conduit à sa rupture.

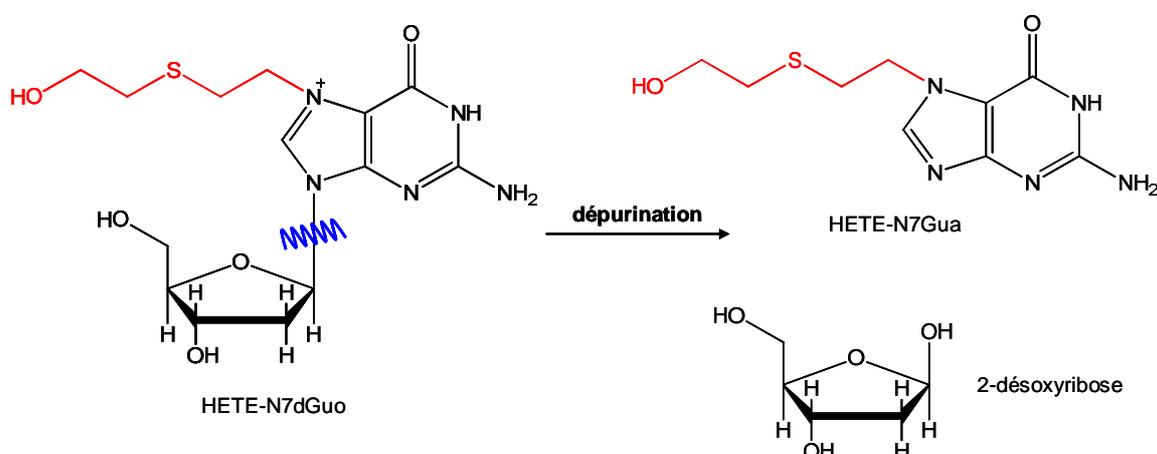


Schéma 29 : Dépurination de la N7-hydroxyéthylthioéthyl-2'-désoxyguanosine en HETE-N7Gua

Contexte bibliographique

Il y a donc libération de la base endommagée (dépurination) et formation d'un site abasique (Schéma 29).

Le temps de demi-vie des adduits à l'ADN au niveau de ces positions particulières, *i.e* le temps à partir duquel la moitié des dommages initialement présents au sein de la double hélice sont dépurinés, est dépendant de différents facteurs comme la taille ou l'électronégativité du substituant (Gates *et al.*, 2004). De plus, la stabilité diffère selon que l'on considère la lésion dans l'ADN double brin ou comme un nucléoside isolé. Il est plus court dans ce dernier. Brookes et Lawley ont pu estimer le temps de demi-vie pour l'adduit en position N7 de guanine, l'adduit majoritairement formé par l'ypérite. Le temps de demi-vie est, à 37°C et pH 7, de 52 h dans la double hélice et de 8h pour le nucléoside isolé (Brookes and Lawley, 1961b; Lawley and Brookes, 1963).

Le CEES, analogue monofonctionnel de l'ypérite, forme uniquement des monoadduits en position N7 de guanine (N7-éthylthioéthyl-guanine ou ETE-N7Gua) et en position N3 d'adénine (N3-éthylthioéthyl-adénine ou ETE-N3Ade) (Schéma 30) (Ludlum *et al.*, 1986; Matijasevic *et al.*, 2001).

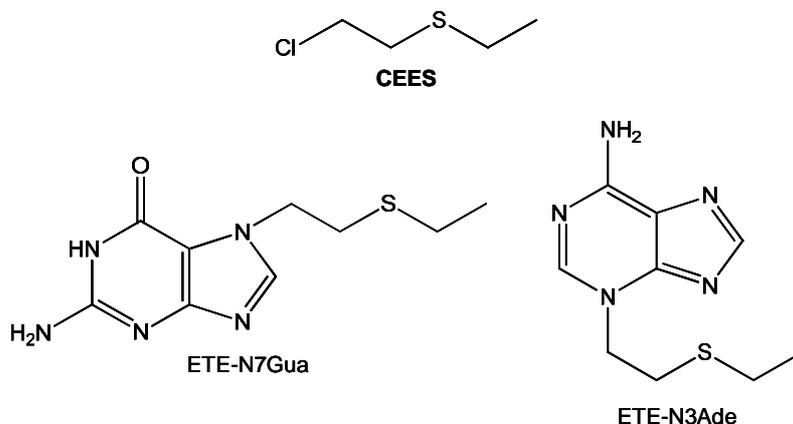


Schéma 30 : Structures chimiques du CEES et des adduits à l'ADN qu'il forme

Ludlum *et al.* ont également montré que cet analogue formait un adduit en position O6 de guanine en très faible quantité (Ludlum *et al.*, 1986; Ludlum *et al.*, 1984). Ce dernier, synthétisé et caractérisé par Fidler *et al.* n'a pas été détecté après traitement de sang *ex vivo* à l'ypérite. En revanche, ces chercheurs ont pu quantifier les trois adduits (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua) décrits par Brookes et Lawley (Fidler *et al.*, 1994).

La détermination de la distribution relative de ces adduits est un des objectifs de cette thèse. Une synthèse plus détaillée des connaissances sur la formation de ces lésions sera présentée plus tard (voir p.115).

3. Conséquences biologiques des modifications de l'ADN

Les modifications de la structure de la double hélice, qu'elles soient d'origine endogène ou exogène, vont avoir des conséquences multiples qui sont généralement négatives (Hoeijmakers, 2001). La conséquence immédiate des modifications de l'ADN est leur reconnaissance, notamment lors de la réplication, par la voie dite de réponse aux dommages à l'ADN qui s'apparente à un réseau de voies de signalisation interagissant entre elles (Zhou and Elledge, 2000). Les lésions de l'ADN sont reconnues par des senseurs comme la protéine RPA (« replicative protein A ») qui est impliquée dans la reconnaissance des cassures simple brin (Li *et al.*, 2013). Les senseurs activent alors des protéines transductrices du signal comme les protéines ATM (« ataxia telangiectasia mutated ») et ATR (« ataxia telangiectasia mutated and rad3-related ») qui jouent un rôle central dans la réponse aux dommages à l'ADN (Zhou and Elledge, 2000). La protéine ATM est plutôt mobilisée dans la transduction du signal des cassures doubles brin tandis que la protéine ATR est recrutée dans celle des cassures simples brin. Ce sont toutes deux des kinases, c'est-à-dire des enzymes catalysant le transfert d'un groupement phosphate, ayant pour cibles d'autres kinases dont les « checkpoints kinase » 1 et 2 (Chk1 et 2). Celles-ci vont à leur tour phosphoryler des protéines effectrices comme p53. Dans des conditions physiologiques normales, p53 est rarement détectée. En revanche, dans des conditions de stress comme la présence de lésions de l'ADN, la concentration de la protéine p53 est augmentée (Vogelstein *et al.*, 2000). Une fois activées, les protéines effectrices vont moduler l'expression génique et l'activité de nombreuses protéines conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN ou la mort cellulaire. S'il arrive que les dommages à l'ADN ne soient pas correctement réparés, voire pas réparés du tout, et ce sans engendrer une mort cellulaire, ils peuvent alors être, sous certaines conditions, à l'origine d'une initiation d'un processus cancéreux.

3.1. Arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire aboutit à la division cellulaire qui est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent (Meijer, 2003). La division cellulaire est assurée au cours de la mitose qui est précédée par l'interphase, étape pendant laquelle le matériel génétique est dupliqué. La phase dite G0 correspond à un état de quiescence des cellules, c'est-à-dire qu'elles ne se divisent

Contexte bibliographique

pas. Sous l'action de signaux mitogènes, elles entrent dans le cycle de division cellulaire qui est composé de quatre phases successives : les phases G1, S, G2 et M (Schéma 31). La phase G1 (« gap » ou intervalle 1) est une phase préparatrice à la phase S au cours de laquelle l'ADN est répliqué. Pendant la phase G1, les cellules passent par ce qui est nommé le point de restriction qui correspond à un point de non retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé, et ce indépendamment de la présence de signaux mitogènes (Meijer, 2003). La phase G2 (« gap » ou intervalle 2) est une phase préparatrice de la phase M ou mitose pendant laquelle le processus de division de la cellule mère en deux cellules filles identiques, débuté par la rupture de l'enveloppe nucléaire et achevé par la cytokinèse, a lieu. La phase G2 est marquée par l'assemblage des constituants mécaniques permettant la migration des chromosomes. L'entrée des cellules dans une phase donnée n'est possible que si la précédente est terminée. Cette coordination est rendue possible par l'action régulée et transitoire de trois types de protéines : les cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (« cyclin-dependent kinase » ou CDK) et les inhibiteurs de ces dernières (« CDK inhibitors » ou CDKi).

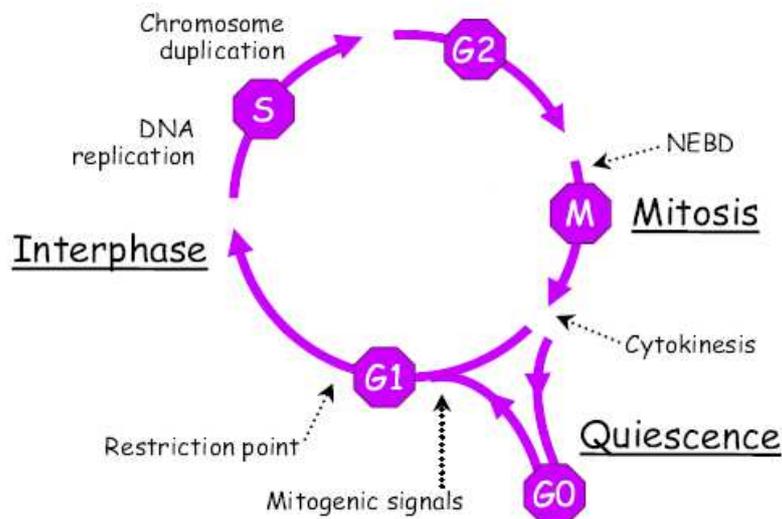


Schéma 31 : Les quatre phases du cycle cellulaire

(adapté de Meijer, 2003)

Les dommages à l'ADN peuvent avoir différentes conséquences en fonction de la phase du cycle cellulaire pendant laquelle ils se produisent (Kaufmann and Paules, 1996). Ainsi, un dommage apparaissant pendant la phase G1 ou S peut entraîner une erreur dans la réplication de l'ADN pouvant aboutir à l'apparition de mutations. Pendant la mitose, l'apparition de

Contexte bibliographique

dommages comme les cassures peuvent-être à l'origine d'aberrations chromosomiques (nombre et/ou structure des chromosomes anormal).

Pour pallier à ces effets, il existe des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire également appelés « checkpoints » qui sont sous le contrôle des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, notamment les kinases ATM, ATR, Chk1 et 2. Ces « checkpoints » permettent l'arrêt du cycle cellulaire en bloquant la transition G1/S ou la transition G2/M (Schéma 32) (Meijer, 2003).

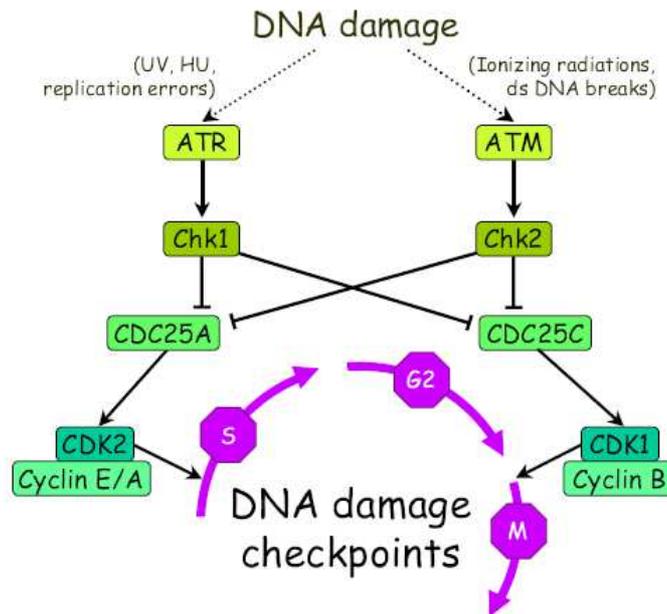


Schéma 32 : Blocage du cycle cellulaire en G1/S ou G2/M en réponse à l'apparition de dommages à l'ADN

Consécutivement à la formation de lésions à l'ADN, il y a activation des protéines ATM et ATR qui phosphorylent et activent Chk1 et Chk2. Elles phosphorylent à leur tour les phosphatases CDC25A et CDC25C qui sont alors inactives. L'inactivation de ces dernières inhibe respectivement la déphosphorylation de CDK2 et CDK1, leur activation et par suite aboutit au blocage du cycle cellulaire en G1/S et G2/M (d'après Meijer, 2003).

Ces mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'altération de la séquence de la double hélice permettent à la cellule soit de les réparer, soit s'ils sont trop nombreux de déclencher sa propre mort (Friedberg, 2003).

3.2. La réparation des dommages à l'ADN

La réparation des dommages fait intervenir plusieurs mécanismes qui assurent la restauration fidèle de la séquence d'ADN. Ils s'accompagnent d'une modification chimique suivie ou non par une nouvelle synthèse de brin.

3.2.1. Mécanismes de réparation fidèle

Les mécanismes de réparation fidèle de l'ADN sont au nombre de cinq et sont spécialisés dans la prise en charge d'un ou plusieurs types de dommages. Toutefois, une même lésion peut être traitée par différents mécanismes, permettant ainsi aux cellules de pallier la défaillance de l'une des voies (ou système) de réparation.

3.2.1.1. La réparation par réversion directe

Chez les mammifères, seules les O6-méthylguanines sont prises en charge par le système de réparation par réversion directe via l'intervention de l'enzyme O6-alkylguanine transférase (AGT) qui catalyse le transfert du groupement méthyle sur l'une de ses cystéines (Schéma 33) (Scharer, 2003). Ce transfert est irréversible, l'AGT étant ensuite ubiquitinylée et rapidement dégradée par le protéasome (Xu-Welliver and Pegg, 2002).

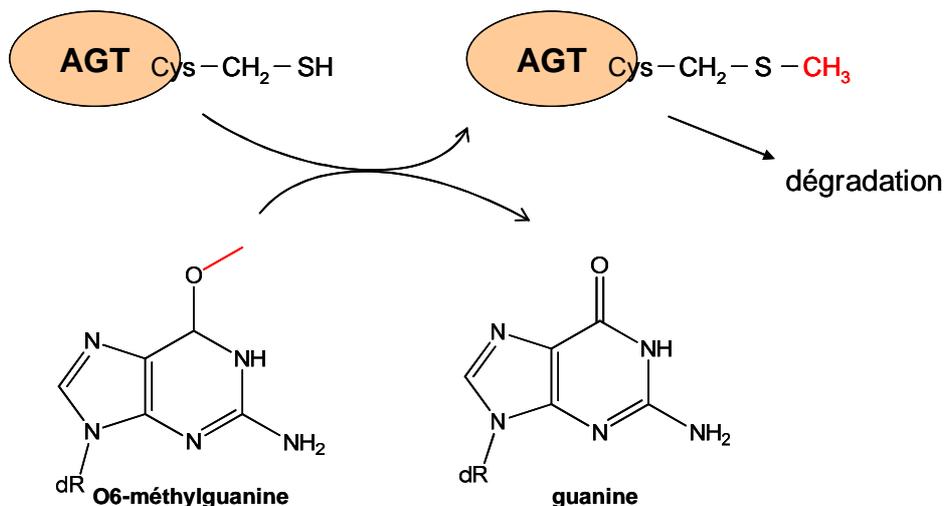


Schéma 33 : Réparation de la O6-méthylguanine par l'AGT

Contexte bibliographique

Chez les procaryotes et les eucaryotes inférieurs, les dimères de pyrimidine sont également réparés par réversion directe et plus précisément par l'action de photolyases (Carell *et al.*, 2001; Sancar, 2000)

3.2.1.2. La réparation des mésappariements

La réplication est un processus hautement complexe et précis avec un taux d'erreur d'un nucléotide pour dix milliards (Kunkel, 1992; Scharer, 2003). Lors de celle-ci, les ADN polymérase introduisent environ une erreur pour 10^5 nucléotides. Une partie de ces mésappariements est corrigée par les ADN polymérase qui, grâce à leur activité exonucléasique 3'-5' ou édition, sont à même d'exciser le nucléotide nouvellement ajouté si celui-ci n'est pas correctement apparié au brin matrice. En tenant compte de leur activité exonucléasique 3'-5', les ADN polymérase génèrent une erreur pour 10^7 nucléotides. Le facteur restant pour arriver à un taux d'erreur d'un nucléotide pour 10^{10} est dû au système de réparation des mésappariements (« mismatch repair » ou MMR) (Schéma 34) (Fukui, 2010; Hoeijmakers, 2001; Pourquier, 2006; Scharer, 2003; Stojic *et al.*, 2004). La reconnaissance de ces derniers, qui engendre une distorsion de la double hélice, est médiée par les protéines MSH6 et MSH2 sous la forme d'un hétérodimère appelé aussi MutS α . De plus, le système de réparation des mésappariements intervient aussi dans la réparation de petites insertions ou délétions, qui sont à l'origine de la formation de boucles extra-hélicoïdales, en impliquant les protéines MSH2 et MSH3 sous forme hétérodimérique (MutS β). Une fois formé, MutS α change de conformation en consommant de l'ATP. Il recrute alors un autre hétérodimère composé des protéines MLH1 et PMS2 ou MutL α . Ce recrutement est également consommateur d'énergie sous forme d'ATP. Le complexe formé par MutS α et MutL α « glisse » le long de la double hélice à distance du mésappariement jusqu'à une discontinuité et recrute alors une exonucléase permettant ainsi la dégradation du brin qui contient le nucléotide mal apparié et qui correspond au brin en cours de synthèse. Le mécanisme par lequel le complexe de réparation reconnaît ce dernier n'est pas élucidé chez les eucaryotes. Chez les procaryotes, en revanche, des séquences spécifiques d'ADN au niveau du brin parental sont méthylées et permettent cette distinction. Le brin parental est lui protégé de l'activité exonucléasique grâce à la présence de protéines RPA s'y fixant. Une fois le mésappariement excisé, il y a une nouvelle synthèse du brin avec formation du complexe de réplication contenant hélicase, polymérase et PCNA (pour « proliferating cell nuclear

Contexte bibliographique

antigen). Cette dernière permet d'augmenter la vitesse de synthèse par les polymérase. La continuité de la double hélice est enfin assurée par une ligase.

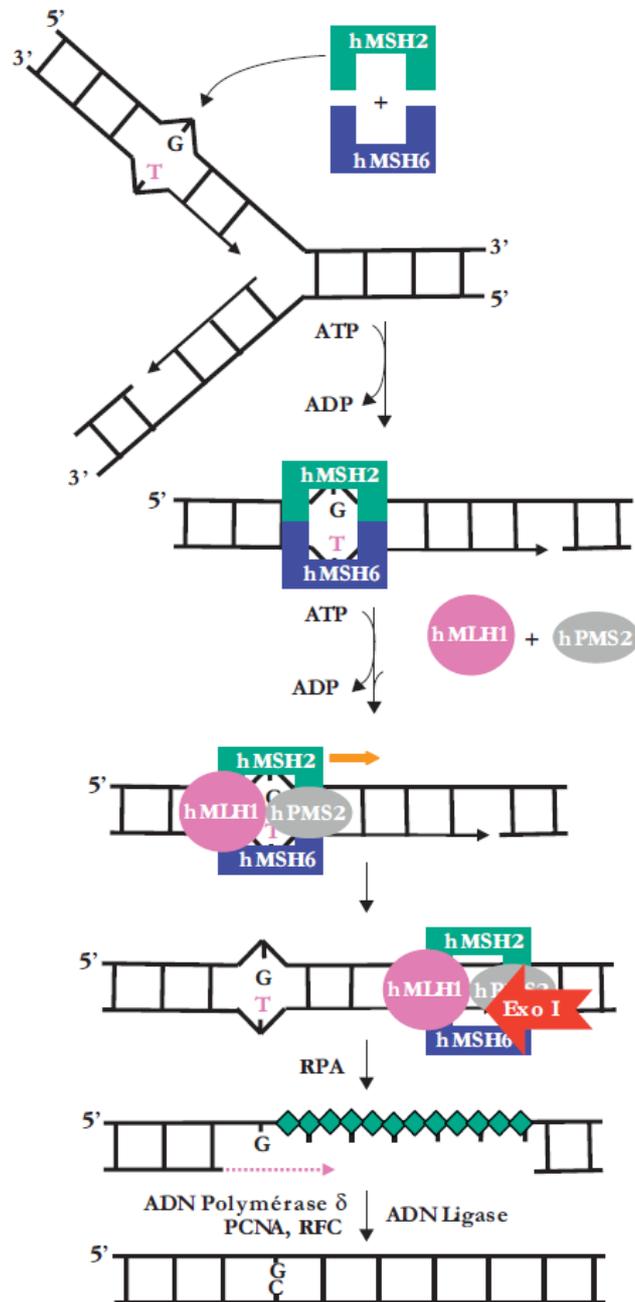


Schéma 34 : Mécanisme d'action du système de réparation des mésappariements avec l'exemple G-T

(d'après Pourquier, 2006)

3.2.1.3. La réparation par excision de bases

La réparation par excision de bases (« base excision repair » ou BER) (Schéma 35) est un système impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN de petite taille comme l'uracile provenant de la désamination de la cytosine, les bases méthylées ou oxydées ainsi que dans celle des cassures simples brins (Hoeijmakers, 2001; Pourquier, 2006; Robertson *et al.*, 2009).

La réparation des dommages par le BER peut être décomposée en 4 ou 5 étapes avec l'intervention séquentielle de 4 types de protéine : ADN-N-glycosylase, AP (apurinic) endonucléase 1 (APE1) ou AP lyase, ADN polymérase et ADN ligase (Hoeijmakers, 2001; Robertson *et al.*, 2009). Ces dommages sont reconnus et clivés par des glycosylases qui coupent la liaison N-glycosidique. A ce jour, 11 glycosylases humaines ont été identifiées et chacune reconnaît spécifiquement un ou plusieurs types de dommages (Robertson *et al.*, 2009). Par exemple, l'uracile ADN glycosylase, dont la découverte de l'activité chez *Escherichia coli* a été à l'origine de celle du BER, ne reconnaît et clive que l'uracile (Lindahl, 1974). Pour cliver une base endommagée, les glycosylases l'extraient de la double hélice par compression du squelette sucre-phosphate (Hoeijmakers, 2001). La base se trouve alors dans une cavité interne de la protéine qui clive la liaison N-glycosidique séparant ainsi la base du sucre ce qui génère un site abasique (étape 1). Ce dernier est pris en charge par APE1 qui hydrolyse la liaison phosphodiester du côté 5' du site abasique générant une interruption de brin (étape 2) avec de part et d'autre une extrémité 3'-hydroxyle et une autre 5'-désoxyribose phosphate.

Les clivages de la base et du site abasique peuvent-être assurés par des glycosylases dites bifonctionnelles par opposition aux précédentes qui sont monofonctionnelles. Les glycosylases bifonctionnelles possèdent, comme leur nom l'indique, deux activités enzymatiques, une activité glycosylase et une autre AP lyase qui permet d'hydrolyser le site abasique de son côté 3' (fusion des étapes 1 et 2). On distingue deux types de glycosylases bifonctionnelles selon le type d'élimination réalisée et par suite la nature des interruptions de brin formés (Wiederhold *et al.*, 2004). Celles qui effectuent une β -élimination engendrent une interruption de brin avec des extrémités 3'-aldéhyde insaturé et 5'-phosphate tandis que celles qui opèrent une β,δ -élimination causent la formation d'une interruption de brin avec des extrémités 3' et 5'-phosphate.

L'étape suivante consiste à combler l'interruption de brin, ce qui nécessite l'intervention d'une polymérase, l'ADN polymérase β . Pour effectuer la synthèse, il lui faut, comme pour toutes les ADN polymérases, des extrémités 3'-hydroxyle et 5'-phosphate. Dans le cas de la

Contexte bibliographique

formation de l'interruption de brin par APE1, c'est l'ADN polymérase β qui clive le désoxyribose à l'origine d'une extrémité 5'-phosphate (étape 3). Dans le cas des β - et β,δ -éliminations réalisées par les glycosylases bifonctionnelles, ce sont respectivement APE1 et la polynucléotide kinase (PNK) qui génèrent une extrémité 3'-hydroxyle à travers le clivage de l'aldéhyde insaturé et du groupement phosphate précédemment formés. L'ADN polymérase β ajoute alors le nucléotide manquant (étape 4) et la continuité du brin est restaurée par l'action du complexe XRCC1/ADN ligase III (étape 5).

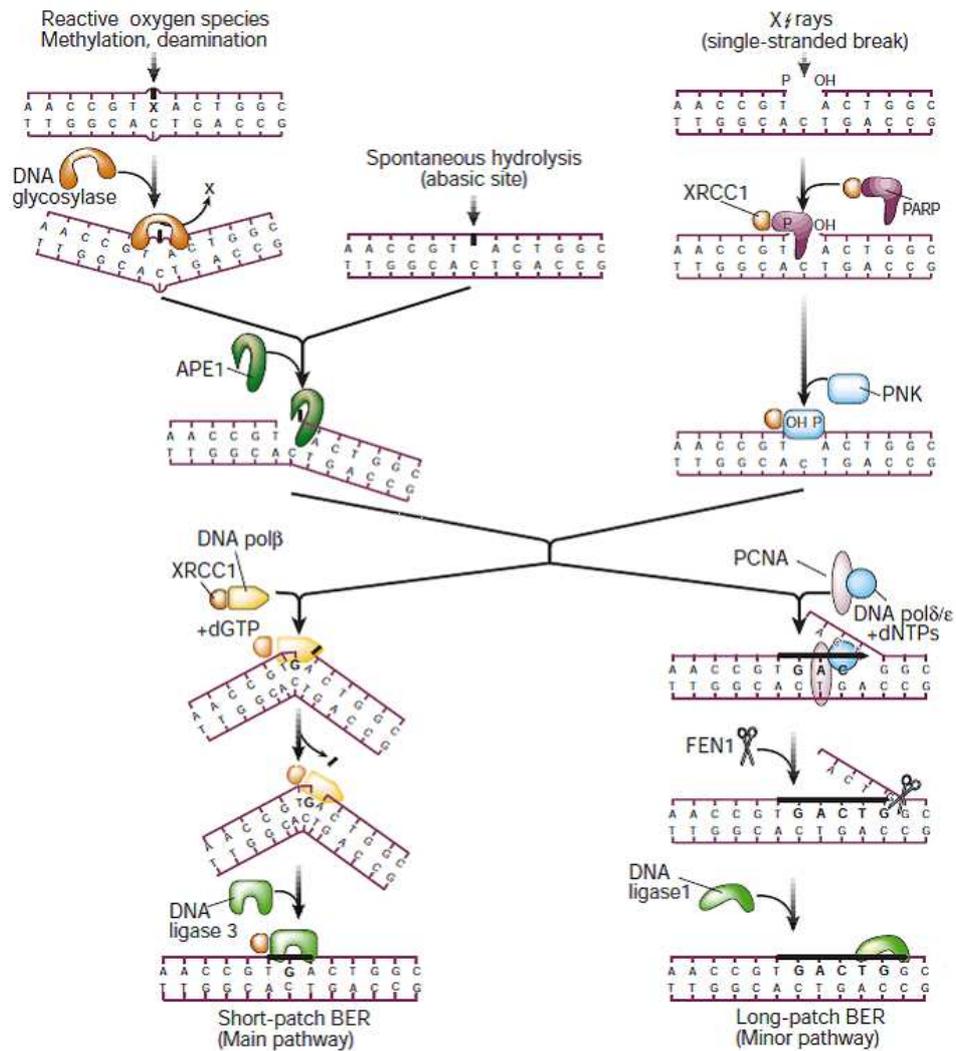


Schéma 35 : Fonctionnement du BER via l'exemple d'une base endommagée et d'une cassure simple brin

(adapté de Hoiejmakers, 2001)

La voie de réparation par excision de bases décrite ci-dessus et consistant à remplacer seulement le nucléotide endommagé correspond à la voie courte (« short patch BER ») qui est

Contexte bibliographique

majoritaire (Hoeijmakers, 2001). Il existe une autre voie, la voie longue (« long patch BER ») qui, elle, implique après la formation du site abasique les ADN polymérases δ et ϵ ainsi que PCNA. Ce complexe synthétise alors de 2 à 6 nucléotides créant ainsi un chevauchement ou « flap » du brin contenant la base endommagée qui est éliminé par l'endonucléase FEN1 (flap endonuclease 1). L'ADN ligase 1 permet de restaurer la continuité du brin nouvellement synthétisé (Hoeijmakers, 2001; Pourquier, 2006; Robertson *et al.*, 2009; Scharer, 2003).

Une cassure simple brin induit le BER via la reconnaissance effectuée par la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et XRCC1. PNK est alors recruté et permet de générer les extrémités 3'-hydroxyle et 5'-phosphate nécessaires à la resynthèse via le short ou le long patch BER (Hoeijmakers, 2001; Pourquier, 2006).

Le mécanisme qui mène à la réparation par excision de bases par la voie courte ou la voie longue n'est pas élucidé (Robertson *et al.*, 2009). Quelques hypothèses ont été émises dont une indiquant que le choix de la voie, courte ou longue, dépend de la concentration en ATP près du site abasique qui serait modulée par XRCC1 et l'ADN ligase III. Ainsi, une faible concentration en ATP favoriserait la voie longue alors qu'une concentration élevée de cette dernière avantagerait la voie courte (Petermann *et al.*, 2003).

3.2.1.4. La réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision de nucléotides (« nucleotide excision repair » ou NER) prend en charge les lésions volumineuses générées par exemple par les UV. Du fait de sa polyvalence, elle assure la réparation d'un grand nombre de lésions (Hoeijmakers, 2001; Sancar, 1996; Scharer, 2003). Le NER met en jeu une trentaine d'acteurs protéiques dont les protéines XP (Pourquier, 2006; Scharer, 2003). XP dérive de Xeroderma pigmentosum qui correspond à une maladie récessive rare se caractérisant par une hypersensibilité aux UV due à une déficience des protéines XP. Il existe deux systèmes de réparation par excision de nucléotides, le GG-NER (pour « global genome NER ») et le TC-NER (pour « transcription-coupled NER »). Le GG-NER (Schéma 36) est impliqué dans la réparation des lésions volumineuses dans l'ensemble du génome tandis que le TC-NER est chargé de ces mêmes lésions au niveau des séquences d'ADN transcrites (Hoeijmakers, 2001; Scharer, 2003). Ces deux systèmes diffèrent par la reconnaissance des dommages. Pour le GG-NER, la reconnaissance des lésions passe par un processus en deux étapes avec tout d'abord la reconnaissance de la distorsion de la double hélice engendrée par la lésion volumineuse puis

Contexte bibliographique

la vérification de la présence effective de cette dernière (Hess *et al.*, 1997). La reconnaissance de la distorsion de l'hélice seule n'est pas suffisante. En effet, les mésappariements créent également une distorsion mais ne sont pas pris en charge par le NER (Hess *et al.*, 1997). C'est le complexe protéique XPC-hHR23B qui est à l'origine de la reconnaissance des lésions pour le GG-NER. Le TC-NER a, quant à lui, été initialement découvert sur la base d'observations illustrant une réparation plus rapide des lésions bloquant le processus de transcription (Bohr *et al.*, 1985). Les auteurs de cette étude ont en effet montré que plus des deux-tiers des dimères de pyrimidines dans le gène de la dihydrofolate réductase étaient excisés 26 h après irradiation alors que seulement 15% de ces dommages l'ont été dans des séquences non transcrites. Le TC-NER reconnaît donc des lésions dites bloquantes. Cette reconnaissance met en jeu deux protéines spécifiques, CSB et CSA (pour Cockayne syndrome A et B). La suite des événements conduisant à l'excision du dommage et la resynthèse subséquente est commune aux deux systèmes (Scharer, 2003).

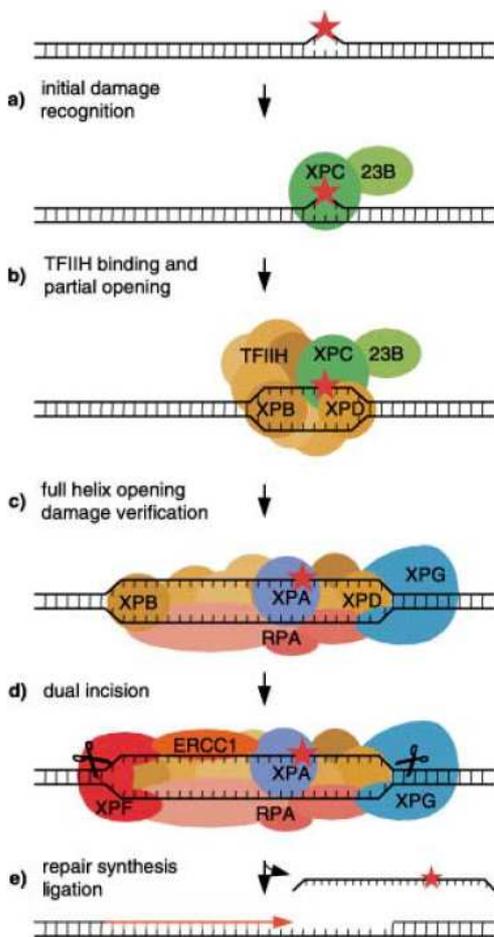


Schéma 36 : Mécanisme d'action du GG-NER
(d'après Sharer, 2003)

Une fois la reconnaissance des lésions effectuées, il y a recrutement du facteur de transcription TFIIH, complexe multiprotéique constitué notamment de deux hélicases XPB et

XPD qui permettent l'ouverture de la double hélice. TFIIH assure le recrutement d'autres facteurs protéiques dont XPA, RPA et l'endonucléase XPG. XPA et RPA, qui se lie au brin non endommagé, sont impliquées dans la localisation du dommage. Avec XPG, ces deux dernières participent à l'augmentation de l'ouverture de la double hélice sur une trentaine de paires de bases ainsi qu'à sa stabilisation. XPA participe également au recrutement du complexe XPF-ERCC1 qui possède une activité endonucléase. Le complexe de pré-incision est ainsi formé. Il y a alors coupure d'un oligonucléotide de 24 à 32 paires de base comprenant la lésion. Celle-ci est effectuée par XPG du côté 3' du dommage et par XPF-ERCC1 du côté 5'. La synthèse et la ligature sont assurées par l'ADN polymérase δ/ϵ , PCNA et l'ADN ligase I.

3.2.1.5. La réparation par recombinaison de l'ADN

La réparation par recombinaison prend en charge les cassures double brins de l'ADN pouvant être causées par les rayonnements ionisants, des agents chimiques ou encore lors de la réplication d'une cassure simple brin (Hoeijmakers, 2001). Des cassures double brins peuvent être également formées lors de la réplication d'adduits. Il existe deux systèmes de réparation par recombinaison, la recombinaison homologue et la suture non homologue. Ils diffèrent notamment par la nécessité ou non de la présence d'une matrice d'ADN homologue pour effectuer la réparation de la cassure double brin, présence qui est intimement liée à la phase du cycle cellulaire pendant laquelle le dommage est pris en charge (van Gent *et al.*, 2001).

La recombinaison homologue (« homologous recombination » ou HR) (Schéma 37) est un processus hautement complexe qui emploie une séquence d'ADN homologue intacte servant de matrice à la réparation. Généralement, cette séquence est identique et est située au niveau du chromatide sœur. La séquence utilisée pour la recombinaison homologue peut aussi se trouver sur le chromosome homologue au niveau duquel elle n'est pas forcément identique à la séquence lésée (Scharer, 2003). La reconnaissance des cassures doubles brins est médiée par ATM qui phosphoryle l'histone H2AX (Garcia-Canton *et al.*, 2012). ATM phosphoryle également NSB1 qui fait partie d'un complexe protéique, le complexe MRN. Celui-ci est composé, en plus de NSB1, des protéines RAD50 et MRE11. La phosphorylation de NSB1 par ATM entraîne le recrutement du complexe MRN aux extrémités de la cassure. Grâce à son activité exonucléasique 5'-3', ce complexe génère la formation de deux extrémités simple

Contexte bibliographique

brin 3' qui sont immédiatement protégées de l'action des nucléases par recouvrement de RPA (Pourquier, 2006). La recombinaison à proprement parler est réalisée par la protéine RAD51 qui possède une activité recombinase. Elle se polymérise et forme sur chacun des brins un nucléofilament protéique avec la collaboration de nombreuses protéines comme BRCA1, BRCA2, RPA, RAD52, ainsi que celle de ses paralogues (XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C et RAD51D) (van Gent *et al.*, 2001). Les nucléofilaments protéiques formés se mettent alors à la recherche de la séquence homologue sur le chromatide sœur. Une fois trouvée et sous la stimulation de RAD52 et RAD54, ils forment des jonctions de telle sorte que chacun des brins tronqués se retrouve en face de d'un des deux brins intacts du chromatide sœur. Ces derniers servent alors de matrice à la synthèse d'ADN par des polymérases précédant la fermeture des brins par une ligase.

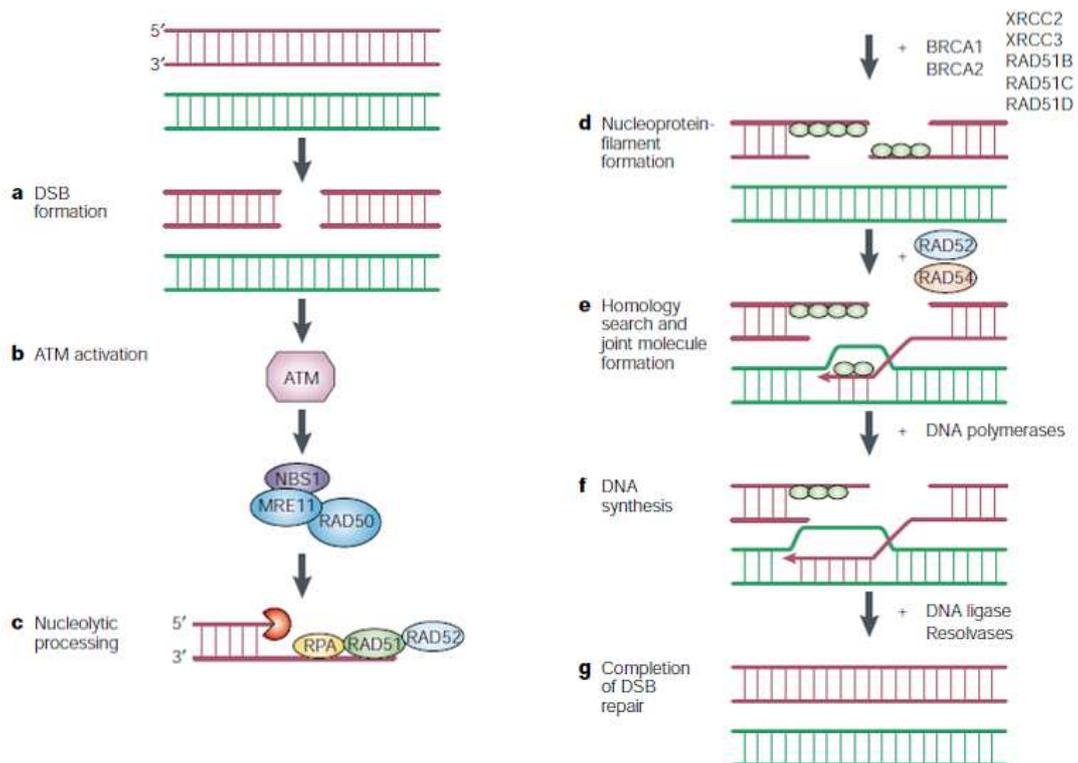


Schéma 37 : Mécanisme de la recombinaison homologue

(d'après van Gent, 2001)

La restauration des deux fragments d'ADN originaux, se trouvant enchevêtrés à l'issue de la synthèse (on parle de jonction de Holliday), est assurée par l'action de résolvases (Pourquier, 2006). La recombinaison homologue permet donc la restauration de l'intégrité de la séquence ayant subi une cassure double brins de manière fidèle. Elle est surtout importante dans les

Contexte bibliographique

cellules prolifératives lors des phases S et G2 du cycle cellulaire pendant lesquelles les chromatides sœurs sont disponibles (Scharer, 2003).

La recombinaison non homologue ou suture par jonctions d'extrémités (« non homologous end-joining » ou NHEJ) (Schéma 38) apparaît, quant à elle, plus importante dans les cellules en quiescence ou lors de la phase G1 des cellules en division (Scharer, 2003). Outre la réparation des cassures double brins causées par des agents physiques ou chimiques, elle est également active pour celles générées lors de la recombinaison V(D)J, processus à l'origine de la synthèse d'une immense variété d'anticorps (van Gent *et al.*, 2001). Par opposition à la HR, le NHEJ n'utilise pas de matrice pour effectuer la réparation de la cassure.

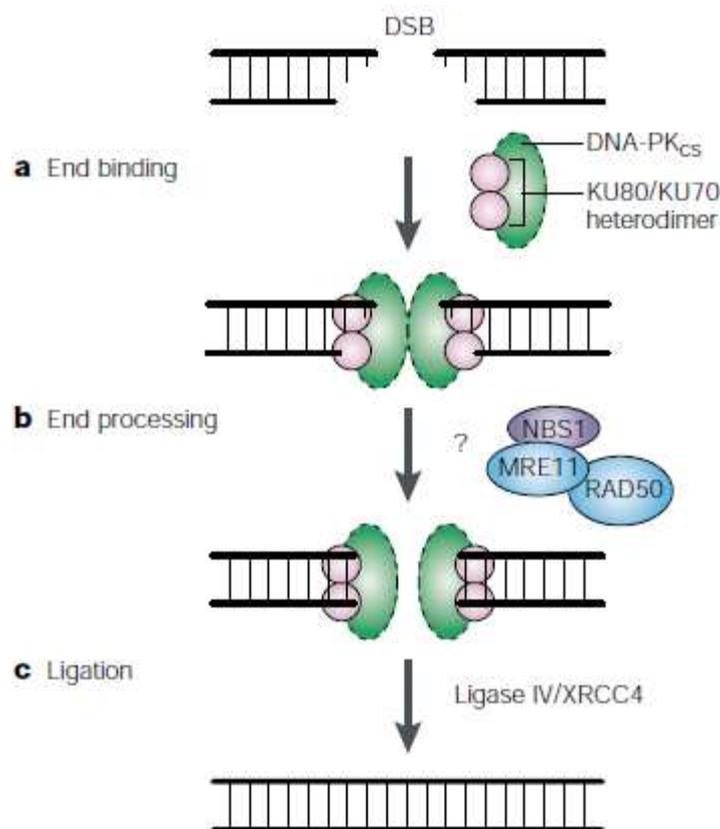


Schéma 38 : Mécanisme d'action du NHEJ

(d'après van Gent, 2001)

Il fait intervenir les protéines Ku70 et Ku80 sous la forme d'un hétérodimère qui possède une grande affinité pour les extrémités formées par les cassures double brin. Cet hétérodimère recrute alors DNA-PK (pour « DNA-dependent protein kinase ») qui va se phosphoryler et provoquer la phosphorylation d'autres protéines dont Ku70-Ku80. Le complexe formé par Ku70-Ku80 et DNA-PK va alors procéder à la juxtaposition des extrémités. Celles-ci vont

être préparées en vue de leur jonction effectuée par le complexe ADN ligase IV-XRCC4. La préparation des extrémités, pour laquelle le rôle du complexe MRN n'est pas très bien connu, s'accompagne systématiquement par l'addition ou la délétion de nucléotides (van Gent *et al.*, 2001). Le NHEJ constitue donc un système de réparation infidèle.

3.2.2. La synthèse translésionnelle

La synthèse translésionnelle correspond à un mécanisme de tolérance des lésions, c'est-à-dire qu'il est capable d'outrepasser le blocage causé par certains types de dommages lors du processus de réplication (Friedberg *et al.*, 2005). Sa découverte tient à celle d'ADN polymérase spécifiques. Elles diffèrent des autres ADN polymérase par la configuration de leur site actif qui est plus ouvert. Cette caractéristique est une explication plausible quant à leurs capacités à faire face à plusieurs types de dommages (Yang, 2003). Elles possèdent, en outre, d'autres singularités comme leur faible fidélité lors de la réplication d'ADN non endommagé, l'absence d'activité exonucléasique 3'-5' permettant l'édition (Kunkel *et al.*, 2003) ou encore leur tendance à former des mésappariements (Goodman, 2002). La poursuite de la réplication par ces ADN polymérase peut aboutir soit à l'incorporation du bon nucléotide en face du dommage soit à celle d'un nucléotide mal apparié. Dans le cas des CPD et plus particulièrement des CPD de thymine, lésion bloquant la réplication, l'ADN polymérase η incorpore face à elle le bon nucléotide, à savoir la désoxyadénosine monophosphate (dAMP) (Masutani *et al.*, 2000). Cette même polymérase serait également impliquée dans la synthèse translésionnelle d'autres types de dommages comme les sites abasiques en face desquels elle incorpore préférentiellement une dAMP ou une désoxyguanosine monophosphate (dGMP) (Masutani *et al.*, 2000). En revanche, en l'absence de l'ADN polymérase η , situation rencontrée chez les patients atteints d'une forme variante de *Xeroderma pigmentosum* pour laquelle les gènes du NER ne sont pas atteints (soit environ 20%), la synthèse translésionnelle outre les CPD serait médiée par d'autres polymérase. Ces dernières incorporent des nucléotides incorrectes causant l'apparition de mutations qui participent au développement de cancers (Kannouche and Strydom, 2003). Parmi les autres polymérase spécifiques de la synthèse translésionnelle, citons les ADN polymérase ι , κ et θ qui sont impliquées dans le déblocage de la transcription causée respectivement par les dommages oxydatifs, les adduits aromatiques et les sites abasiques (Pourquier and Robert, 2011). La synthèse translésionnelle, quel que soit le dommage considéré, implique un

changement de l'ADN polymérase bloquée par une polymérase spécifique (Friedberg *et al.*, 2005).

Chez les procaryotes, l'arrêt de la réplication suite à la rencontre d'un dommage par l'ADN polymérase III provoque la dissociation de la pince β (équivalent de PCNA) qui entraîne celle du complexe de réplication. Il y a alors association de la pince β avec l'ADN polymérase V, qui est capable d'assurer la synthèse translésionnelle de plusieurs types de dommages (Fujii and Fuchs, 2004). La protéine RecA est également impliquée dans ce processus (Fujii and Fuchs, 2004; Schlacher *et al.*, 2005). Suite à l'incorporation d'un nucléotide, correct ou pas, l'ADN polymérase V peut continuer la réplication.

En revanche, chez les eucaryotes, la synthèse translésionnelle ne concerne que l'incorporation d'un ou deux nucléotides. Il a par exemple été montré que la probabilité de la dissociation de l'ADN polymérase η était faible en face d'un dimère de thymine mais qu'elle augmentait de quelques nucléotides après ce dernier (McCulloch *et al.*, 2004). Il y a donc deux changements de polymérase, le premier étant occasionné par l'arrêt de la réplication du au dommage et le second concerne celui de l'ADN polymérase ayant assuré la synthèse translésionnelle. Pour le premier changement, il semblerait que les protéines Rad6 et Rad18 soient impliquées dans l'ubiquitinylation de PCNA entraînant une augmentation d'affinité pour les polymérases spécifiques comme l'ADN polymérase η (Kannouche and Lehmann, 2004). Rev1, qui fait également partie des ADN polymérases spécifiques, serait à l'origine du second changement notamment grâce à sa capacité à interagir avec plusieurs d'entre elles (Friedberg *et al.*, 2005).

Qu'ils soient dus à une absence de réparation ou à une réparation infidèle, les dommages à l'ADN, s'ils ne conduisent pas à la mort cellulaire (voir p.93), constituent des mutations pouvant être à l'origine de l'induction d'un processus cancéreux.

3.3. De la mutation au cancer

Les mutations, dues à des modifications endogène ou exogène de l'ADN, sont de différentes natures : substitution (remplacement d'un nucléotide par un autre), insertion (addition d'un ou plusieurs nucléotides) ou délétion (suppression d'un ou plusieurs nucléotides). Elles ont différentes conséquences en fonction de la position dans le génome ou

Contexte bibliographique

elles surviennent. Si les mutations apparaissent dans une séquence non codante, elles seront la plupart du temps sans conséquences mais peuvent parfois empêcher le mécanisme d'épissage ou la fixation de facteurs de régulation. Les mutations apparaissant dans une séquence codante et affectant le cadre de lecture, i.e les insertions et les délétions, aboutissent soit à une protéine tronquée soit à une protéine non fonctionnelle. S'il y a insertion ou délétion de 3 nucléotides ou plus (ou un multiple de 3), il y a alors insertion ou délétion d'un ou plusieurs codons. Les mutations apparaissant au niveau d'une séquence codante et n'affectant pas le cadre de lecture, i.e les substitutions, peuvent n'avoir aucun effet du fait de la redondance du code génétique (un même acide aminé peut être codé par plusieurs codons) ou de l'introduction d'un acide aminé aux propriétés similaires, on parle de mutations silencieuses. En revanche si le codon muté est à l'origine de l'incorporation d'un autre acide aminé ou s'il devient un codon stop (signal l'arrêt de la traduction), on parle respectivement de mutation faux-sens et non-sens. La mutation faux-sens est d'autant plus délétère pour les fonctions de la protéine que le nouvel acide aminé est différent de celui qui aurait dû être traduit. La mutation non-sens entraîne la formation d'une protéine tronquée. On distingue deux types de substitutions, les transitions et les transversions. Les transitions concernent le remplacement d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine. Les transversions se caractérisent par la substitution d'une purine par une pyrimidine ou d'une pyrimidine par une purine.

Les mutations constituent un des types d'anomalies génétiques, avec les translocations chromosomiques et les réarrangements géniques, à l'origine d'un processus cancéreux. Le cancer correspond à une prolifération de cellules dérivant toutes d'une même cellule (théorie monoclonale du cancer). Il est de plus décrit comme un processus multi-étapes au cours desquelles il y a accumulation d'altérations géniques. Les mutations génétiques touchent donc des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Celles affectant les oncogènes, gènes codant pour des protéines associées à la prolifération cellulaire (ex : ras, myc), correspondent à des gains de fonction. Celles touchant des gènes suppresseurs de tumeur, gènes codant des protéines associées au frein de la prolifération cellulaire (ex : p53 et pRb), constituent des pertes de fonction. L'altération de la séquence de ces gènes provoque donc la dérégulation des signaux de prolifération cellulaire qui regroupe deux des six caractéristiques de la cellule cancéreuse telles qu'exposées par Hanahan et Weinberg à savoir la résistance à l'apoptose et l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs (Hanahan and Weinberg, 2000).

Contexte bibliographique

Un des moyens mis en place par les cellules, en plus des mécanismes de réparation, pour éviter la transmission des dommages lors de leur division est le déclenchement de leur propre mort.

3.4. La mort cellulaire

Plusieurs types de mort cellulaire ont été décrits comme étant impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (Surova and Zhivotovsky, 2012). Nous exposerons ici l'apoptose et la nécrose.

3.4.1. L'apoptose

L'apoptose correspond à une mort cellulaire programmée qui en plus d'être activée par la signalisation des dommages à l'ADN est également impliquée dans l'homéostasie tissulaire. Ce nom a été introduit pour la première fois par Kerr *et al.* en 1972 pour désigner une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN (générée par une endonucléase qui clive l'ADN en fragments caractéristiques de 180 paires de base), un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire (la phosphatidylsérine passe du côté externe des membranes) (Couzinet *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 1972). L'activité catalytique des caspases (pour « cysteinyl aspartate cleaving proteases ») est à l'origine de ces altérations morphologiques. Il en existe quatorze qui se situent dans le cytoplasme sous forme de zymogène (forme inactive) (Hengartner, 2000). Elles sont toutes constituées d'un prodomaine, d'une petite sous-unité et d'une grande sous-unité contenant le site catalytique. L'activation des caspases est médiée par le clivage successif des deux sous-unités et l'association de deux hétérodimères constitués chacun d'une petite et d'une grande sous-unité. L'enzyme active comprend ainsi deux sites catalytiques. On distingue deux types de caspases en fonction de la longueur de leurs prodomaines, les caspases à prodomaine long ou caspases initiateuses et celles à prodomaine court ou caspases exécutrices. Le prodomaine des caspases initiateuses permet l'interaction avec d'autres protéines. Ces caspases initiateuses sont divisées en deux sous-types, celles contenant le domaine effecteur de mort (« death effector domain » ou DED) comme les caspases 8 et 10 et celles contenant le domaine de recrutement des

Contexte bibliographique

caspases (« caspase recrutement domaine » ou CARD) comme les caspases 2 et 9 (Hengartner, 2000).

Deux grandes voies ont été identifiées pour l'activation des caspases, la voie intrinsèque ou voie mitochondriale et la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. Une présentation simplifiée de chacune de ces deux voies est donnée ci-après.

La voie intrinsèque est caractérisée par la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la chute subséquente du potentiel transmembranaire. C'est l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale qui est à l'origine de la perméabilisation de la mitochondrie. Celui-ci est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2 qui est composée de facteurs pro- (ex : Bax, Bad, Bak, Bid) et anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w). Tous les membres de cette famille sont capables de former des homo- ou des hétérodimères du fait de l'homologie de séquence des domaines BH qu'ils contiennent (Hengartner, 2000). La perméabilisation de la mitochondrie est la résultante de l'augmentation du taux d'homo- ou d'hétérodimères pro-apoptotiques et conduit au largage dans le cytoplasme de plusieurs autres facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C ou AIF (pour « apoptosis inducing factor »). Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome C forme l'apoptosome en s'associant à Apaf-1, la pro-caspase 9 (via le CARD) et l'ATP. La formation de ce complexe permet l'activation de la caspase 9 qui peut alors activer d'autres caspases comme les caspases exécutrices 3 et 7, on parle d'activation en cascade (Couzinet *et al.*, 2002).

La voie extrinsèque fait intervenir une superfamille de récepteurs membranaires caractérisés par la présence dans leur partie intracellulaire d'un domaine de mort (« death domain » ou DD) et dont fait parti Fas. La fixation de Fas-ligand à Fas est consécutive à l'oligomérisation de ce dernier. Une fois Fas activé, il va recruter la protéine FADD (pour « Fas-associated protein with death domain ») via une interaction DD-DD. FADD possède également un DED qui lui permet d'interagir avec la pro-caspase 8. Le complexe formé par Fas, FADD et la pro-caspase 8 est appelé le DISC (« pour death-inducing signaling complex »). La pro-caspase 8 possède une légère activité catalytique et c'est la présence de plusieurs d'entre elles qui permettrait une auto-activation croisée (Hengartner, 2000). Une fois active, elle clive d'autres caspases comme les caspases exécutrices 3, 6 et 7. La signalisation de la voie des récepteurs de mort peut en outre être amplifiée par l'activation de la voie intrinsèque via le recrutement de facteurs pro-apoptotiques comme Bad au niveau de la mitochondrie (Couzinet *et al.*, 2002). A noter que la protéine p53 est impliquée dans le signal apoptotique qu'il soit d'origine intrinsèque ou extrinsèque (Surova and Zhivotovsky, 2012).

3.4.2. La nécrose

La nécrose se produit quand la cellule subit un stress important dont elle ne peut se remettre. Au cours de celle-ci, la cellule est gonflée à cause d'une entrée massive d'eau aboutissant à l'éclatement de la membrane plasmique et des organites. Il y a alors libération d'enzymes lytiques provoquant l'autolyse de la cellule. Contrairement à l'apoptose, les altérations morphologiques caractéristiques de la nécrose conduisent à une réponse inflammatoire (Golstein and Kroemer, 2007; Kepp *et al.*, 2009). La nécrose se caractérise également par une condensation anormale de la chromatine et une fragmentation aléatoire de l'ADN (Dong *et al.*, 1997; McCall, 2010). Longtemps considérée comme une mort cellulaire accidentelle et incontrôlée, la nécrose est au contraire, au même titre que l'apoptose, une mort cellulaire programmée. Toutefois, elle ne correspond pas à une cascade de signalisation bien définie mais plutôt à la conséquence d'une interférence de plusieurs événements moléculaires et biochimiques parmi lesquels la déplétion en ATP, l'augmentation des ERO ou encore l'activation de la kinase RIP1 (Festjens *et al.*, 2006; McCall, 2010).

4. Conséquences de l'alkylation de l'ADN par l'ypérite

L'alkylation de l'ADN par le gaz moutarde est impliquée à la fois dans sa toxicité aiguë et sa toxicité chronique.

4.1. Alkylation de l'ADN et toxicité aiguë de l'ypérite

4.1.1. L'hypothèse de Papirmeister

Papirmeister *et al.* sont les premiers à mettre en avant le rôle clé que constitue l'alkylation de l'ADN par l'ypérite dans sa toxicité aiguë et plus particulièrement dans la formation des phlyctènes (Papirmeister *et al.*, 1985). L'hypothèse de ces chercheurs fait de l'alkylation de l'ADN la première étape d'un mécanisme en cascade conduisant à la mort cellulaire et l'endommagement des tissus (Schéma 39). Suite à l'alkylation de l'ADN, PARP est suractivée. Cette suractivation est due à la reconnaissance des cassures simple brin formées

par des endonucléases qui clivent les sites abasiques générés par la dépurination des bases endommagées. L'action de PARP est notamment d'assurer sa propre modification par poly-(ADP)ribosylation et celle de protéines impliquées dans la réparation. Elle utilise pour cela comme co-facteur le nictotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). La suractivation de PARP provoque donc la déplétion de NAD⁺. Ce dernier est également utilisé par certaines enzymes de la glycolyse. Par conséquent, la déplétion de NAD⁺ provoque l'inhibition de la glycolyse et par suite la diminution de la concentration en ATP ainsi que l'activation du shunt des hexoses monophosphate, d'où l'altération du métabolisme cellulaire. L'activation du shunt des hexoses monophosphate ou voie des pentoses phosphate est associée avec l'augmentation de synthèse de protéases et leur relargage. Celles-ci vont être à l'origine de la séparation de la jonction dermo-épidermique, d'où la formation des phlyctènes au niveau macroscopique.

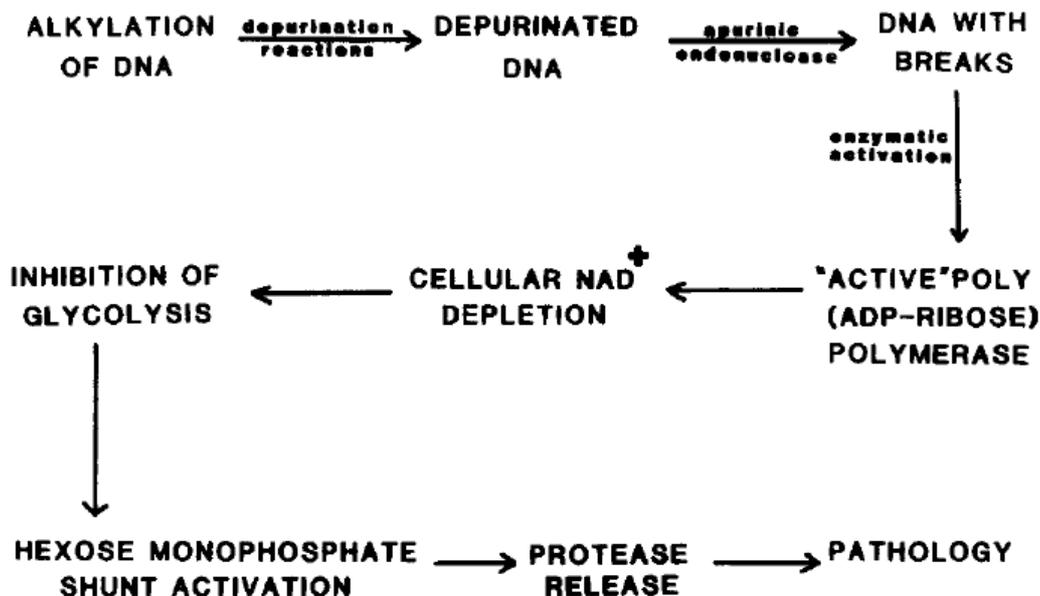


Schéma 39 : Mécanisme proposé par Parpimeister et al. faisant de l'alkylation de l'ADN l'étape initiale de l'endommagement des tissus

(d'après Papirmeister et al., 1985)

Ces chercheurs ont partiellement validé cette hypothèse. La formation des cassures simple brin à partir des sites abasiques causés par la dépurination des bases alkylées a notamment été montrée comme étant essentiellement médiée par l'action d'endonucléases et ce de manière dépendante de la dose et du temps. Ainsi l'ypérite ne formerait pas directement de cassures simples brin. De plus, la diminution de la concentration en NAD⁺, observée dans des explants de peau humaine greffés sur des souris immunodéprimées, a été corrélée avec la sévérité des

Contexte bibliographique

lésions induites par l'ypérite. Quatre heures après exposition, la diminution en NAD⁺ était respectivement de 55, 63 et 77% pour des lésions légères, modérées et sévères. L'emploi d'un inhibiteur spécifique de PARP, le 3-méthoxybenzamide, a permis de prévenir la déplétion du NAD⁺ pour des doses à l'origine de lésions modérées, illustrant de la sorte que cette dernière est bien la conséquence de la suractivation de PARP.

D'autres études ont confirmé la déplétion du NAD⁺ induite par une exposition à l'ypérite dans différents modèles *in vitro* comme dans des cellules endothéliales (Hinshaw *et al.*, 1999), des kératinocytes humains (Hinshaw *et al.*, 1999; Mol *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1990) ou des leucocytes (Meier *et al.*, 1987). Par exemple, après traitement de kératinocytes humains par 300 µM d'ypérite pendant 7h, le taux de NAD⁺ commence à diminuer au bout d'une heure et atteint à 4 h un plateau à 47% de sa valeur initiale (Smith *et al.*, 1990). Dans tous ces modèles, la déplétion de NAD⁺ est dose et temps dépendant. Cette dernière a aussi été mise en évidence *in vivo* chez le cochon d'Inde sans poils exposé à des vapeurs saturantes d'ypérite sur la peau (Yourick *et al.*, 1991). Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, l'emploi d'inhibiteur de PARP prévient la déplétion de NAD⁺ lorsqu'il est administré ou ajouté dans le milieu de culture avant traitement. L'activation de PARP par une exposition de l'ypérite a été, en outre, observée directement par Hinshaw *et al.* dont les résultats ont également suggéré qu'après traitement à 500 µM, la déplétion en NAD⁺ était en partie responsable de celle de l'ATP (environ 50%) (Hinshaw *et al.*, 1999). Même si aucune donnée n'a permis de confirmer l'activation du shunt des hexoses monophosphates (Hurst *et al.*, 2008), Cowan *et al.* ont montré que l'exposition à l'ypérite de lymphocytes augmentait l'activité des protéases et que celle-ci était diminuée par le niacinamide, précurseur dans la synthèse de NAD⁺ et inhibiteur de PARP (Cowan *et al.*, 1991, 1992).

Bien que les données mentionnées ci-dessus valident certaines étapes de l'hypothèse émise par Papirmeister *et al.*, la déplétion en NAD⁺ seule, consécutivement à la suractivation de PARP, n'est pas suffisante pour expliquer la toxicité de l'ypérite. En effet, la restauration du taux de NAD⁺ dans des explants de peau humaine par ajout dans le milieu de nicotinamide, ne permet pas de diminuer la mort cellulaire ou la formation des microvésicules (Mol *et al.*, 1991). De plus, l'inhibition de PARP n'a pas d'effet sur la survie cellulaire après traitement à l'ypérite de kératinocytes ou cellules pulmonaires (Kehe *et al.*, 2008b; Steinritz *et al.*, 2007). En revanche, celle-ci, réalisée en pré-traitement, provoque chez le cochon d'Inde sans poils une diminution de la formation des microvésicules de l'ordre de 50%. Cette diminution n'est toutefois pas corrélée à la teneur en NAD⁺ (Yourick *et al.*, 1991). L'effet protecteur de l'inhibition de PARP observée *in vivo*, contrairement aux études *in vitro*,

s'expliquerait selon Debiak *et al.* par une diminution de la mort nécrotique avec celle de l'activité des protéases et de l'inflammation associée ou par une interférence directe avec les voies de signalisation de l'inflammation atténuant ainsi les dommages secondaires générés par cette dernière (Debiak *et al.*, 2009).

4.1.2. Alkylation de l'ADN et mort cellulaire

Apoptose et nécrose ont toutes deux été observées suite à une exposition au gaz moutarde ou à son analogue monochloré.

Il a été montré dans différentes études que la suractivation de PARP et la déplétion subséquente en NAD⁺ était à l'origine d'une mort cellulaire nécrotique. Par exemple, Rosenthal *et al.* ont visualisé dans des fibroblastes dérivés de souris PARP^{+/+}, suite à des traitements allant jusqu'à 500 µM d'ypérite, une fragmentation aléatoire de la double hélice d'ADN qui est caractéristique de la nécrose (Rosenthal *et al.*, 2001). De la même manière, Kehe *et al.* ont mis en évidence une association entre l'augmentation de l'activité de PARP et l'accroissement du nombre de kératinocytes en nécrose (Kehe *et al.*, 2008b). Dans des fibroblastes dérivés de souris déficientes en PARP, souris PARP^{-/-}, les marqueurs de mort cellulaires (augmentation de l'activité de la caspase 3, perte de l'asymétrie membranaire et clivage de l'ADN en fragments de 180 paires de base), sont typiques de l'apoptose. En réalisant des constructions permettant d'exprimer PARP dans les fibroblastes PARP^{-/-}, Rosenthal *et al.* ont de plus observé une disparition des marqueurs apoptotiques, renforçant ainsi la corrélation entre l'activité de PARP et la mort nécrotique. Dans cette même étude, indépendamment de l'expression de PARP, les kératinocytes présentent des marqueurs d'apoptose (Rosenthal *et al.*, 2001). Contrairement à ces derniers résultats, l'inhibition de PARP par le 3-aminobenzamide dans des kératinocytes humains induit un basculement d'une mort nécrotique vers une mort apoptotique (Kehe *et al.*, 2008b). Kehe *et al.* expliquent la différence entre leurs résultats et ceux de Rosenthal *et al.* par le fait que le gène muté dans la souris PARP^{-/-}, dont les fibroblastes et les kératinocytes dérivent, est le gène codant pour PARP-1 (Kehe *et al.*, 2008b). Il existe en effet plusieurs PARP capables d'effectuer la poly-(ADP)-ribosylation et le 3-aminobenzamide les inhibe toutes (Debiak *et al.*, 2009; Shall and de Murcia, 2000). Ainsi, l'augmentation de l'apoptose obtenue par Rosenthal *et al.* ne serait pas uniquement due à l'inhibition de PARP-1 (Rosenthal *et al.*, 2001). Kehe *et al.* ont en outre

Contexte bibliographique

démontré que l'inhibition de PARP n'avait aucune influence sur la survie globale des kératinocytes (Kehe *et al.*, 2008b).

L'induction de l'apoptose par l'ypérite ou le CEES a été illustrée dans de très nombreux modèles, les deux voies, extrinsèques et intrinsèques, étant impliquées (Kehe *et al.*, 2009; Ruff and Dillman, 2007). L'implication de la voie mitochondriale a ainsi été soulignée dans des kératinocytes humains avec l'activation de la caspase 9 (Rosenthal *et al.*, 2003) ou la diminution de l'expression de Bcl-2 (Rosenthal *et al.*, 1998). Elle a également été observée dans des cellules épithéliales bronchiques via la diminution de l'expression de Bcl-2, l'activation de Bax, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, le relargage du cytochrome C, l'activation des caspases 2, 3, 8, 9 et 13 ou encore la fragmentation caractéristique de l'ADN (Sourdeval *et al.*, 2006). Seulement, tous ces marqueurs n'ont pu être mis en évidence qu'après détachement des cellules, faisant conclure aux auteurs de cette étude que la mort cellulaire décrite s'apparenterait plus à l'anoikis (mort de la cellule associée à la perte de lien avec sa matrice extracellulaire, ici cellules ayant perdu leur adhérence aux plaques de culture) (Sourdeval *et al.*, 2006). L'implication de la voie extrinsèque a, quant à elle, été aussi mise en évidence dans des kératinocytes (Arroyo *et al.*, 2004; Rosenthal *et al.*, 2003) et des cellules épithéliales bronchiques (Keyser *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2010). Parmi les différents marqueurs typiques de la voie des récepteurs de mort, on retrouve l'activation de la caspase 8 (Ray *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2003), l'augmentation de Fas et de son récepteur (Rosenthal *et al.*, 2003) ainsi que celle de TNF α (Arroyo *et al.*, 2004). Ray *et al.* ont montré que l'apoptose causée par l'ypérite était médiée par une boucle d'amplification de l'activation des caspases (Ray *et al.*, 2010). En effet, en inhibant la caspase 8 ils ont pu observer une diminution drastique de l'activation de la caspase 3 de même qu'en inhibant cette dernière l'activation de la caspase 8 était grandement diminuée. Le blocage de la transduction du signal apoptotique induit par la fixation de Fas à son récepteur, via l'inhibition de l'expression du domaine de mort qu'il active, provoque une chute de l'activation des caspases 3, 7 et 8 (Rosenthal *et al.*, 2003). Ce même blocage par l'emploi de petits ARN interférents, qui inhibent spécifiquement l'expression du récepteur de Fas, a aussi pour conséquence une diminution de l'activité de la caspase 3 ainsi qu'une diminution de l'apoptose illustrée par celle des cellules marquées à l'annexine V (Keyser *et al.*, 2013). En outre, la fragmentation de l'ADN, autre marqueur de l'apoptose a été mise en évidence dans des thymocytes (Hur *et al.*, 1998; Michaelson, 2000), des cellules endothéliales (Dabrowska *et al.*, 1996) et des cellules épithéliales pulmonaires (Steinritz *et al.*, 2007). Cette dernière a également été obtenue *in vivo* dans la peau de souris SKH-1 exposées au CEES (Tewari-

Contexte bibliographique

Singh *et al.*, 2012). Dans ce même modèle, exposé à des vapeurs saturantes d'ypérite, l'apoptose a été visualisée par l'augmentation de l'activité de la caspase 3 (Joseph *et al.*, 2011). Pour des conditions d'expositions similaires (ypérite vapeur pendant huit min), Kan *et al.* ont pu montrer l'augmentation de l'apoptose (fragmentation de l'ADN) dans les cellules basales de la peau de cochons d'Inde sans poils 6 h et 12h post-exposition (Kan *et al.*, 2003). En revanche, 24 et 48h après exposition, les cellules apoptotiques n'étaient plus quantifiables du fait de l'apparition de cellules nécrotiques. A partir de ces données, ces chercheurs ont conclu que l'ypérite induisait un continuum apoptotique-nécrotique.

La nécrose a, de plus, été observée dans plusieurs modèles *in vitro*, outre ceux employés par Rosenthal *et al.* ainsi que Kehe *et al.* dans leurs études montrant le rôle de PARP dans ce type de mort cellulaire (Kehe *et al.*, 2008b; Rosenthal *et al.*, 2003). Par exemple, dans les cellules épithéliales bronchiques, en plus de la mise en évidence de l'anoikis, Sourdeval *et al.* ont caractérisé la présence de cellules nécrotiques aux deux concentrations étudiées, 250 et 500 μ M, lorsque les cellules étaient adhérentes (Sourdeval *et al.*, 2006). En revanche, pour les cellules ayant perdu leur adhérence, la nécrose n'était plus notable que pour la dose de traitement la plus élevée. Dans un modèle similaire, Keyser *et al.* ont démontré qu'un traitement à 300 μ M d'ypérite était à l'origine d'une augmentation de la nécrose (marquage à l'iodure de propidium) qui a été diminuée par l'utilisation de petits ARN interférents spécifiques du récepteur de Fas d'une façon analogue à l'apoptose (Keyser *et al.*, 2013). Dabrowska *et al.* ont aussi visualisé la nécrose provoquée par un traitement à l'ypérite dans des cellules endothéliales (Dabrowska *et al.*, 1996). Le taux de cellules nécrotiques et apoptotiques était identique après une exposition à des concentrations d'ypérite supérieures à 500 μ M. La concentration en ATP constituait une différence remarquable entre les deux populations cellulaires dans la mesure où elle était inchangée dans les cellules apoptotiques et qu'elle était diminuée de près de 50% dans les cellules nécrotiques.

4.1.3. Alkylation de l'ADN et signalisation

L'étude des voies de signalisation mises en place en réponse à la formation des adduits de l'ypérite a permis de mettre en exergue l'implication de plusieurs transducteurs du signal dans différents modèles.

Dans des kératinocytes humains et murins exposés au CEES, Tewari-Singh *et al.* ont montré une diminution dose-dépendante de la survie et la prolifération cellulaire (Tewari-

Contexte bibliographique

Singh *et al.*, 2010). Cette dernière a été caractérisée par une diminution de la synthèse d'ADN mesurée par celle de l'incorporation de la 5-bromo-uridine (BrdU). Ils ont également observé que l'atténuation de la synthèse d'ADN était accompagnée d'un arrêt du cycle cellulaire en phase S et en G2-M, l'arrêt en phase S étant plus important dans les kératinocytes murins. L'arrêt du cycle cellulaire a été associée à l'augmentation de la phosphorylation des kinases ATM et ATR décelée dès 30 min de traitement. Après 2h d'exposition, la phosphorylation d'ATM n'était plus notable tandis que celle d'ATR était toujours visible après 4 h de traitement. Tout comme pour ATM et ATR, l'accroissement de la phosphorylation des kinases Chk 1 et Chk2 a été visualisée sans que la quantité de chacune de ces protéines ne soit modifiée. De même, l'augmentation de la phosphorylation des phosphatases cdc25A et cdc25C, connues pour être phosphorylées par Chk 1 et Chk2, a été mise en évidence de façon dose-dépendante 2 et 4 h après traitement. Consécutivement à la phosphorylation de cdc25A et cdc25C, celle de la première étant plus importante, les travaux de Tewari-Singh *et al.* ont révélé que CDK1 et CDK2 restaient phosphorylées, donc inactives (Tewari-Singh *et al.*, 2010). Associée à l'inactivation de CDK1 et CDK2, l'accumulation des cyclines A et B1 après 24 h de traitement a été démontrée dans les kératinocytes murins à l'inverse des kératinocytes humains où seule celle de la cycline B1 a été obtenue. Ce dernier résultat explique pourquoi les kératinocytes murins sont, en proportion, arrêtés en phase S en plus grande quantité que les kératinocytes humains.

Jowsey *et al.* ont eux aussi montré l'augmentation de la phosphorylation des transducteurs du signal que constituent Chk2 et p53 dans des cellules lymphoblastoïdes TK6 exposées au CEES (Jowsey *et al.*, 2009). Ils ont de plus démontré que la phosphorylation et donc l'activation de Chk2 et p53 étaient sous la dépendance d'ATM et d'ATR. En effet, suite à l'inhibition d'ATM et ATR, la phosphorylation de p53 et Chk2 était quasi-inexistante. Dans le même modèle cellulaire, ils ont observé que cette inhibition était responsable d'une diminution de la survie des TK6. Ces mêmes chercheurs ont confirmé ces résultats dans des cellules, toujours les TK6, exposées au gaz moutarde (Jowsey *et al.*, 2012). Leurs travaux ont également révélé que la phosphorylation de Chk1 était sous la dépendance d'ATR tandis que les phosphorylations de Chk2 et p53 étaient sous celle d'ATM. En outre, les résultats obtenus par Jowsey *et al.* ont mis en évidence que la phosphorylation activatrice d'ATM était réalisée au moins en partie par ATR (Jowsey *et al.*, 2012). En plus des TK6, des kératinocytes humains et des kératinocytes murins, la phosphorylation de p53 a été visualisée dans des fibroblastes murins exposés au CEES (Inturi *et al.*, 2011; Tewari-Singh *et al.*, 2012).

4.1.4. Alkylation de l'ADN et réparation

Des travaux ont été effectués afin de définir la nature des mécanismes de réparation impliqués dans la prise en charge des dommages à l'ADN générés par l'ypérite ou le CEES. Matijasevic *et al.* ont par exemple montré que le NER était impliqué dans la résistance à la toxicité induite par le gaz moutarde ou le CEES (Matijasevic *et al.*, 2001). Ainsi trois jours après exposition à 20 μM d'ypérite, plus de 50% des cellules d'ovaires de hamster chinois (« chinese hamster ovary » ou CHO) possédant un système NER intact étaient viables contrairement à celles disposant d'un système NER déficient dont la viabilité était de l'ordre de 2%. De même, après trois jours d'un traitement à 300 μM au CEES, près de 100% des CHO proficientes pour le NER étaient viables tandis que seulement 5% environ des CHO ayant un NER déficient l'étaient. Afin d'étudier la réparation des dommages à l'ADN, Matijasevic *et al.* ont utilisé le HCR (pour « host cell reactivation assay ») qui est une technique reposant sur la réactivation du gène luciférase par les systèmes de réparation, celle-ci étant mesurée par bioluminescence (Matijasevic *et al.*, 2001). Pour cela, ils ont transfecté des CHO proficientes ou déficientes pour le NER avec deux plasmides. Le premier plasmide, non traité, contenait le gène de la luciférase de *Renilla reniformis* et servait de contrôle à la transfection. Le second plasmide contenait le gène de la luciférase de luciole et avait été traité au préalable à l'ypérite ou au CEES. La réactivation du gène luciférase contenu dans le plasmide endommagé et l'augmentation de la bioluminescence consécutive étaient donc synonymes de réparation. Ces chercheurs ont pu ainsi constater que le rapport des activités luciférase de luciole et de *Renilla reniformis* était plus important quelle que soit la concentration étudiée pour les CHO proficientes en NER. Après exposition au CEES, l'écart de ce rapport entre les CHO proficientes et déficientes en NER était plus important que suite au traitement à l'ypérite. L'importance du NER dans la réparation des lésions que génère l'ypérite ou le CEES a été aussi démontrée chez *Escherichia coli* (Matijasevic and Volkert, 2007) ou dans des fibroblastes (Jowsey *et al.*, 2012).

L'impact de la réparation des dommages par le BER est, quant à lui, différent selon le modèle cellulaire et la nature du toxique. Chez *Escherichia coli*, la déficience du BER induit une augmentation de la survie indépendamment de la déficience ou non du NER et ce après traitement à l'ypérite ou au CEES (Matijasevic and Volkert, 2007). De la même façon, les fibroblastes embryonnaires murins et les cellules souches embryonnaires murines déficientes en alkyladénine glycosylase (AAG) et exposés respectivement à l'ypérite ou au CEES sont plus résistantes que les cellules contrôles. L'impact négatif du BER sur la réparation des

Contexte bibliographique

dommages générés par le gaz moutarde a, de plus, été illustré par HCR dans des fibroblastes murins déficients en AAG (Matijasevic and Volkert, 2007). Par opposition, le BER est impliqué dans la résistance au CEES associée à la réparation des adduits qu'il forme dans les TK6 (inhibition de PARP) (Jowsey *et al.*, 2009), les cellules HeLa (inhibition par un agent se fixant sur les sites abasiques) (Jowsey *et al.*, 2009) et dans les CHO (XRCC1 déficientes) (Jowsey *et al.*, 2012). L'exposition à l'ypérite de ces dernières n'a aucune conséquence sur leur survie par rapport à celle des cellules sauvages (Jowsey *et al.*, 2012).

Le NHEJ, qui n'a aucun effet sur la survie et la réparation des TK6 exposées au CEES (Jowsey *et al.*, 2009, 2012), en a un lorsque ces cellules sont exposées au gaz moutarde (Jowsey *et al.*, 2012). Le NHEJ est en effet impliqué dans la réparation des adduits de l'ypérite dans la mesure où l'inhibition de DNA-PK provoque une diminution de la survie des TK6.

La HR, qui n'a aucun effet sur la survie de CHO exposées au CEES, correspond au mécanisme de réparation le plus important dans la protection des dommages générés par le gaz moutarde (Jowsey *et al.*, 2012). Cela a été démontré par un écart de survie plus important que pour le NER ou le NHEJ entre les cellules proficientes et les cellules déficientes pour la HR (inhibition de BRCA2) (Jowsey *et al.*, 2012). La diminution de la survie a été également observée par l'emploi dans des cellules HeLa de petits ARN interférents qui inhibent spécifiquement l'expression de BRCA2 (Jowsey *et al.*, 2010).

Les différences de voies de réparation impliquées dans la survie de cellules exposées à l'ypérite ou à son analogue monofonctionnel s'expliquent par la nature des dommages à l'ADN qu'engendrent ces toxiques. En effet, l'ypérite, contrairement au CEES qui ne forme que des monoadduits, génère des pontages intra ou inter-brins.

4.2. Alkylation de l'ADN et toxicité chronique

L'ypérite est classée comme carcinogène par le CIRC (IARC, 2012). Plusieurs études font en effet le lien entre exposition à l'ypérite et cancer. Par exemple, Easton *et al.*, qui ont étudié une cohorte de 2498 hommes et 1032 femmes ayant travaillé dans une unité de production d'ypérite au Royaume-Uni où il en a été fabriqué 24000 tonnes de 1938 à 1944, ont montré une augmentation significativement importante (par rapport au reste de la population) de la mortalité due au cancer du larynx (11 observés vs. 4.04 attendus), du pharynx (11 observés vs. 4.04 attendus) et à ceux de la langue, du nez, des glandes salivaires, des lèvres ainsi que de

Contexte bibliographique

la bouche réunis (15 observés vs. 2.73 attendus) (Easton *et al.*, 1988). Ils ont de plus observé une augmentation modérée de la mortalité liée au cancer des poumons (200 observés vs. 138.39 attendus). Ces résultats sont en accord avec ceux de Wada *et al.* qui ont aussi montré un accroissement de cancers des voies aérodigestives supérieures chez des travailleurs japonais ayant été exposés de 1929 à 1945 (Wada *et al.*, 1968). Ces études ont en outre révélé un lien entre développement de cancer et durée d'exposition à l'instar des travaux de Yamakido *et al.* (Yamakido *et al.*, 1996). Ces derniers ont porté sur une cohorte de 1632 Japonais exposés au gaz moutarde entre 1929 et 1945. Yamakido *et al.* ont pu visualiser une augmentation de la mortalité due à un cancer des poumons en fonction du temps d'exposition mais aussi du type de personnel par rapport à une population non exposée. Ainsi, pour les personnes impliquées dans la production du toxique, cette augmentation était significative pour une période d'exposition de plus de 6 mois. Elle l'était également pour une durée d'exposition de plus de 5 ans comme pour le personnel concerné par les tests en laboratoire ou celui de la maintenance. En revanche, pour les employés fabriquant d'autres types de gaz ou pour le personnel administratif, aucune augmentation de la mortalité due à un cancer des poumons n'a été décelée (Yamakido *et al.*, 1996).

Toujours chez des travailleurs japonais exposés à l'ypérite entre 1929 et 1945 et ayant développé un cancer des poumons, Takeshima *et al.* ont séquencé les exons 5 à 8 du gène p53, qui est muté dans près de la moitié des cancers humains, pour en établir son spectre mutationnel dans 12 tumeurs (Takeshima *et al.*, 1994). Douze autres tumeurs servant de contrôle, c'est-à-dire provenant de personnes non exposées au gaz moutarde, ont été choisies de manière à ressembler d'un point de vue histologique à celles issues des travailleurs exposés. Huit mutations ont été obtenues dans 6 de ces dernières et correspondaient à une transition AT→GC, une transversion GC→TA, deux délétions et deux doubles transitions GC→AT. Dans six tumeurs contrôles, six mutations ont été caractérisées mais aucune mutation double n'a été mise en évidence. Takeshima *et al.* ont conclu de ces résultats que la fréquence de mutation dans les tumeurs de personnes exposées à l'ypérite était identique à celle d'individus non exposés et à celle obtenue dans les tumeurs de fumeurs (Takeshima *et al.*, 1994). Ils ont de plus émis l'hypothèse que les doubles mutations seraient caractéristiques d'une exposition à l'ypérite. Ces doubles mutations de p53, qui sont rares (Miller *et al.*, 1992), ont été également observées après une seule exposition sévère à l'ypérite. En effet, Hosseini-Khalili *et al.* ont séquencé les exons 5 à 8 du gène p53 dans des tumeurs de poumons issus de 20 vétérans iraniens et ont distingué 8 mutations dans 5 tumeurs dont trois mutations isolées correspondant à trois transitions GC→AT (non fumeur), CG→TA (statut

Contexte bibliographique

fumeur inconnu) et TA→AT (statut fumeur inconnu), une double mutation (fumeur) avec une transition GC→AT et une transversion CG→AT, et enfin une triple mutation (non fumeur) composée d'une double transition CG→TA et d'une autre TA→CG (Hosseini-khalili *et al.*, 2009). Ces résultats ainsi que ceux de Takeshima *et al.* reposent sur un nombre de tumeurs relativement faible en comparaison avec d'autres études menées sur les mutations de p53 en lien avec l'exposition aux UV par exemple (Bennett *et al.*, 1999). Une autre donnée intéressante à relever dans l'étude de Hosseini-Khalili *et al.* est l'âge à partir duquel ont été détectées les tumeurs chez ces 20 vétérans sachant que typiquement le cancer des poumons se développe après 50 ans avec un pic à 60 ans (Orourke *et al.*, 1987). Pour ces Iraniens il s'étale de 28 à 73 ans avec une moyenne de 47.4 ans et pour 7 d'entre eux, les cancers ont été diagnostiqués avant 40 ans (Hosseini-khalili *et al.*, 2009). Toutefois, les résultats obtenus par Hosseini-Khalili *et al.* n'indiquent pas une augmentation du développement du cancer des poumons après une seule exposition à l'ypérite. D'ailleurs la revue des données de la littérature sur le thème cancer des poumons et exposition au gaz moutarde effectuée par Ghanei *et al.*, n'a pas permis de mettre en avant des preuves définitives du développement de cancer des poumons suite à une seule exposition à l'ypérite (Ghanei and Harandi, 2010). Outre les cancers des voies aérodigestives, il a été observé le développement de cancers de la peau situés à proximité des zones exposées au toxique chez des travailleurs japonais (Inada *et al.*, 1978). Chez les Iraniens, une étude conduite chez 800 vétérans 14 à 20 ans après exposition montre que 9 d'entre eux (1.1%) manifestaient un cancer de la peau (Emadi *et al.*, 2008b). Il a estimé dans le cadre des études menées chez ces derniers que 20 ans post-exposition n'étaient peut être pas suffisant pour estimer l'impact définitif de l'ypérite sur la formation de cancers de la peau (Rowell *et al.*, 2009).

Chapitre 2: Du contexte aux objectifs

Du contexte aux objectifs

L'ypérite constitue l'arme chimique la plus connue et la plus employée. Elle possède une longue histoire avec une première synthèse effectuée par Despretz voilà près de 200 ans et une première utilisation par les Allemands au cours de la première guerre mondiale dans la nuit du 12 au 13 juillet 1917, soit il y a environ un siècle. Malgré cette longue histoire, l'ypérite reste une menace d'actualité à la fois pour les populations civiles et militaires et ce pour plusieurs raisons (Smith *et al.*, 1995b; Wattana and Bey, 2009).

Tout d'abord, la synthèse du gaz moutarde est relativement aisée et ne nécessite pas d'infrastructures importantes. Il pourrait ainsi être potentiellement utilisé lors d'agressions terroristes comme en témoigne les attaques chimiques au sarin dans le métro de Tokyo en 1995 (Hoffman *et al.*, 2007).

Un deuxième type de menace causée par le gaz moutarde est due à l'exposition accidentelle lors de la manipulation de vieilles munitions n'ayant pas explosées (Hobbs, 1944; Ruhl *et al.*, 1994). De nombreux accidents ont été également rapportés chez des pêcheurs ayant récupérés sur leur bateau des munitions chargées de gaz moutarde qui avaient été déversées en mer du Nord (Aasted *et al.*, 1987).

A l'heure où ces lignes sont écrites, la menace de l'ypérite s'accroît à travers le conflit en Syrie où l'emploi d'armes chimiques est fortement suspecté.

En outre, cette menace est renforcée par l'absence d'antidote et le traitement uniquement symptomatique des personnes intoxiquées (Smith *et al.*, 1995b).

L'ypérite attaque principalement les yeux, la peau et les poumons mais aussi, du fait de ses propriétés lipophiles et donc de sa capacité à traverser la barrière cutanée, d'autres organes tels que le tractus gastro-intestinal et la moelle osseuse.

Si les symptômes causés par l'ypérite sont aujourd'hui relativement bien décrits, les mécanismes moléculaires par lesquels elle provoque ces symptômes ne sont pas totalement élucidés.

Des décennies de recherche ont toutefois permis de mettre en évidence plusieurs cibles moléculaires et différentes voies de signalisation comme étant impliquées dans sa toxicité. Parmi celles-ci, l'alkylation de l'ADN est l'une des plus importantes et la plus étudiée (Kehe and Szinicz, 2005; Lodhi *et al.*, 2001; Shakarjian *et al.*, 2010). Elle est impliquée dans la toxicité aiguë de l'ypérite à travers une cascade d'évènements conduisant à l'altération du

Du contexte aux objectifs

métabolisme et la mort cellulaire. L'alkylation de l'ADN joue également un rôle dans sa toxicité chronique via le développement de cancers.

Si l'importance de l'alkylation de l'ADN dans la toxicité de l'ypérite est reconnue, les données quantitatives sur la génération et la persistance des adduits formés que ce soit dans les organes exposés ou les cibles secondaires, restent peu documentées.

Dans ce contexte, mon sujet de thèse a porté sur l'étude de la formation et de la réparation des dommages à l'ADN causés par l'ypérite chez l'animal après une exposition cutanée.

Il a été décliné en trois objectifs principaux :

- le premier objectif qui a constitué la pierre angulaire de mon travail de thèse a été de mettre au point une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). C'est une technique de choix pour la quantification des dommages à l'ADN. Cette méthode a ensuite été étendue aux monoadduits que forme le CEES, analogue du gaz moutarde largement employé dans la littérature.

- le deuxième objectif a été d'appliquer cette méthode à l'étude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1. Ce modèle est maîtrisé par les équipes de l'IRBA aussi bien pour des expositions cutanées en mode vapeur que liquide (Clery-Barraud *et al.*, 2013; Dorandeu *et al.*, 2011; Taysse *et al.*, 2011; Vallet *et al.*, 2012). Il est de plus en plus employé pour étudier différents mécanismes impliqués dans la pathophysiologie induite par l'ypérite dont la signalisation des lésions à l'ADN ou encore le stress oxydant (Jain *et al.*, 2011b; Joseph *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2009; Tewari-Singh *et al.*, 2012; Tewari-Singh *et al.*, 2009).

L'étude a été réalisée sur plus d'une centaine d'animaux (n = 132) exposés topiquement à plusieurs doses d'ypérite (2, 6 et 60 mg/kg) puis sacrifiés à différents temps (6 h, J1, J3, J7, J14 et J21). A l'issue de ces expérimentations, plus d'un millier d'échantillons (pour chaque souris : peau traitée, peaux non traitées, cerveau, foie, reins, rate et poumons) ont été récoltés, traités et leur ADN analysé. Des mesures de bases oxydées ont également été réalisées. Parallèlement à la quantification des adduits, le processus lésionnel au niveau cutané a été

Du contexte aux objectifs

suivi par une méthode non invasive, la perte insensible en eau qui est le reflet de la fonction barrière de la peau.

- le troisième objectif a été d'évaluer l'impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation de l'ADN et plus précisément le BER et le NER. Pour chaque système de réparation, un test sur puces développé au laboratoire a été utilisé. L'étude a été conduite ici sur 18 souris SKH-1 exposées dans les mêmes conditions que pour l'évaluation quantitative de la formation et de la persistance des adduits. Les animaux ont été exposés à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite puis euthanasiés 4 et 24 h après l'exposition. Plusieurs prélèvements (peau traitée, poumons, cerveau et reins) ont alors été effectués et leur ADN analysé.

Outre ces trois objectifs concernant l'étude de la formation et de la réparation des adduits de l'ypérite chez la souris SKH-1, des travaux préliminaires ont été également menés visant à identifier de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite et au CEES. Des données ont ainsi été obtenues dans différents modèles cellulaires humains.

Les objectifs de ce travail de thèse avaient pour but de mieux caractériser l'effet génotoxique de l'ypérite et notamment le lien entre dose d'exposition, développement du processus lésionnel et dommages à l'ADN. L'effet génotoxique du gaz moutarde a également été évalué via son impact sur la réparation de l'ADN.

Plus généralement, les visées de ce travail étaient de proposer les adduits générés par l'ypérite comme des biomarqueurs d'exposition et d'effet, ces biomarqueurs pouvant être suivis dans un second temps dans le cadre de l'évaluation d'essais thérapeutiques.

Chapitre 3: Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

I. Les méthodes de détection quantitative des dommages à l'ADN

Il existe plusieurs techniques de quantification des dommages à l'ADN qui présentent chacune des avantages et des inconvénients. On peut en distinguer deux types, les méthodes biochimiques et les méthodes chromatographiques. Nous allons dans un premier temps décrire le principe de chacune de ces méthodes ainsi que leur utilisation, quand c'est le cas, pour la détection quantitative ou non des adduits de l'ypérite. Dans un second temps nous présenterons la démarche opérée pour la mise au point de la première méthode de quantification des trois adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS.

1. Les méthodes biochimiques

Les méthodes biochimiques regroupent les méthodes immunologiques et les méthodes enzymatiques.

1.1. Les méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur l'utilisation d'anticorps qui sont produits après plusieurs injections de solutions d'ADN traité avec le composé d'intérêt ou les dommages eux-mêmes dans des animaux comme des lapins ou des souris (Poirier, 1993). Elles sont relativement sensibles et sont peu onéreuses à mettre en œuvre (Phillips *et al.*, 2000). De plus, elles ne nécessitent pas d'hydrolyser l'ADN. Il est recommandé de ne pas faire plus de 3 à 4 injections de sorte que les anticorps produits soient spécifiques de la lésion d'intérêt (Poirier, 1993). Toutefois, des réactions croisées peuvent se produire comme par exemple pour les anticorps dirigés contre la 8-oxoguanine qui reconnaissent également la désoxyguanosine (Degan *et al.*, 1991). Le principal inconvénient des méthodes immunologiques concerne leur manque de spécificité.

Van der Schans *et al.* ont mis au point une méthode de détection de l'adduit majoritaire de l'ypérite, HETE-N7Gua, par immuno-marquage (van der Schans *et al.*, 1994). Ils ont développé à la fois des anticorps polyclonaux en immunisant des lapins avec de l'ADN traité à l'ypérite et des anticorps monoclonaux en immunisant des souris avec la HETE-N7 guanosine monophosphate (HETE-N7GMP). La sensibilité des deux types d'anticorps a été

trouvée identique sur de l'ADN isolé avec la détection d'un adduit HETE-N7Gua pour 5 millions de nucléotides non modifiés. Des tests de réactivité croisée ont montré que les anticorps monoclonaux reconnaissaient également la N7-méthyl guanine entre autres. Cette méthode a été appliquée à la quantification de HETE-N7Gua dans des biopsies de peau humaine exposée à de l'ypérite vapeur (830 mg/m^3) pendant 10, 30 et 60 s. Les fréquences des adduits mesurées étaient de l'ordre de quelques adduits (<10) pour 10 millions de nucléotides (van der Schans *et al.*, 2004).

1.2. Les méthodes enzymatiques

Parmi les méthodes enzymatiques, on trouve l'élution alcaline et l'électrophorèse sur gel d'agarose de cellules isolées.

L'élution alcaline a été mise au point par Kohn *et al.* (Kohn *et al.*, 1976; Kohn and Grimek-Ewig, 1973). Cette technique permet de mesurer les cassures et les sites alcali-labiles comme les sites abasiques. Le principe de cette méthode repose sur la lyse de cellules sur des membranes filtrantes, le contenu cellulaire étant élué dans le tampon de lyse sauf l'ADN qui lui est élué en conditions alcalines. L'élution de l'ADN s'accompagne de la séparation de ses brins et de la formation de cassures simple brin au niveau des sites alcali-labiles qui s'ajoutent aux cassures directes. La vitesse d'élution à travers un filtre est dépendante de la taille de la molécule simple brin d'ADN et est directement reliée au taux de cassures simple brin. Pour mesurer la quantité d'ADN éluee, des sondes radioactives ont tout d'abord été utilisées, puis des améliorations ont permis l'emploi de fluorophores (Goumenou and Machera, 2004).

Cette méthode a été largement remplacée par l'électrophorèse sur gel d'agarose de cellules isolées ou test des comètes qui comme son nom l'indique permet la quantification des dommages non plus dans une population de cellules mais dans une seule cellule (Himmelstein *et al.*, 2009). Cette technique a été développée par Ostling et Johanson (Ostling and Johanson, 1984) et permet de mesurer les cassures au sein de la double hélice. Les cellules sont englobées dans un gel d'agarose, déposées sur une lame de microscope et lysées à l'aide d'un détergent en présence de fortes concentrations salines. L'ADN se trouve dans le noyau à l'état super enroulé ce qui limite sa migration sous électrophorèse. S'il contient des cassures, celles-ci engendrent un relâchement de la structure, plus précisément d'une boucle de la double hélice. Sous électrophorèse à pH élevé, on observe alors sous microscope, après ajout d'un intercalant fluorescent, une structure similaire à une comète comportant l'ADN compact qui

en compose la tête et l'ADN relâché qui en forme la queue. L'augmentation des dommages est visualisée non pas par une augmentation de la taille de la queue de la comète mais plutôt par son marquage plus prononcé (Collins *et al.*, 2008). Il existe des variantes au test des comètes qui permettent de mesurer, outre les cassures de l'ADN, certains types de lésions comme les dommages oxydatifs en utilisant des ADN-N-glycosylases comme Fpg ou Endo III qui vont générer des cassures supplémentaires (Himmelstein *et al.*, 2009).

La sensibilité de ces méthodes constitue leur principal avantage. Elles sont en revanche peu spécifiques même avec l'emploi de glycosylases car elles sont capables de reconnaître plusieurs types de dommages.

En appliquant le test des comètes à des lymphocytes humains exposés à l'ypérite, Moser *et al.* ont mis en évidence que les pontages qu'elle forme interféraient avec la migration électrophorétique de l'ADN et donc la détection des cassures (Moser *et al.*, 2004).

2. Les méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques regroupent toutes les méthodes pour lesquelles une séparation par chromatographie est effectuée. Contrairement aux méthodes précédentes, l'ADN doit être ici extrait et hydrolysé. Il existe différentes méthodes chromatographiques pouvant être utilisées pour la quantification des dommages à l'ADN parmi lesquelles le post-marquage au ^{32}P et les couplages entre chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou gazeuse (GC) avec différents détecteurs (radioactivité, électrochimie, spectrométrie de masse).

2.1. Utilisation de composés radioactifs

L'utilisation de composés radioactifs est un moyen direct pour déterminer si un composé forme ou non des adduits à l'ADN (Phillips *et al.*, 2000). C'est là l'avantage principal de l'emploi de tels composés. Pour cela, les expériences peuvent-être conduites *in vivo* sur des animaux auxquels le composé radioactif est administré ou *in vitro* avec le traitement de cellules ou d'ADN isolé (Himmelstein *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2000). Parmi les éléments radioactifs les plus utilisés pour la synthèse du composé dont on souhaite savoir s'il forme des adduits, on retrouve le ^3H et le ^{14}C . Les composés marqués au ^3H sont moins chers à préparer

et possèdent une activité spécifique supérieure à celle des composés marqués au ^{14}C . Cependant, ces derniers sont moins sujet à perdre leur marquage via des échanges du ^{14}C par du ^{13}C que ne le sont les composés marqués au ^3H par des échanges de protons (Himmelstein *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2000). La présence de radioactivité dans de l'ADN extrait et purifié, soit après administration du composé radioactif à un animal soit après traitement de cellules ou d'ADN isolé, n'est pas forcément synonyme de la présence de lésions. Il se peut en effet que des métabolites s'absorbent de façon non covalente à des nucléotides normaux. La distinction entre ces complexes et des adduits nécessite une hydrolyse suivie d'une séparation chromatographique (Phillips *et al.*, 2000). Les inconvénients inhérents à l'emploi de composés radioactifs sont le coût associé à leur préparation et le danger lié à leur utilisation.

Brookes et Lawley sont les premiers à avoir mis en évidence la formation des adduits à l'ADN causés par l'ypérite (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua) et par là même les premiers à avoir établi de façon inéquivoque que la double hélice était la cible d'agents chimiques (Brookes and Lawley, 1960, 1961b, 1963; Singh and Farmer, 2006). Pour cela, ils ont utilisé du gaz moutarde marqué au ^{35}S et réalisé des séparations chromatographiques sur papier d'ADN traité et hydrolysé. Ils ont pu constater lors de ces travaux l'instabilité des adduits avec la présence de radioactivité dans le surnageant après précipitation de l'ADN. Ils ont de plus détecté ces adduits dans de l'ADN de phages T2 et T4. Ces résultats ont été confirmés par Fidder *et al.* qui ont synthétisé et caractérisé ces mêmes adduits (Fidder *et al.*, 1994). En traitant de l'ADN isolé et du sang humain *ex vivo* avec de l'ypérite marquée au ^{35}S , ces chercheurs ont pu détecter chacun de ces adduits après une séparation HPLC. De la même manière, Ludlum *et al.* ont synthétisé et caractérisés les monoadduits (HETE-N7Gua et HETE-N3Ade) formés par le gaz moutarde (Ludlum *et al.*, 1994). Ils les ont détectés dans de l'ADN isolé après traitement avec de l'ypérite marquée au ^{14}C et séparation HPLC.

2.2. Post-marquage au ^{32}P

La technique du post-marquage au ^{32}P a été initialement décrite par Randerath *et al.* qui ont utilisé plusieurs échantillons d'ADN traités avec différents agents chimiques comme le formaldéhyde, l'oxyde de propylène ou encore le diméthyle sulfate (Randerath *et al.*, 1981). Le principe de la méthode peut être décomposé en quatre étapes : 1) la digestion de l'ADN

par des nucléases et des endonucléases qui conduit à la formation de désoxynucléosides 3'-monophosphate ; 2) l'enrichissement de la fraction contenant les adduits d'intérêt (étape non décrite par Randerath *et al.*) qui peut être effectuée entre autres par chromatographie d'immunoaffinité ou par HPLC ; 3) le marquage au ^{32}P des adduits en position 5' réalisée par la T4-polynucléotide kinase qui génère des désoxynucléosides 3',5'-bisphosphate ; 4) la séparation chromatographique soit par chromatographie sur couche mince soit par HPLC (Himmelstein *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2000). Le post-marquage au ^{32}P est une technique très sensible qui ne requiert que peu d'ADN (Phillips *et al.*, 2000). C'est de plus une technique qui a été employée pour la détection d'adduits dans des mélanges complexes comme la fumée de cigarette (Phillips *et al.*, 2000). En ce qui concerne ses limitations, cette méthode n'apporte pas d'informations structurales sur le dommage analysé, celles-ci pouvant être apportées par co-chromatographie si l'adduit a été synthétisé et caractérisé au préalable (Himmelstein *et al.*, 2009). Il existe tout de même un risque de sous-estimation lors de la quantification qui peut être du à l'inefficacité du marquage par la polynucléotide kinase ou à la perte d'adduits lors de l'étape d'enrichissement (Phillips *et al.*, 2000). En outre, cette technique est relativement fastidieuse à mettre en œuvre.

Le groupe de Ludlum a mis au point une méthode de quantification de la HETE-N7-désoxyganosine 5'-phosphate (HETE-N7pdGuo) par post-marquage au ^{32}P avec une limite de détection d'un adduit pour dix millions de nucléotides normaux (Yu *et al.*, 1994). L'adduit étant instable, ces chercheurs ont procédé pour minimiser la dépurination à une digestion sur la nuit à 10°C au lieu de 37°C. Ils ont de plus montré un effet dose linéaire de la formation de HETE-N7pdGuo dans des fibroblastes humains traités à des concentrations d'ypérite variant entre 2.5 et 15 μM (Niu *et al.*, 1996).

2.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La GC couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique qui a été appliquée à la détection des dommages à l'ADN pour la première fois par Dizdaroglu *et al.* (Dizdaroglu, 1984). Ces derniers ont développé une méthode pour la détection de dommages induits par les rayonnements ionisants. Pour cela, ils ont réalisé une hydrolyse acide de l'ADN avant d'effectuer une dérivation, étape nécessaire pour rendre les dommages volatils. Un procédé de dérivation souvent employé est la silylation qui est opérée par un chauffage des composés. Les avantages de la GC-MS sont l'obtention d'informations structurales des

lésions à l'ADN analysées et sa bonne sensibilité. La limite principale de cette technique est la nécessité de dérivation qui pour certains types de dommages s'avère problématique. En effet, il a été montré, pour la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dGuo) notamment, que les conditions de cette dernière induisaient une augmentation artificielle du nombre de dommages par oxydation des bases normales (Ravanat *et al.*, 1995). De plus, les conditions acides de digestion de l'ADN avant sa dérivation peuvent être la cause d'une sous-estimation des dommages via leur dégradation (Douki *et al.*, 1997).

Aucune méthode basée sur l'emploi de la GC-MS n'a été mise au point pour la quantification des adduits de l'ypérite du fait des difficultés rencontrées lors de la dérivation des N7-alkylguanines notamment par l'anhydride heptafluorobutyrique et par le bromure de pentafluorobenzyle, réactifs couramment utilisés pour d'autres adduits (Ludlum *et al.*, 1994; Noort *et al.*, 2002; Shuker *et al.*, 1984).

2.4. HPLC couplée à une détection électrochimique ou par fluorescence

L'HPLC couplée à une détection électrochimique (HPLC-ED) pour la mesure des dommages à l'ADN a été décrite initialement par Floyd *et al.* (Floyd *et al.*, 1986). Le principe de la détection électrochimique repose sur la mesure d'une variation de courant électrique entre deux électrodes induite lors de l'élution d'un analyte oxydable. Cette technique a beaucoup été appliquée à la 8-oxo-dGuo (Kasai, 1997). D'autres dommages oxydatifs ont été mesurés grâce à cette technique et notamment certaines lésions générées par les produits secondaires de la peroxydation lipidique (Douki and Ames, 1994; Goda and Marnett, 1991; Wagner *et al.*, 1992). Cette méthode est sensible et peu onéreuse à mettre en place. Son principal inconvénient est que peu de dommages peuvent être quantifiés car elle est dépendante de leurs propriétés d'oxydo-réduction (Cadet *et al.*, 2011).

L'HPLC couplée à une détection par fluorescence (HPLC-FD) est, comme l'HPLC-ED, basée sur les propriétés intrinsèques des dommages. En effet, le principe de l'HPLC-FD s'appuie sur la capacité des lésions à émettre un photon après en avoir absorbé un lors de leur excitation. Elle a par exemple été utilisée pour les adduits formés par les métabolites de l'aflatoxine B1 ou du B[a]P (Autrup *et al.*, 1985; Weston *et al.*, 1989).

Ludlum *et al.* ont développé une méthode de détection quantitative par HPLC-FD de HETE-N7Gua avec laquelle ils en ont quantifiés 153 pour un million de nucléosides normaux après traitement de sang humain *ex vivo* (Ludlum *et al.*, 1994)

2.5. HPLC couplée à la spectrométrie de masse

L'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) est considérée comme une méthode de choix pour la mesure des adduits à l'ADN (Singh and Farmer, 2006). Elle possède une bonne sensibilité bien qu'inférieure à celle du post-marquage au ^{32}P ou celle liée à l'emploi de composés radioactifs. De plus, elle apporte des informations structurales sur les dommages analysés, d'où sa très bonne spécificité. Sa facilité de mise en œuvre est également un atout. L'inconvénient de cette technique est lié au coût d'équipement. Contrairement à la GC-MS, elle ne nécessite pas d'étape de dérivation. Le couplage entre l'HPLC et la spectrométrie de masse est donc direct. Celui-ci a été rendu possible avec l'avènement de l'électrospray, système d'ionisation fiable et efficace. Comme toutes les méthodes chromatographiques, le mélange de nucléotides, de nucléosides ou de bases, issu de l'ADN préalablement extrait et hydrolysé, est séparé par HPLC puis est dirigé vers le spectromètre de masse. Ce dernier est composé de quatre parties distinctes à savoir une source d'ionisation, un analyseur de masse, un détecteur d'ions et un système de traitement des données. La source permet d'ioniser les molécules après leur séparation en HPLC. Les ions générés par la source sont focalisés et transmis à l'analyseur de masse où ils sont triés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Le détecteur d'ions permet la conversion du courant ionique en un courant électrique. Ce dernier est pris en charge dans le système de traitement dont l'action aboutit à l'obtention de données interprétables.

Il existe deux principaux systèmes d'ionisation permettant le couplage de l'HPLC à la spectrométrie de masse utilisés pour la détection des dommages à l'ADN, ce sont l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (Singh and Farmer, 2006). Cette dernière a été développée dans les années 1970 par Horning *et al.* (Horning *et al.*, 1974). L'ionisation par ce système est réalisée après évaporation de la solution contenant l'analyte d'intérêt grâce à un gaz nébuliseur et par chauffage dans le vaporiseur. A la sortie de celui-ci, une décharge est créée par une haute tension (3 à 5kV) appliquée à une aiguille dans la chambre de réaction, on parle de décharge Corona. Cette décharge va être à l'origine de la formation d'ions par capture ou émission d'électrons et par suite de l'ionisation de l'analyte via des réactions chimiques avec ces derniers. L'ESI est beaucoup plus employée que l'APCI et comme pour elle, l'ionisation est réalisée à pression atmosphérique (Singh and Farmer, 2006). La mise au point de l'ESI a été effectuée à la fin des années 1980 par Fenn qui a d'ailleurs reçu le prix Nobel de chimie 2002 (Fenn *et al.*, 1989). L'ionisation est ici accomplie par l'application d'un haut voltage (2 à 5kV) en

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

présence d'un gaz nébuliseur au niveau de la solution en sortie d'HPLC, on parle d'électronébulisation (Schéma 40). Il y a formation d'un spray du au gaz nébuliseur constitué de gouttelettes qui sont non uniformément chargées à cause de la tension électrique. Le diamètre de ces dernières diminue du fait de la désolvatation jusqu'au moment où le phénomène de répulsion de charges provoque l'éclatement des gouttelettes dans des explosions coulombiennes en série aboutissant à la formation d'ions. L'ionisation est effectuée soit par protonation, on parle d'ionisation en mode positif, soit par déprotonation (mode d'ionisation négatif).

L'analyseur de masse quadripolaire est le plus communément employé pour l'analyse des dommages à l'ADN. Il est constitué de quatre barreaux cylindriques entre lesquels deux champs électriques se superposent, un champ électrique oscillant (tension V) et un champ électrique fixe (tension V_0). En fonction des valeurs V et V_0 , les ions caractérisés par un certain rapport masse/charge (m/z) auront une trajectoire sinusoïdale stable leur permettant de se diriger vers le détecteur d'ions tandis que les autres ions seront défocalisés et se perdront dans le quadripôle (Schéma 40).

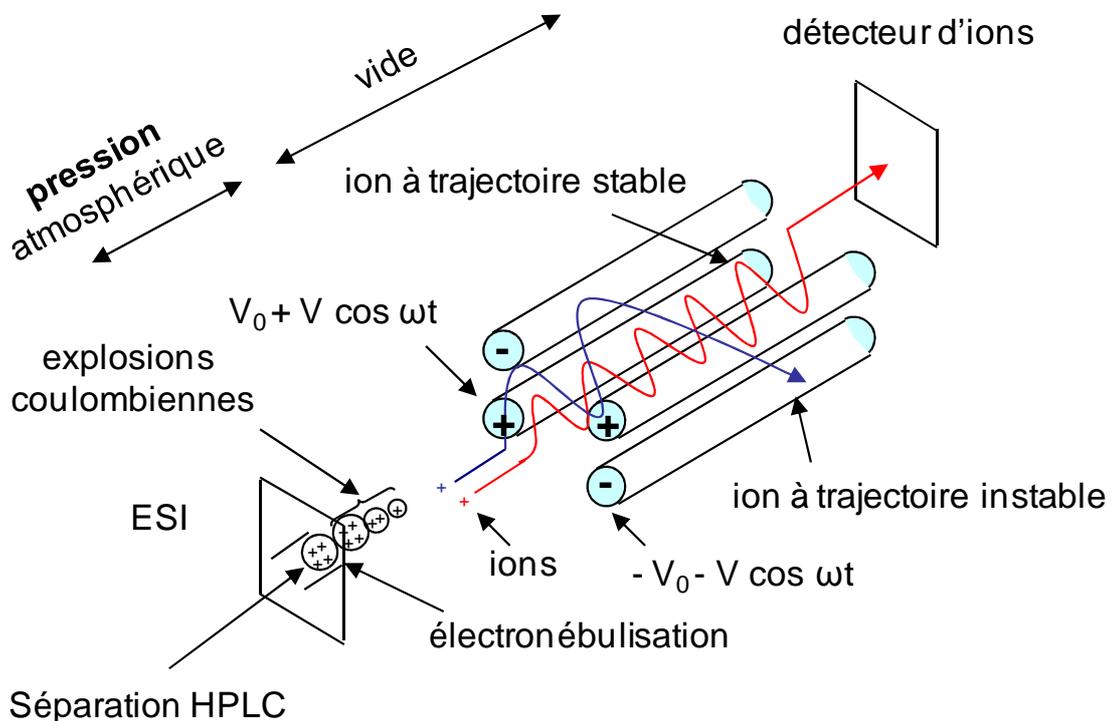


Schéma 40 : Principe de fonctionnement de l'ESI et d'un analyseur quadripolaire

Le mode « single ion monitoring » (SIM) (Schéma 41) correspond au mode de quantification de l'HPLC-MS, c'est-à-dire qu'en fixant le rapport m/z correspondant à l'analyte d'intérêt au niveau de l'analyseur quadripolaire, seul celui-ci sera détecté.

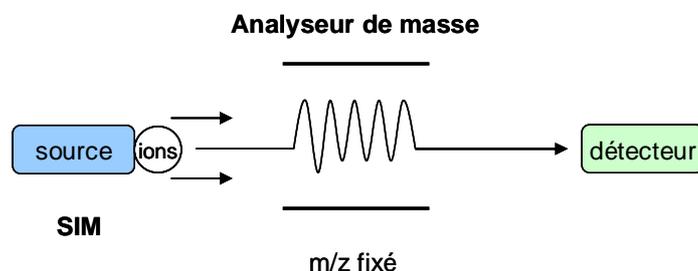


Schéma 41 : Principe de fonctionnement du mode SIM

Rao *et al.* ont synthétisé et caractérisé le HETE-N7Gua pour lequel ils ont mis au point une méthode de détection par HPLC-ESI-MS (Rao *et al.*, 2002). Ils ont pu détecter cet adduit après traitement d'ADN isolé et également après exposition percutanée de rats (détection dans le foie et dans la rate). Contrairement à ce dernier travail utilisant un spectromètre de masse à un étage, la plupart des dosages d'adduits se font en HPLC-MS/MS.

2.6. HPLC-MS/MS

L'HPLC-MS/MS, technique développée quelques années après l'HPLC-MS, est encore plus spécifique et sensible que cette dernière (Himmelstein *et al.*, 2009). Elle est à ce titre considérée comme la méthode standard pour la détection quantitative des dommages oxydatifs (Cadet and Poulsen, 2010) et des adduits (Tretyakova *et al.*, 2012). Le système triple quadripolaire constitue le système MS/MS le plus utilisé pour l'analyse des dommages à l'ADN (Singh and Farmer, 2006). Comme son nom l'indique, ce système est composé de trois quadripôles formant deux analyseurs de masse séparés par une cellule de collision.

On distingue trois principaux modes de fonctionnement dans un système triple quadripolaire pour l'analyse des adduits à l'ADN, le mode SRM (« selected reaction monitoring) pour la quantification des adduits, les modes «ion product » et CNL (« constant neutral loss ») pour leur caractérisation.

Le mode SRM (Schéma 42) permet de suivre spécifiquement une ou plusieurs réactions de fragmentation d'un ou plusieurs ions, on parle également de MRM (pour « multiple

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

reaction monitoring). Pour cela, les rapports m/z des ions d'intérêt sont fixés au niveau du premier analyseur de masse (quadripôle 1 ou Q1). Seuls ces ions sont alors capables de le traverser. Dans le Q2, qui correspond à la cellule de collision, les ions d'intérêt, également appelés ions parents, viennent percuter des molécules de gaz neutre (typiquement de l'azote ou de l'argon) au contact desquelles ils se fragmentent du fait de l'énergie de cinétique accumulée (ou énergie de collision). Cette énergie cinétique est convertie par les analytes en énergie interne aboutissant à leur dissociation (Singh and Farmer, 2006). Les ions fils générés dans la cellule de collision sont alors transférés dans le second analyseur de masse ou Q3 pour lequel certains rapports m/z sont fixés qui correspondent aux produits de fragmentation spécifiques des molécules cibles. Seuls les ions fils ayant le bon rapport m/z sont donc capables d'atteindre le détecteur d'ions. Le mode SRM est le mode le plus utilisé pour la détection des dommages à l'ADN (Singh and Farmer, 2006). Il offre en effet une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité que le mode SIM comme cela a été notamment montré pour la 8-oxo-dGuo avec une limite de détection qui passe de 5 pmol à 20 fmol (Ravanat *et al.*, 1998). Ce gain de sensibilité est du à une forte baisse du bruit de fond.

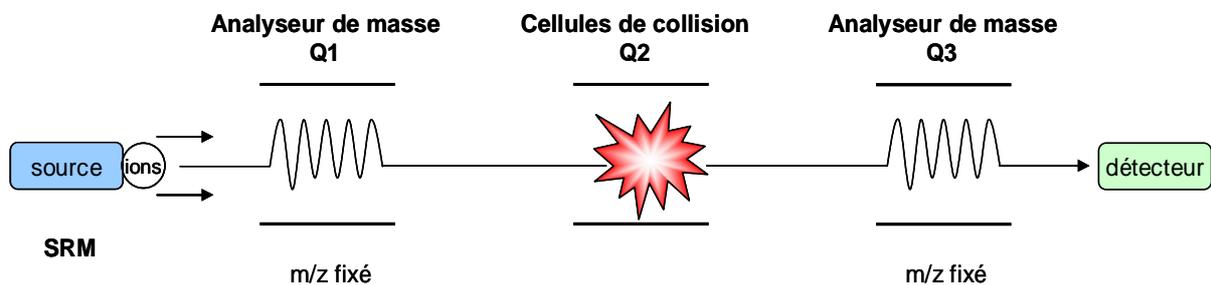


Schéma 42 : Principe de fonctionnement du mode SRM

Le mode CNL (Schéma 43) est utilisé pour la détection de dommages qui partagent un même type de fragmentation.

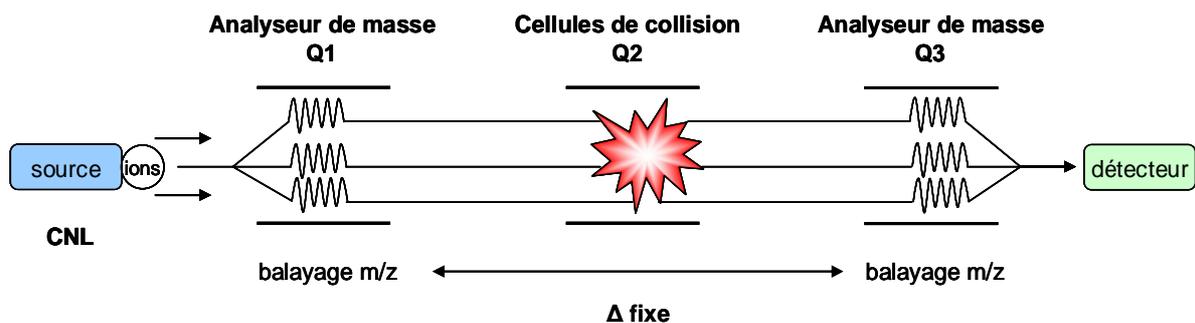


Schéma 43 : Principe de fonctionnement du mode CNL

Autrement dit, ces dommages génèrent après leur passage dans la cellule de collision un même fragment neutre, d'où le nom de CNL. Pour ce faire, les quadripôles Q1 et Q3 effectuent un balayage des rapports m/z avec une différence constante. Ce mode a entre autres été employé pour la détection de nouvelles lésions générées par les rayonnements gamma (Regulus *et al.*, 2004).

Le mode « ion product » (Schéma 44) du système triple quadripolaire permet, quant à lui, d'étudier les produits de fragmentations d'un analyte. Dans ce mode seule la molécule d'intérêt traverse le Q1 en fixant son rapport m/z et tous les ions fils générés dans la cellule de collision sont détectés en effectuant un balayage des rapports m/z correspondants dans le Q3.

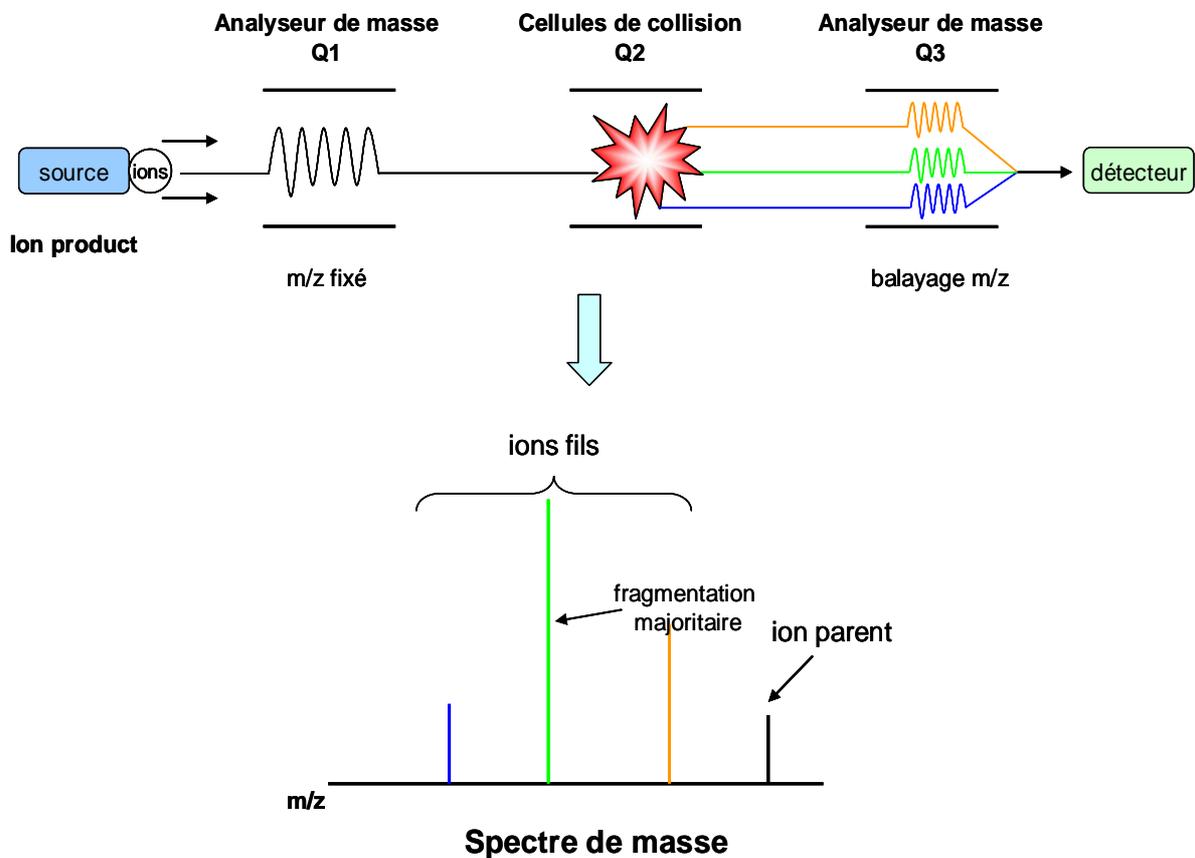


Schéma 44 : Principe de fonctionnement du mode « ion product »

En HPLC-MS/MS mode SRM, la calibration pour la quantification des dommages peut être effectuée avec étalons interne ou externe. Pour la calibration interne, un étalon de concentration connue est ajouté à l'échantillon avant son analyse. Il peut s'agir soit d'une molécule ayant une structure similaire à la lésion d'intérêt soit de cette même lésion marquée par exemple au ^{13}C (méthode de dilution isotopique). La quantification est réalisée par comparaison du signal du dommage avec celui de l'étalon interne. Pour la calibration externe,

une solution calibrée du dommage d'intérêt est préparée et est injectée en plus des échantillons à analyser. La quantification est alors effectuée en comparant l'aire des signaux obtenus à une courbe de calibration.

Fidder *et al.* sont les premiers à avoir utilisé l'HPLC-MS/MS pour détecter l'adduit majoritaire de l'ypérite, le HETE-N7Gua, dans de l'urine de cochons d'Inde (Fidder *et al.*, 1996). Ces derniers ont été exposés par voie intraveineuse à 0.5, 1 et 5 mg/kg d'ypérite et une formation dose dépendante a été mise en évidence. Plus récemment, Wei *et al.* ont mis au point une méthode de détection quantitative pour HETE-N7Gua qu'ils ont validée analytiquement et avec laquelle ils ont mis en évidence une dose réponse du taux de HETE-N7Gua après traitement de sang humain *ex vivo* (Wei *et al.*, 2011).

II. Mise au point d'une méthode de détection des adduits de l'ypérite et de son analogue monofonctionnel par HPLC-MS/MS

1. Introduction

Comme nous venons de le voir, plusieurs techniques ont été employées pour la détection, quantitative ou non, de l'adduit majoritaire de l'ypérite, soit l'adduit en position N7 de guanine. En revanche, très peu d'études ont fait état de l'analyse des autres lésions générées par le gaz moutarde. Or il est indispensable, pour mieux caractériser la génotoxicité de cette arme chimique de guerre, d'étudier tous les dommages qu'elle forme. En effet, ils peuvent ne pas exercer les mêmes effets toxiques ou mutagènes. Seuls les travaux de Brookes et Lawley d'une part et de Fider *et al.* d'autre part ont permis la détection des trois adduits majoritaires formés par l'ypérite (Brookes and Lawley, 1963; Fidder *et al.*, 1994). L'inconvénient majeur de ces travaux est l'utilisation du gaz moutarde marqué au ³⁵S qui limite le nombre d'analyses pouvant être réalisées en raison de la lourdeur du traitement des échantillons. C'est la raison pour laquelle dans ces études, l'emploi de l'ypérite marquée au ³⁵S n'a été appliqué qu'à un nombre d'échantillons restreint, essentiellement de l'ADN isolé et une fois dans du sang traité *ex vivo*.

L'axe principal de ce travail de thèse étant la quantification des adduits de l'ypérite *in vivo* dans des tissus variés, il nous fallait donc une méthode qui permette l'analyse de grandes

séries d'échantillons. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de mettre au point une méthode de détection quantitative des trois adduits de l'ypérite (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade, N7Gua-ETE-N7Gua) par HPLC-MS/MS. Le choix de cette technique, bien que moins sensible que celle employant des composés radioactifs ou que le post-marquage au ^{32}P , a également été dicté par sa très bonne spécificité liée à la possibilité de caractériser la structure des adduits. En outre, elle présente l'avantage d'une facilité de mise en œuvre avec une automatisation des injections qui nous a permis d'effectuer plus d'une vingtaine d'analyses par jour. Cette méthode a été ensuite étendue à la détection quantitative des adduits du CEES (ETE-N7Gua, ETE-N3Ade), analogue de l'ypérite largement utilisé dans la littérature.

Avant de décrire la démarche entreprise pour mettre au point la méthode dédiée à la mesure de la fréquence des adduits du gaz moutarde, nous allons présenter comment le dosage des lésions de l'ADN par HPLC-MS/MS avec un système quadripolaire est opéré classiquement au laboratoire.

2. Méthode de détection quantitative des lésions de l'ADN au laboratoire

Une fois l'ADN contenant le dommage d'intérêt isolé, celui-ci est tout d'abord hydrolysé en 2'-désoxyribonucléosides. Pour cela, une digestion enzymatique est effectuée en deux étapes réalisées chacune pendant 2h à 37°C. Pour chaque étape, un cocktail enzymatique spécifique est employé. Lors de la première étape, opérée à pH 6, l'ADN est hydrolysé par l'action de la phosphodiesterase II, de la désoxyribonucléase II et de la nucléase P1. La phosphodiesterase II est une 3'-exonucléase qui génère des 2'-désoxyribonucléosides-3'-monophosphate. La désoxyribonucléase II et la nucléase P1 sont des endonucléases qui vont libérer respectivement des petits oligonucléotides 3' et 5'-monophosphate. La seconde étape, réalisée à pH 8, fait intervenir la phosphodiesterase I, une 5'-exonucléase qui va générer des 2'-désoxyribonucléosides-5'-monophosphate. Son action complète celle de la phosphodiesterase II qui peut être bloquée par la présence des lésions. Au cours de cette deuxième étape, les 2'-désoxyribonucléosides monophosphates sont transformés en 2'-désoxyribonucléosides par l'action de la phosphatase alcaline. Ce protocole d'hydrolyse permet une digestion totale de l'ADN, ce qui est nécessaire pour une quantification précise des lésions. A l'issue de l'hydrolyse enzymatique, un mélange de 2'-désoxyribonucléosides normaux et de 2'-désoxyribonucléosides modifiés (correspondant aux dommages) est obtenu,

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

ces derniers étant présent en faible proportion. Ce mélange est alors séparé en HPLC et une première détection en UV est effectuée. Celle-ci permet de quantifier, grâce à une calibration externe, les nucléosides normaux. Cette quantification est réalisée dans le but de normaliser celle des dommages à la quantité d'ADN analysé. Ensuite, le mélange séparé de 2'-désoxyribonucléosides normaux et de 2'-désoxyribonucléosides modifiés est dirigé vers le spectromètre de masse. L'ionisation des nucléosides est réalisée par électro-nébulisation en mode positif ou négatif (en fonction du type de lésions). Les rapports m/z de l'ion parent et du ou des ions fils, de même que les paramètres de focalisation des lentilles et l'énergie de collision, sont fixés de sorte que seule la lésion d'intérêt et les produits spécifiques de sa fragmentation soient détectés de façon optimale. Au laboratoire, il existe de nombreuses méthodes de détections quantitatives de 2'-désoxyribonucléosides modifiés avec des calibrations aussi bien en interne qu'en externe.

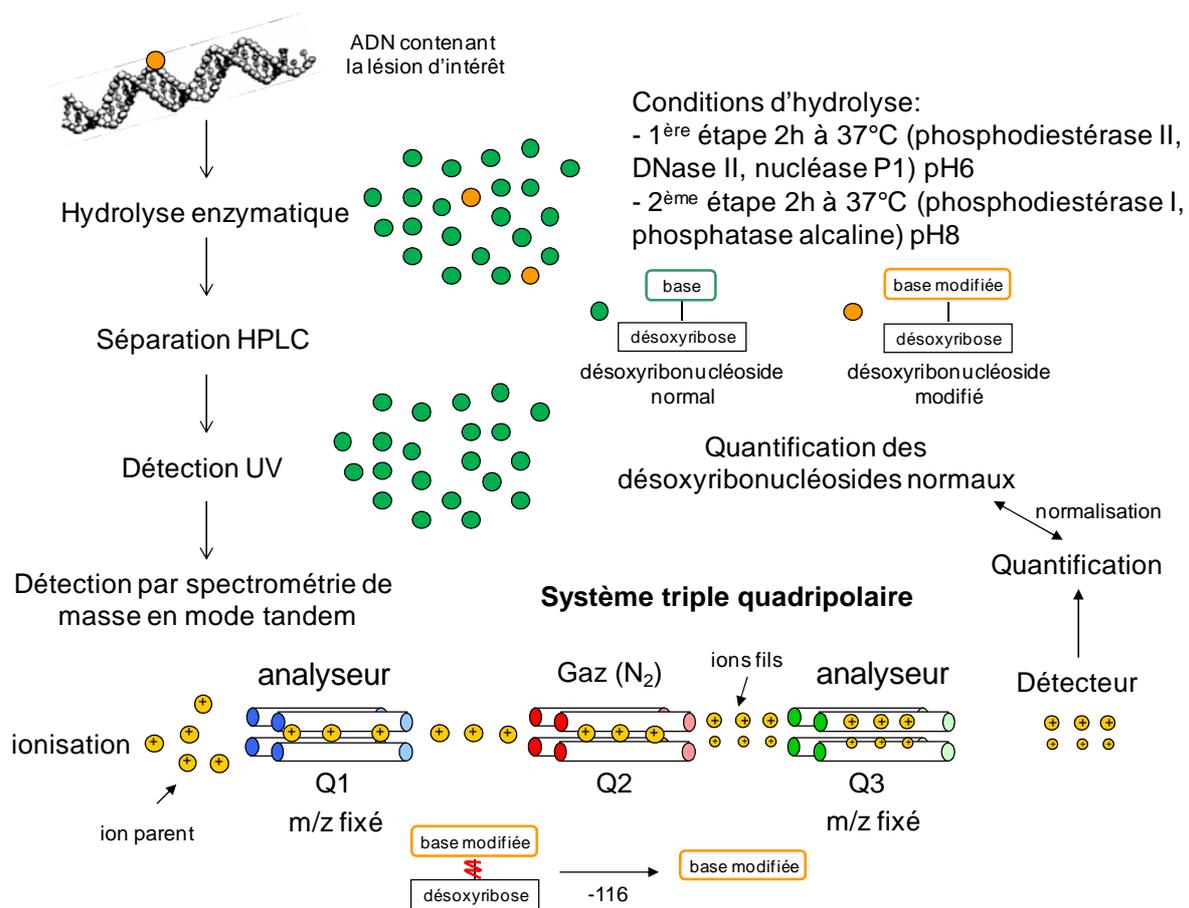


Schéma 45 : *Détection quantitative des lésions à l'ADN par HPLC-MS/MS au laboratoire*

Très souvent un des ions fils suivi correspond à la cassure de la liaison N-glycosidique et constitue la perte d'un fragment du désoxyribose, soit une perte de 116 unités de masse

atomique (uma). La quantification du dommage est alors effectuée et est normalisée par rapport à la quantité de 2'-désoxyribonucléosides normaux déterminée en UV à 280 voire 300 nm, la détection UV étant réalisée juste après la séparation chromatographique (Schéma 45).

3. Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite

Contrairement aux lésions quantifiées au laboratoire, celles induites par l'ypérite sont instables et se dépurinent (Brookes and Lawley, 1960). Un risque de sous-estimation était donc à prendre en compte pour leur quantification sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés. Afin d'évaluer si la dépurination des adduits du gaz moutarde avait lieu dans les conditions de la digestion enzymatique classiquement effectuée au laboratoire, nous les avons caractérisés, après leur synthèse, à la fois sous forme de 2'-désoxyribonucléosides et de bases modifiés en HPLC-MS/MS.

3.1. Synthèse des adduits de l'ypérite

Afin de synthétiser les adduits de l'ypérite, deux types de réactions étaient envisageables. La première était de faire réagir l'ypérite avec les nucléosides comme cela a été fait par d'autres (Brookes and Lawley, 1963; Fidler *et al.*, 1994; Ludlum *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2002; van der Schans *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 1994). La seconde était de faire réagir directement l'ypérite avec de l'ADN isolé puis de l'hydrolyser. Nous avons opté pour cette dernière approche qui présente l'avantage d'obtenir le biadduit en plus grande quantité. En effet, la formation de N7Gua-ETE-N7Gua est étroitement liée à la présence de deux résidus guanine proches l'un de l'autre, ce qui est peu probable dans des solutions diluées de monomères. La synthèse des adduits de l'ypérite a été effectuée à l'IRBA (un des deux sites en France où ce toxique est utilisé en recherche) sous une hotte chimique et en utilisant l'équipement adéquat (combinaison, masque à gaz, triple paire de gants dont une en butyle). Une solution d'ADN de thymus de veau (1 mg/mL) dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) a été traitée avec 30 mM de gaz moutarde. La réaction s'est déroulée pendant 4 h à température ambiante avec agitation toutes les 30 min. Au bout des 4 h de réaction, l'ADN a été précipité par ajout d'éthanol absolu et de chlorure de sodium (NaCl). Plusieurs lavages à l'éthanol 70% (v/v) ont été effectués dans le but d'éliminer d'éventuelles traces d'ypérite.

L'ADN a alors été resuspendu dans de l'eau ultrapure et congelé avant son hydrolyse et la caractérisation des adduits en HPLC-MS/MS.

3.2. Caractérisation des adduits de l'ypérite en HPLC-MS/MS

Suite à la synthèse des adduits, l'ADN a soit été hydrolysé enzymatiquement selon les conditions présentées plus haut, soit subi une hydrolyse acide. A l'issue de ces deux protocoles, les adduits ont été obtenus respectivement sous forme de 2'-désoxyribonucléoside modifié, N7-hydroxyéthyléthyl-2'-désoxyguanosine (HETE-N7dGuo) et N3-hydroxyéthyléthyl-2'-désoxyadénosine (HETE-N3dAdo), et de bases modifiées (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua). Le biadduit n'a pas été caractérisé sous sa forme 2'-désoxyribonucléoside modifié.

Après la séparation par HPLC, les adduits ont été analysés en spectrométrie de masse (ionisation en mode positif). Pour cela, leur spectre de masse, c'est-à-dire la caractérisation de leurs produits de fragmentation, a été établi. Le mode « ion product » du système triple quadripolaire a ainsi été employé. L'étude de la fragmentation des monoadduits de l'ypérite sous forme 2'-désoxyribonucléosides modifiés montre que les fragments majoritaires résultent de la rupture de la liaison N-glycosidique (Figure 1A et Figure 1B). Le fragment de désoxyribose qui en est issu constitue un fragment neutre, il n'est donc pas détecté. En revanche, les bases modifiées dérivées de cette rupture sont, elles, chargées et ce sont donc elles qui sont détectées. Les ions majoritairement obtenus ont des rapports m/z de 256 (HETE-N7dGuo) et 240 (HETE-N3dAdo). En ce qui concerne la fragmentation des monoadduits sous leur forme de bases modifiées, c'est la partie réactive de l'ypérite ($m/z = 105$) qui correspond à l'ion fils majoritaire (Figure 1C et Figure 1D). Pour le biadduit, le fragment principal a un rapport m/z de 210 (Figure 1E).

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

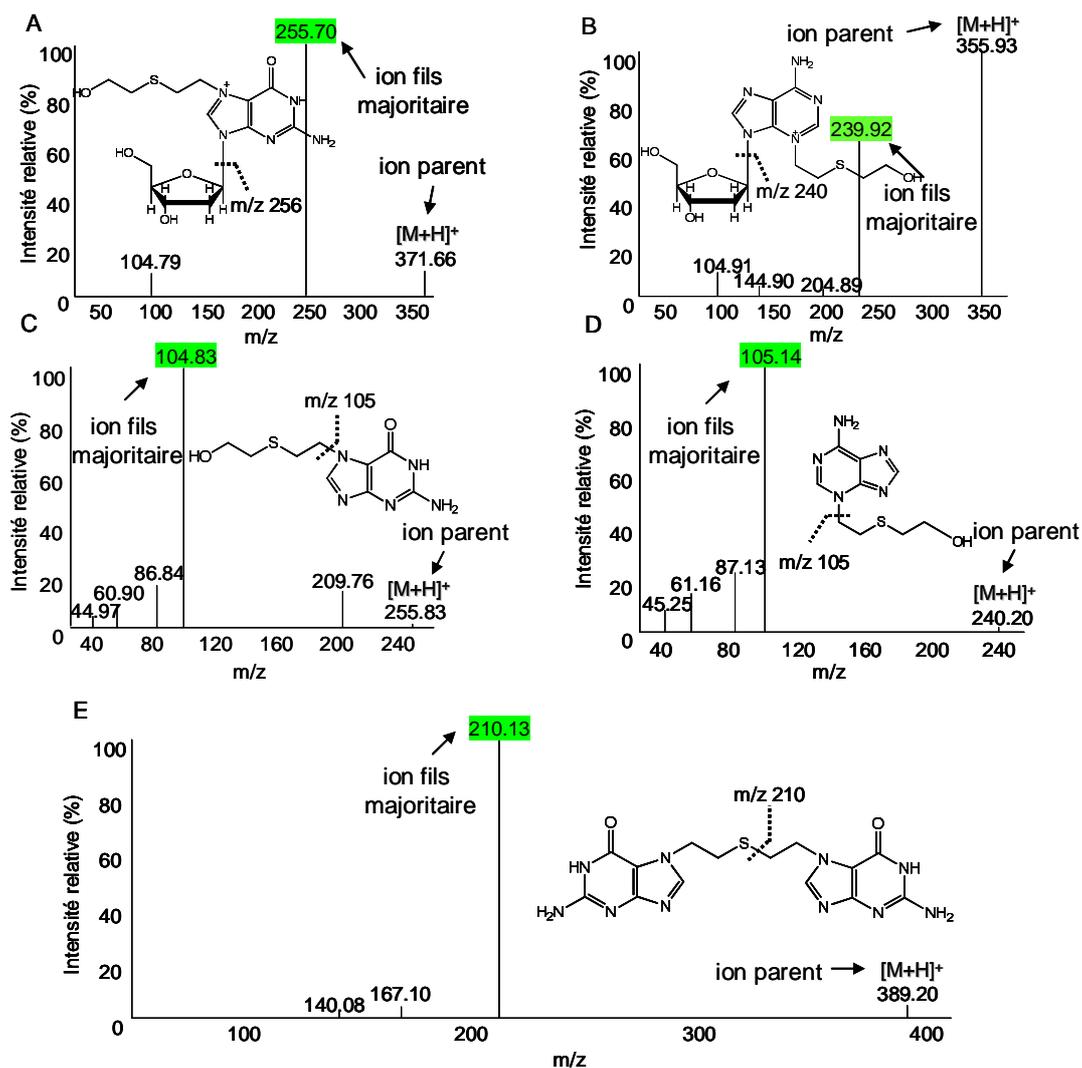


Figure 1 : Spectres de masse des adduits de l'ypérite sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés

HETE-N7dGuo (A), HETE-N3Ado (B), HETE-N7Gua (C), HETE-N3Ade (D) et N7Gua-ETE-N7Gua (E)

Un gradient d'acétonitrile dans une solution aqueuse de formiate d'ammonium a ensuite été optimisé (Tableau 1) pour la séparation de ces adduits par HPLC sur une colonne en phase inverse (système 1 : voir p.285).

| temps (min) | gradient | |
|-------------|-------------------------|------------------|
| | formiate d'ammonium (%) | acétonitrile (%) |
| 0-15 | 93 | 7 |
| 15-30 | 85 | 15 |
| 30-35 | 70 | 30 |

Tableau 1 : Gradient optimisé pour la séparation des adduits de l'ypérite par HPLC

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

Avec ce gradient, les temps de rétention des monoadduits sous forme de 2'-2'-désoxyribonucléosides modifiés étaient plus courts que ceux des monoadduits sous forme de bases modifiées (Tableau 2).

| adduits | temps de rétention (min) | ion parent (m/z) | ion fils majoritaire (m/z) |
|-----------------|--------------------------|------------------|----------------------------|
| HETE-N7dGuo | 20,8 | 372 | 256 |
| HETE-N3dAdo | 21,9 | 356 | 240 |
| HETE-N7Gua | 21,9 | 256 | 105 |
| HETE-N3Ade | 23,8 | 240 | 105 |
| N7Gua-ETE-N7Gua | 29,9 | 389 | 210 |

Tableau 2 : Caractérisation HPLC-MS/MS des adduits de l'ypérite sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés

3.3. Etude de la dépurination des adduits de l'ypérite dans les conditions de la digestion enzymatique

Une fois la caractérisation en HPLC-MS/MS effectuée, nous avons voulu savoir si, dans les conditions de la digestion enzymatique utilisée au laboratoire, les adduits sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés se dépurinaient. De l'ADN traité avec de l'ypérite a été hydrolysé enzymatiquement dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites. Puis, les solutions de 2'-désoxyribonucléosides obtenues ont été incubées à 37°C dans les tampons utilisés pour chacune des étapes de l'hydrolyse, pH 6 pour la première et pH 8 pour la seconde. La vitesse de dépurination de HETE-N7dGuo a été déterminée en HPLC-MS/MS en suivant la perte d'un fragment du désoxyribose (signal MRM : m/z 372→256). Les résultats obtenus montrent que la dépurination a bien lieu dans ces conditions et qu'elle est plus rapide à pH 6 qu'à pH 8 (Figure 2). En considérant que la dépurination observée suit une cinétique d'ordre 1, les constantes de vitesse de HETE-N7dGuo ont été calculées pour les deux étapes de digestion. Elles sont de $0.45 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$ à pH 6 et de $0.044 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$ à pH 8. Les temps de demi-vie correspondant sont de 1.5 et 16 h. L'instabilité de HETE-N3dAdo dans ces conditions a également été confirmée. Dans ces conditions, la quantification des adduits de l'ypérite sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés n'est pas envisageable puisqu'elle fournirait des valeurs sous-estimées.

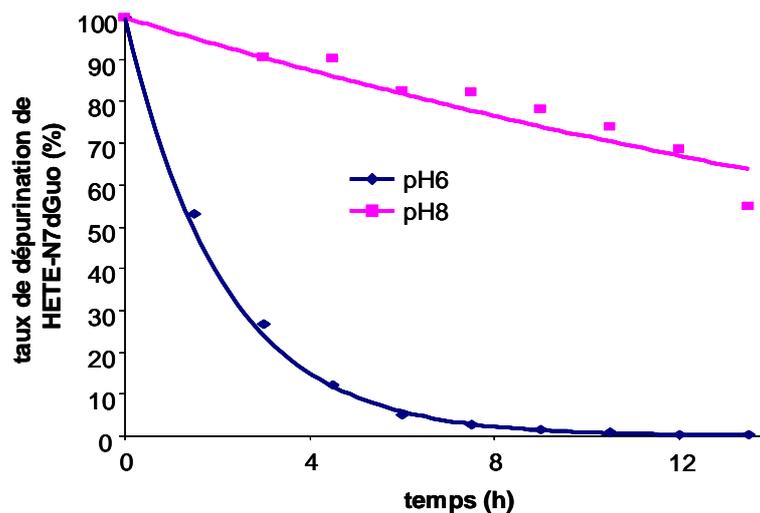


Figure 2 : Cinétique de dépurination de HETE-N7dGuo

De l'ADN (1 mg/mL) traité avec 30 mM d'ypérite dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) a été hydrolysé enzymatiquement (deux étapes de 2h à 37°C, la première à pH 6 et la seconde à pH 8) puis a été laissé incubé à pH 6 ou pH 8 à 37°C. HETE-N7dGuo a été détecté en HPLC-MS/MS en utilisant la perte d'un fragment du désoxyribose (-116 uma) comme transition (372 → 256).

3.4. Essais d'hydrolyse

Dans le but d'essayer de remédier à la sous-estimation de la quantification des adduits de l'ypérite sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés dans les conditions de la digestion enzymatique telle que pratiquée classiquement au laboratoire, nous avons testé plusieurs protocoles d'hydrolyse en faisant varier différents facteurs à savoir le temps, la température ou encore la nature des enzymes de digestion. Ces changements ont pour l'essentiel concerné la première étape d'hydrolyse. Nous l'avons raccourcie à 15 min au lieu de 2h avec ou sans l'ajout de nucléase micrococcale (endonucléase qui génère des 2'-désoxyribonucléosides-3'-monophosphate) (digestions 2 et 3 respectivement). Nous l'avons également réalisée à 10°C au lieu de 37°C (digestion 4). Enfin, nous avons effectué une digestion de 15 min en ajoutant la phosphatase acide (déphosphoryle les groupements phosphate comme la phosphatase alcaline mais en milieu acide) aux enzymes présentes dans la première étape (digestion 5).

Le taux de HETE-N7dGuo dans l'ADN déterminé à l'issue de ces différentes hydrolyses a été exprimé par rapport à celui obtenu lors de la digestion standard opérée au laboratoire (digestion 1) (Figure 3).

Il est identique pour les digestions 1, 2, 3 et 5. Pour la digestion 4, ce taux est approximativement deux fois plus élevé que pour la digestion 1, illustrant ainsi une

dépuration moindre de HETE-N7dGuo lorsque la température de la première étape de digestion est abaissée à 10°C. Toutefois, les conditions de la digestion 4 ne la préviennent pas totalement. En effet, parallèlement à la détection de HETE-N7dGuo, nous avons recherché le même adduit sous sa forme base modifiée (HETE-N7Gua) et celui-ci était décelable quelle que soit la digestion considérée, signe évident de dépuration.

La quantification précise des adduits de l'ypérite sous formes de 2'-désoxyribonucléosides modifiés n'étant pas possible du fait de leur dépuration, le choix a été fait de mesurer leur fréquence sous forme de bases modifiées.

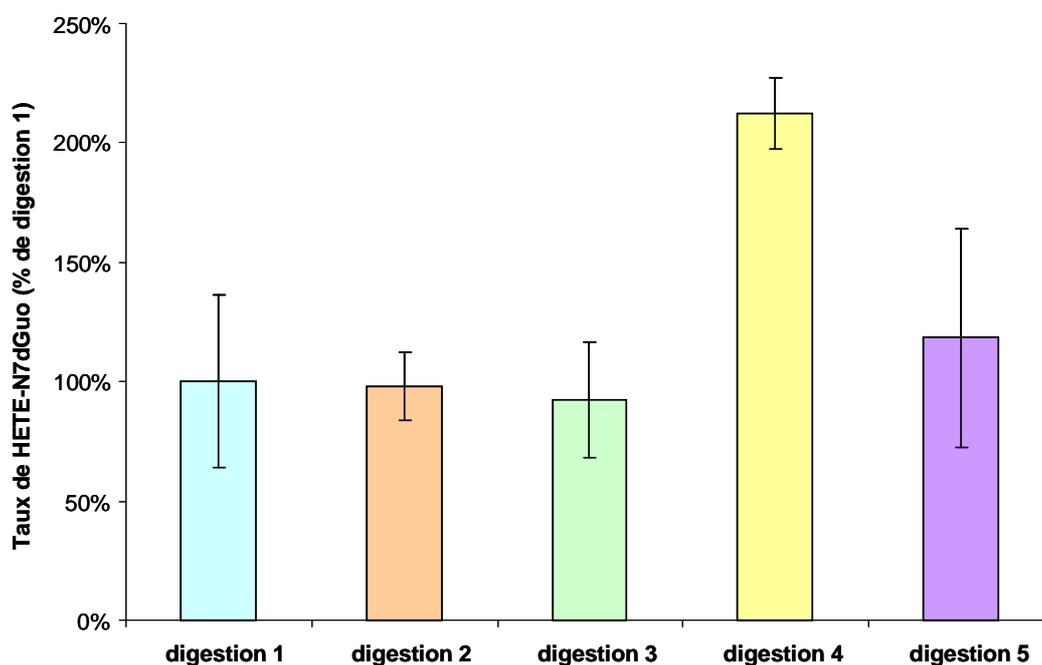


Figure 3 : Détection semi-quantitative de HETE-N7dGuo après différents protocoles d'hydrolyse

Digestion 1 : hydrolyse enzymatique classiquement effectuée au laboratoire en deux étapes de 2h à 37°C, la première à pH 6 (phosphodiesterase II, désoxyribonucléase II et nucléase P1) et la seconde à pH 8 (phosphodiesterase I et phosphatase alcaline) ; digestion 2 : hydrolyse enzymatique réalisée au laboratoire avec une première étape de 15 min au lieu de 2h ; digestion 3 : hydrolyse enzymatique opérée au laboratoire avec une première étape de 15 min au lieu de 2h et avec en plus la nucléase micrococcalle ; digestion 4 : hydrolyse enzymatique du laboratoire avec la première étape effectuée à 10°C ; digestion 5 : hydrolyse enzymatique de 15 min avec la phosphatase acide en plus des enzymes de l'étape 1 de la digestion au laboratoire. Les résultats représentent le taux de HETE-N7dGuo (deux expériences indépendantes) détecté en HPLC-MS/MS en utilisant la perte du désoxyribose comme transition (372 → 256). Le taux de HETE-N7dGuo obtenu après les digestions 2 à 5 est exprimé en pourcentage de celui calculé après la digestion 1.

3.5. Optimisation des conditions d'hydrolyse

Le choix de quantifier les adduits de l'ypérite sous leur forme bases modifiées impliquait d'optimiser les conditions d'hydrolyse afin d'une part de dépuriner de manière quantitative les adduits et d'autre part éviter leur surestimation. En effet, l'ypérite est capable d'alkyler l'ARN aux mêmes positions qu'au niveau de l'ADN et la mesure du taux de bases modifiées ne permet pas la distinction entre celles provenant de l'ADN ou celles issues de l'ARN (seul la présence des sucres les différencierait). Il a en effet été montré que lors de l'extraction d'ADN, il pouvait subsister des traces d'ARN, sources de surestimation pour la quantification, même à l'issue d'un traitement avec des ribonucléases (RNases) (Ravanat *et al.*, 2002). En outre, même si de manière générale, les ribonucléosides modifiés sont décrits comme plus stable que leurs analogues 2'-désoxyribonucléosides, encore fallait-il déterminer dans quelle mesure c'était le cas pour ceux formés par le gaz moutarde.

3.5.1. Dépuration quantitative des adduits de l'ypérite sous forme 2'-désoxyribonucléosides modifiés

Dans le but de forcer la dépuration naturelle des adduits de l'ypérite, nous avons testé différents protocoles d'hydrolyse. L'ajout d'une étape d'hydrolyse thermique neutre pendant 20 min à 90 °C après la digestion enzymatique s'est révélé efficace. En effet, concomitamment à la disparition du signal des adduits sous formes 2'-désoxyribonucléosides modifiés (Figure 4), celui des bases modifiées augmentait.

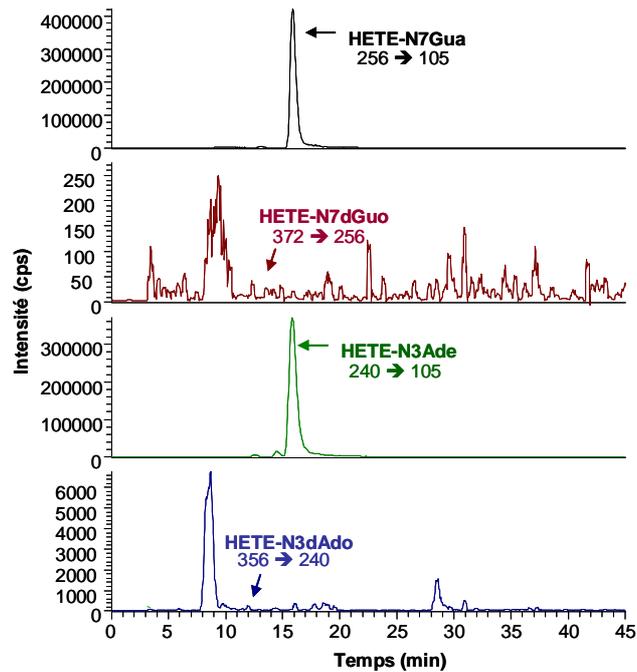


Figure 4 : Chromatogrammes des monoadduits de l'ypérite sous forme de bases et de 2'-désoxyribonucléosides modifiés

De l'ADN (1 mg/mL) traité avec de l'ypérite 30 mM dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) a été digéré enzymatiquement puis a subi une hydrolyse thermique pendant 20 min à 90°C. Dans ces conditions, les pics correspondant à HETE-N7dGuo et HETE-N3dAdo ne sont plus détectables (système HPLC 2).

3.5.2. Etude de la stabilité des adduits à l'ARN de l'ypérite

Afin d'étudier la stabilité des adduits à l'ARN que forme le gaz moutarde, de l'ARN de levure (1 mg/mL) dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) a été traité avec de l'ypérite 30 mM dans les mêmes conditions que celles employées lors de la synthèse des adduits à l'ADN. L'ARN traité a été hydrolysé enzymatiquement puis a subi une hydrolyse thermique à 90°C pendant différents temps. Les adduits à l'ARN, HETE-N7-guanosine (HETE-N7Guo) et HETE-N3-adénosine (HETE-N3Ado), ont alors été détectés en HPLC-MS/MS. Les transitions utilisées pour cela ont été déterminées par analogie à celles des adduits à l'ADN (sous formes de 2'-désoxyribonucléosides modifiés) correspondant. En effet, c'est la perte d'un fragment du ribose (-132 uma) qui a été ici suivie (388 → 256 pour HETE-N7Guo et 372 → 240 pour HETE-N3Ado).

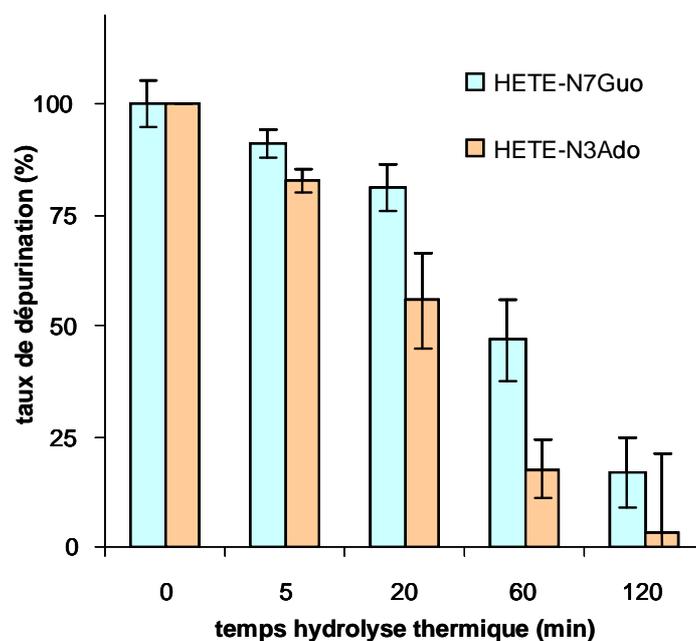


Figure 5 : *Cinétique de la stabilité des adduits à l'ARN de l'ypérite*

De l'ARN de levure (1 mg/mL) a été traité avec de l'ypérite dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) puis a été digéré enzymatiquement. Une hydrolyse thermique a ensuite été effectuée de 5 à 120 min. Les adduits à l'ARN ont été détectés en HPLC-MS/MS en utilisant la perte d'un fragment du ribose (-132 uma) comme signal : 388 → 256 pour HETE-N7Guo et 372 → 240 pour HETE-N3Ado. Les résultats représentent trois expériences indépendantes et sont exprimés en pourcentage du contrôle (digestion enzymatique seule).

Les résultats obtenus (Figure 5) indiquent qu'aucune dépurination des adduits à l'ARN n'a lieu dans les conditions de la digestion enzymatique (absence de pics des adduits sous forme de base). Après une hydrolyse thermique de 20 min, les taux de dépurination de HETE-N7Guo et HETE-N3Ado sont respectivement de $19 \pm 5.3\%$ et de $44 \pm 10.9\%$. Ce n'est qu'après une hydrolyse thermique de 2h que le taux de dépurination de HETE-N7Guo dépasse les 75%. Bien que la dépurination des ribonucléosides modifiés soit la plus faible après une hydrolyse thermique de 5 min, cette dernière n'est pas suffisante pour dépuriner complètement les 2'-désoxyribonucléosides correspondant.

Les conditions d'hydrolyse retenues pour la détection quantitative des adduits de l'ypérite sous forme de bases modifiées sont donc une hydrolyse enzymatique suivie d'une hydrolyse thermique neutre de 20 min à 90°C, cette dernière permettant de forcer complètement la dépurination naturelle des adduits à l'ADN tout en limitant celle des adduits à l'ARN. Il est important de préciser que dans ces conditions, les 2'-désoxyribonucléosides normaux ne sont pas dépurinés.

3.6. Préparation de solutions calibrées

Une fois les conditions d'hydrolyse optimisées pour la détection des adduits de l'ypérite sous forme de bases modifiées, nous en avons préparés des solutions calibrées pour réaliser des analyses quantitatives.

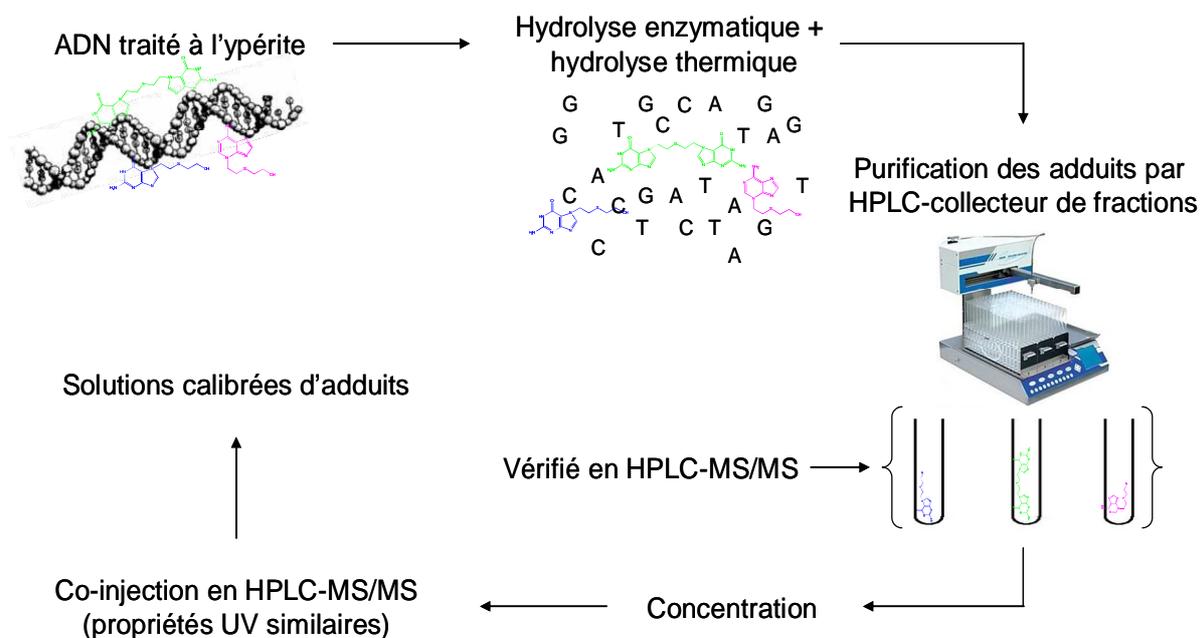


Schéma 46 : Calibration UV des adduits

Pour cela, de l'ADN traité à l'ypérite a été hydrolysé selon les conditions retenues (hydrolyse enzymatique suivie d'une hydrolyse thermique neutre). Le mélange des adduits du gaz moutarde et des 2'-désoxyribonucléosides normaux a ensuite été séparé par un système HPLC-collecteur de fractions. Les fractions contenant les adduits ont été identifiées par HPLC-MS/MS. Suite à leur identification, les solutions d'adduits ont été concentrées en évaporant les solvants issus de la séparation HPLC et en les lyophilisant. Après remise en solution, une calibration en UV a été effectuée. Les signaux UV des adduits ont été comparés à ceux de composés (concentration connue) possédant des propriétés similaires. De plus, les coefficients d'extinction molaire des adduits ont été approximés par ceux, respectivement, de la 3-méthyladénosine (Jones and Robins, 1963), la 7-méthylguanosine (Fujii *et al.*, 1989) et du biadduit formé par le cyclophosphamide (Malayappan *et al.*, 2010).

Ayant obtenu des solutions d'adduits calibrées, nous avons ensuite optimisé la détection du signal en testant notamment plusieurs voltages pour l'ionisation, différentes énergies de

collision pour la fragmentation et en ajustant les voltages des lentilles qui refocalisent les ions avant leur entrée dans les quadripôles.

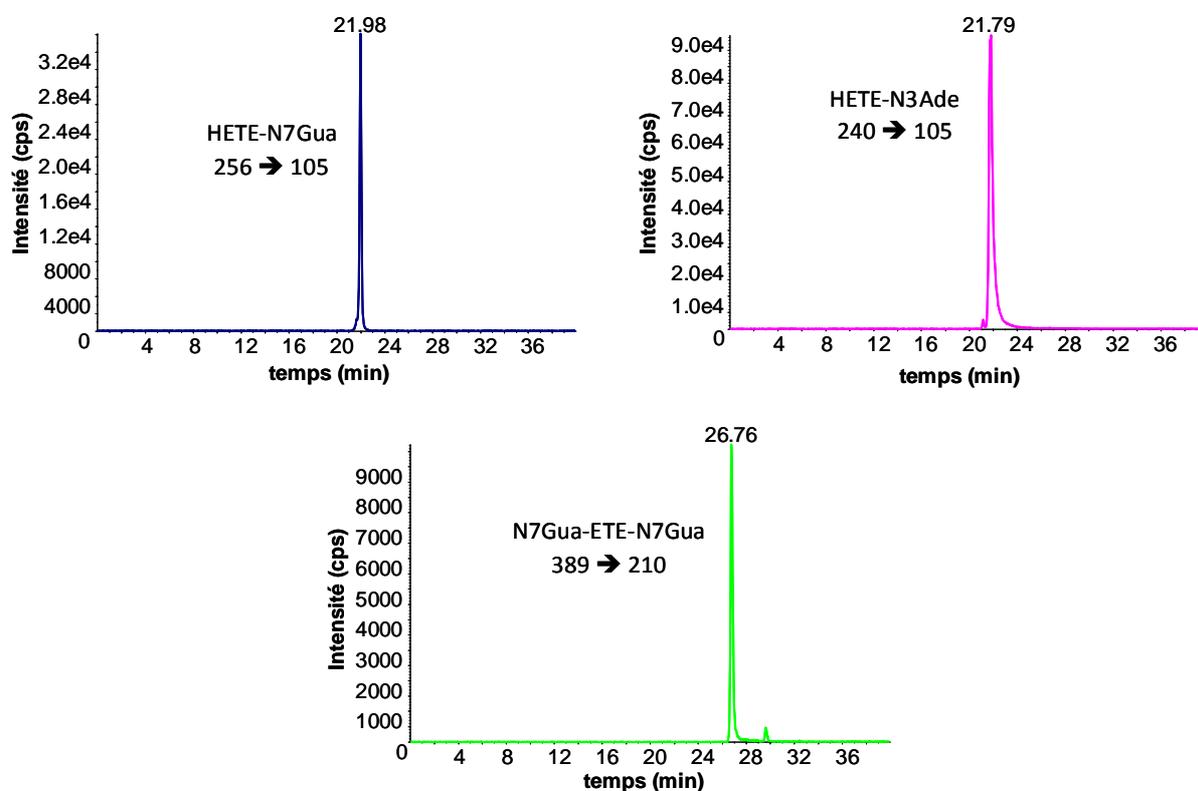


Figure 6 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole de chacun des adduits de l'ypérite

3.7. Extension de la méthode aux adduits du CEES

Le CEES étant un analogue de l'ypérite très utilisé, nous avons mis au point une méthode de détection quantitative par HPLC-MS/MS de ses adduits. Du fait qu'il ne comporte qu'un seul atome de chlore, le CEES ne forme que des monoadduits aux mêmes positions que celles des monoadduits du gaz moutarde (Ludlum *et al.*, 1986; Matijasevic *et al.*, 2001). Nous avons donc suivi le même mode opératoire pour le développement de la méthode.

La synthèse des adduits du CEES a été réalisée dans les mêmes conditions que ceux de l'ypérite. Bien qu'il soit également cancérigène, le CEES, à la différence du gaz moutarde, peut être manipulé dans tous les laboratoires. C'est la raison pour laquelle il est souvent employé pour mimer les effets de l'ypérite. Une fois synthétisés, les adduits ont été caractérisés en HPLC-MS/MS à la fois sous forme de 2'-désoxyribonucléosides et de bases

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

modifiés. De la même manière que pour les adduits de l'ypérite, les ions fils majoritaires des adduits du CEES sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés sont dus à la rupture de la liaison N-glycosidique (Figure 7 A et Figure 7B) et ceux des adduits sous forme de bases modifiées correspondent à la partie réactive du CEES ($m/z = 89$) (Figure 7C et Figure 7D).

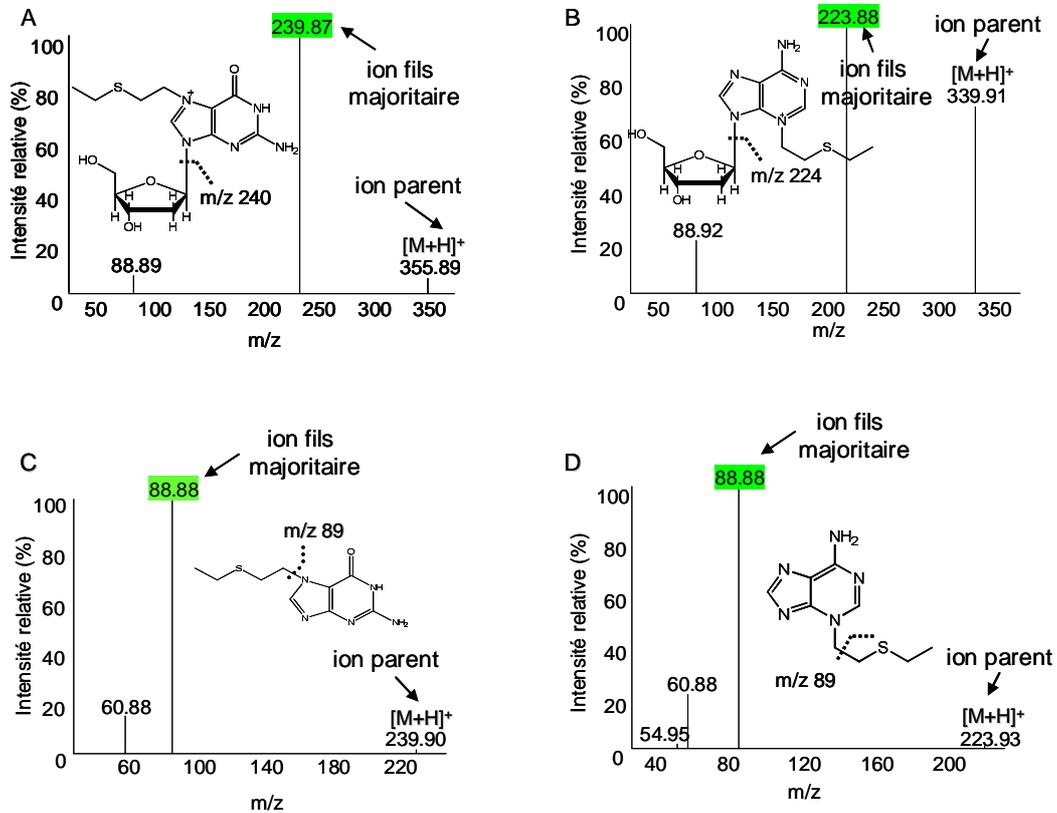


Figure 7 : Spectres de masse des adduits du CEES sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés

ETE-N7dGuo (A), ETE-N3Ado (B), ETE-N7Gua (C) et ETE-N3Ade (D)

Un gradient d'acétonitrile dans une solution aqueuse de formiate d'ammonium a ensuite été optimisé (Tableau 3). Avec celui-ci, les temps de rétention des adduits du CEES sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés sont, comme pour les adduits du gaz moutarde, plus courts que ceux des bases modifiées.

| adduits | temps de rétention (min) | ion parent (m/z) | ion fils majoritaire (m/z) |
|------------|--------------------------|------------------|----------------------------|
| ETE-N7dGuo | 23,5 | 356 | 240 |
| ETE-N3dAdo | 25,1 | 340 | 224 |
| ETE-N7Gua | 38,2 | 240 | 89 |
| ETE-N3Ade | 40,2 | 224 | 89 |

Tableau 3 : *Caractérisation HPLC-MS/MS des adduits du CEES sous forme 2'-désoxyribonucléosides et bases modifiés*

A l'instar de HETE-N7dGuo, l'adduit majoritairement formé par le CEES, ETE-N7dGuo, se dépurine plus rapidement à pH 6 qu'à pH 8 dans les conditions de la digestion enzymatique effectuée au laboratoire (Figure 8). Les demi-vies (hypothèse d'une cinétique d'ordre 1) sont respectivement de 3.8 et 14.9h. L'instabilité de ETE-N3Ado dans ces conditions a également été constatée.

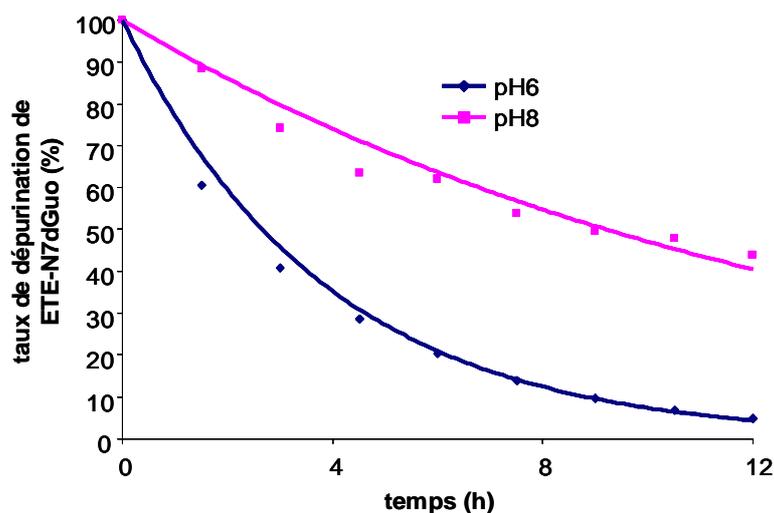


Figure 8 : *Cinétique de dépurination de ETE-N7dGuo*

De l'ADN (1 mg/mL) traité avec 30 mM de CEES dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) a été hydrolysé enzymatiquement (deux étapes de 2h à 37°C, la première à pH 6 et la seconde à pH 8) puis a été laissé incubé à pH 6 ou pH 8 à 37°C. ETE-N7dGuo a été détecté en HPLC-MS/MS en utilisant la perte d'un fragment du désoxyribose (-116 uma) comme transition (356 → 240).

Les adduits sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés du CEES se comportant de façon similaire à ceux de l'ypérite dans les conditions de la digestion enzymatique, nous avons donc décidé de les quantifier sous forme de bases modifiées. En ajoutant une étape d'hydrolyse thermique neutre pendant 20 min à 90°C après cette dernière, la dépurination des adduits du CEES est complète.

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

L'analyse de la stabilité des adduits à l'ARN du CEES consécutivement à une hydrolyse enzymatique et une hydrolyse thermique à 90°C de 5 à 120 min montre que ces derniers sont légèrement moins stables que ceux de l'ypérite (Figure 9). Par exemple, après 20 min d'hydrolyse thermique à 90°C, les taux de dépurination respectifs des ribonucléosides modifiés ETE-N7-guanosine (ETE-N7Guo) et ETE-N3-adénosine (ETE-N3Ado) sont d'environ 40 et 60%.

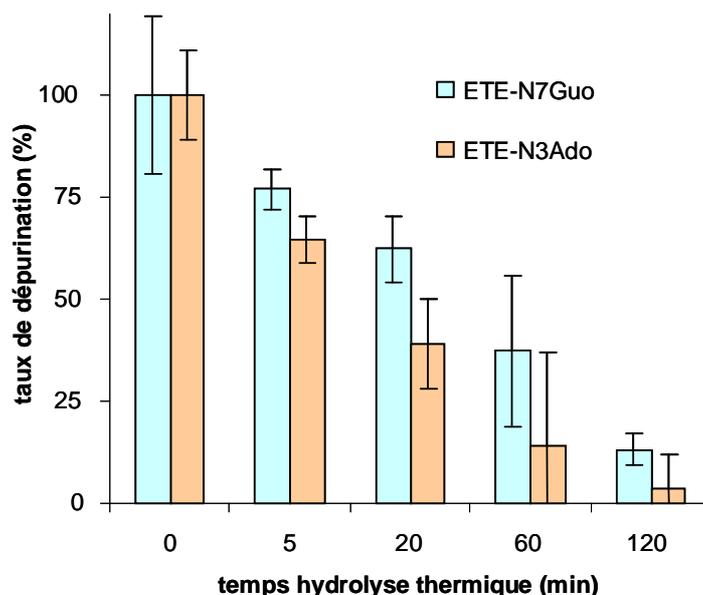


Figure 9 : Cinétique de la stabilité des adduits à l'ARN du CEES

De l'ARN de levure (1 mg/mL) a été traité avec du CEES dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) puis a été digéré enzymatiquement. Une hydrolyse thermique a ensuite été effectuée de 5 à 120 min. Les adduits à l'ARN ont été détectés en HPLC-MS/MS en utilisant la perte d'un fragment du ribose (-132 uma) comme signal : 372 → 240 pour HETE-N7Guo et 356 → 224 pour HETE-N3Ado. Les résultats représentent trois expériences indépendantes et sont exprimés en pourcentage du contrôle (digestion enzymatique seule).

Des solutions calibrées de chacun des adduits ont été préparées de la même manière que pour les adduits de l'ypérite, c'est-à-dire en se basant sur les propriétés UV de composés similaires. Les paramètres de détection en spectrométrie de masse ont alors été optimisés.

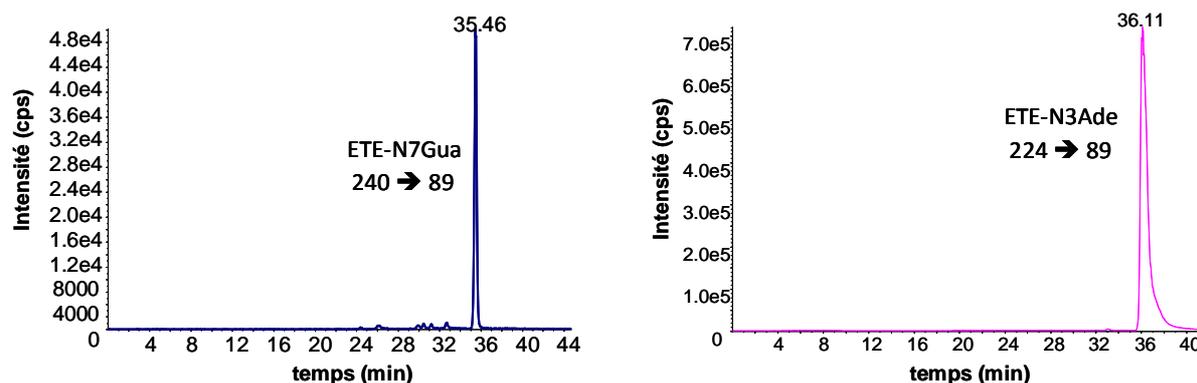


Figure 10 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole de chacun des adduits du CEES

3.8. Validation analytique de la méthode de détection des adduits de l'ypérite et du CEES

Après avoir préparé des solutions calibrées des adduits et avoir optimisé les conditions de leur détection en spectrométrie de masse, nous avons procédé à la validation analytique des méthodes. Pour ce faire, nous avons évalué plusieurs paramètres caractérisant la stabilité du signal de détection en spectrométrie de masse à savoir sa répétabilité, sa reproductibilité, sa linéarité et l'effet matrice sur cette dernière.

3.8.1. Répétabilité et reproductibilité

De d'ADN traité à 20 μ M d'ypérite ou de CEES a été hydrolysé puis séparé en 8 échantillons qui ont tous été analysés le même jour en HPLC-MS/MS. Une excellente répétabilité des mesures a été obtenue, les coefficients de variation (rapport de l'écart-type sur la moyenne) calculés étant tous inférieurs à 10% (Tableau 4).

Six échantillons d'ADN traités à 20 μ M d'ypérite ou de CEES ont été hydrolysés séparément et analysés en HPLC-MS/MS dans le but de mesurer la reproductibilité du signal. Les six échantillons d'ADN, analysés en triplicat, ont été injectés chacun un jour différent et comparés à des courbes de calibration définies chaque jour. Les résultats obtenus indiquent une très bonne reproductibilité puisque à l'instar de la mesure de la répétabilité, les coefficients de variations sont également tous inférieurs à 10% (Tableau 4).

| | adduits | répétabilité (Cv) | reproductibilité (Cv) |
|---------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| ypérite | HETE-N7Gua | 4,0% | 9,3% |
| | HETE-N3Ade | 3,9% | 8,1% |
| | N7Gua-ETE-N7Gua | 4,3% | 5,9% |
| CEES | ETE-N7Gua | 7,3% | 6,5% |
| | ETE-N3Ade | 8,1% | 6,7% |

Tableau 4 : *Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la mesure des adduits de l'ypérite et du CEES*

(Cv : coefficient de variation)

3.8.2. La linéarité

Afin d'évaluer la linéarité de la détection, des solutions de chacun des adduits de l'ypérite et du CEES ont été analysées en HPLC-MS/MS. Les quantités injectées de chaque adduit variaient de 0.1 à 4 pmoles. Une très bonne corrélation entre la quantité injectée et la détection du signal en spectrométrie de masse a été obtenue (Figure 11). En effet, les coefficients de détermination (R^2) déterminés étaient tous supérieurs à 0.98. Pour les adduits majoritaires des deux toxiques, ils étaient mêmes de 0.998 (HETE-N7Gua) et de 0.999 (ETE-N7Gua).

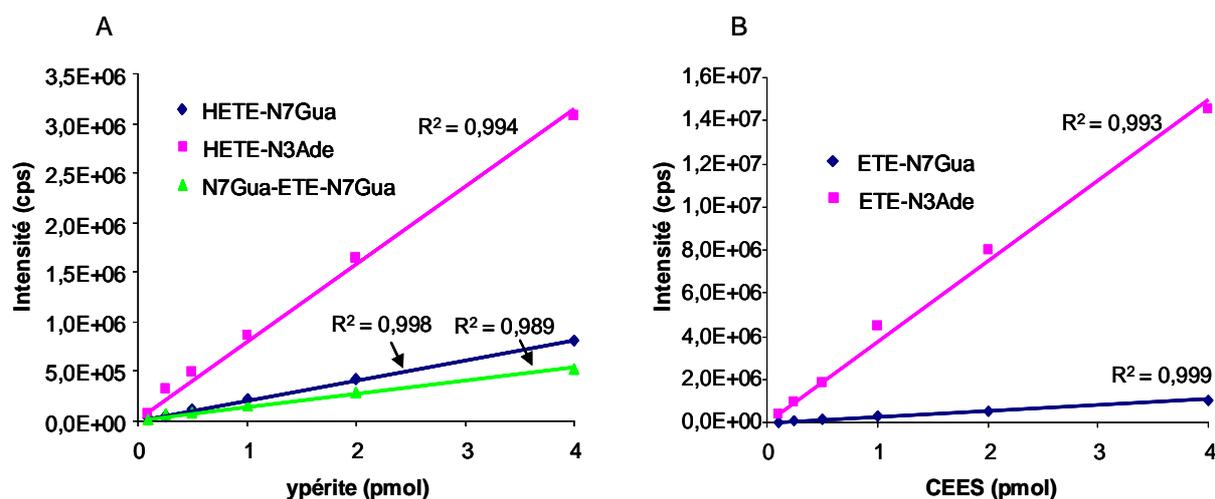


Figure 11 : *Evaluation de la linéarité de la détection des adduits de l'ypérite et du CEES*
ypérite (A), CEES (B)

3.8.3. L'effet matrice

L'effet matrice a, quant à lui, été évalué en injectant des quantités croissantes d'adduits dilués dans de l'ADN (1 mg/mL) hydrolysé. Le signal obtenu en spectrométrie de masse a alors été comparé à celui déterminé pour les mêmes quantités d'adduits dilués dans de l'eau ultrapure. Aucun effet matrice n'a été constaté (Figure 12), ce qui s'explique notamment par la différence importante entre le temps de rétention des adduits et celui des 2'-désoxyribonucléosides normaux.

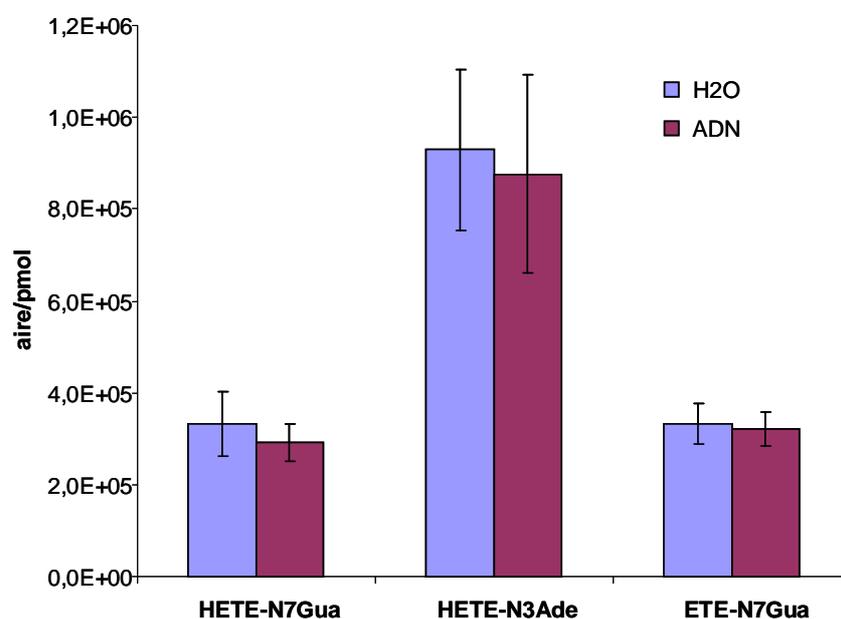


Figure 12 : Evaluation de l'effet matrice sur la mesure des adduits de l'ypérite et du CEES

Les quantités injectées des adduits de l'ypérite (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade) et du CEES (ETE-N7Gua) varient entre 1 et 4 pmoles. Les résultats représentent la moyenne des pentes des courbes de corrélation de chacun des adduits avec les écart-types correspondant à deux séries de mesure.

3.9. Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES *in vitro*

La méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite et du CEES au point, nous avons voulu évaluer la fréquence de ces derniers *in vitro*. Nous avons dans un premier temps traité de l'ADN isolé avec des concentrations croissantes d'ypérite. Dans un second temps, dans l'optique d'évaluer l'effet de l'étape d'extraction d'ADN, nous avons exposé des cellules humaines THP1 (lignée cancéreuse de monocytes) aux mêmes concentrations que l'ADN isolé. Le choix de ces cellules a été uniquement pratique. En effet, la culture et le

traitement à l'ypérite étant réalisés dans deux sites différents, ces cellules présentaient l'avantage de ne pas être adhérentes et donc de croître en suspension.

3.9.1. Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans de l'ADN isolé

Dans le but d'évaluer la distribution dans l'ADN isolé des adduits de l'ypérite et du CEES, de l'ADN de thymus de veau a été traité dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) à des concentrations croissantes de chacun des toxiques (10, 20, 50 et 100 μ M) puis hydrolysé (digestion enzymatique suivie d'une hydrolyse thermique de 20 min à 90°C) avant d'être analysé en HPLC-MS/MS. La quantification a été effectuée avec une calibration externe. Pour cela les solutions étalons des adduits ont été injectées à des concentrations différentes à plusieurs reprises. Les nucléosides normaux ont été quantifiés de la même façon mais en UV à 280 nm. Les résultats obtenus sont ainsi exprimés en nombre d'adduits pour un million de nucléosides normaux. Comme cela a été montré précédemment (Brookes and Lawley, 1963; Fidler *et al.*, 1994; Ludlum *et al.*, 1994), la quantification des adduits de l'ypérite avec notre méthode confirme la prépondérance de l'adduit en N7 de guanine (Figure 13A). Celui-ci représente en moyenne 81% du total des adduits. HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua constituent respectivement 6 et 13% de ce total. Après un traitement à 100 μ M d'ypérite, 3021 ± 888 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides, 182 ± 62 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides et 397 ± 76 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides ont été détectés, ce qui correspond à un total de 3600 adduits pour un million de nucléosides soit un adduit formé par l'ypérite pour 280 nucléotides environ. L'évolution du taux de HETE-N7Gua est linéaire. En revanche, celles de HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua ne le sont pas. En effet, une saturation de leurs taux est observée aux fortes concentrations (facteurs respectifs de 4.5 et 5.6 pour des traitements de 10 et 100 μ M d'ypérite). Ce résultat explique pourquoi la proportion de HETE-N7Gua augmente avec la concentration au dépend de celles des autres adduits. En ce qui concerne les adduits du CEES, les résultats obtenus indiquent que la position N7 de guanine est encore plus ciblée qu'avec l'ypérite (Figure 13B). En effet, ETE-N7Gua compte pour 98% des adduits formés par le CEES et ETE-N3Ade pour les 2% restant. Après un traitement à 100 μ M de CEES, 861 ± 159 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides et 22 ± 1 ETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides ont été détectés, soit un total de 883 adduits pour un million de nucléosides ce qui représente un adduit formé par le CEES pour 1150 nucléotides environ. Lorsque les fréquences des monoadduits formés par l'ypérite et le CEES sont comparées deux à deux, on constate que le gaz moutarde est plus

réactif que son analogue. En position N7 de guanine, 3.6 fois plus d'adduits ont été formés par le gaz moutarde et pour les adduits en position N3 d'adénine le ratio est de 9.4.

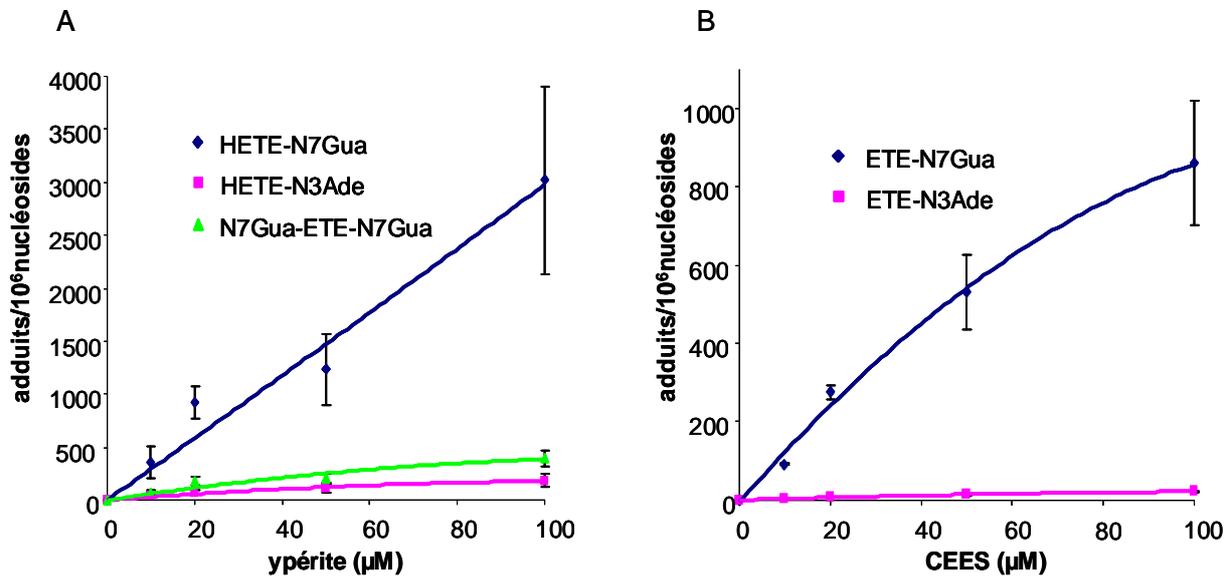


Figure 13 : Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans de l'ADN isolé

De l'ADN de thymus de veau (1 mg/mL) dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) à été traité à 10, 20, 50 ou 100 µM d'ypérite (A) ou de CEES (B) pendant 4 h. Il a ensuite été précipité par ajout d'éthanol absolu et de NaCl. Plusieurs lavages à l'éthanol 70% (v/v) ont été effectués dans le but d'éliminer d'éventuelles traces d'ypérite et les adduits formés ont été quantifiés en HPLC-MS/MS. Les transitions suivies correspondent à la partie réactive de l'ypérite ($m/z = 105$) et du CEES ($m/z = 89$). Pour N7Gua-ETE-N7Gua, la transition suivie est $389 \rightarrow 210$. Les résultats ont été normalisés par rapport à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

3.9.2. Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans l'ADN de monocytes humains THP1

Après avoir quantifié les adduits dans de l'ADN isolé, nous avons cherché à les doser dans de l'ADN cellulaire. Pour cela, les monocytes THP1 ont été traités pendant 30 min dans du tampon phosphate salin (PBS) à température ambiante. L'étape d'extraction d'ADN constitue la principale différence entre les deux types de dosage effectués. Au laboratoire, un protocole optimisé permet d'extraire l'ADN en plusieurs étapes (Ravanat *et al.*, 2002). Tout d'abord, les membranes plasmiques sont lysées, puis les noyaux sont isolés et leurs membranes lysées à leur tour. Une étape d'élimination des ARN est alors réalisée par ajout de RNases pendant 15 min à 50°C. Enfin, les protéines sont également éliminées par ajout de

protéase pendant 1 h à 37°C. Sachant que les adduits de l'ypérite et du CEES sont instables et bien que cette instabilité soit moindre dans l'ADN double brin par rapport aux nucléosides isolés (Gates *et al.*, 2004), nous avons tout de même diminué la température de l'étape d'élimination des ARN de 50 à 37°C. Cette diminution de température a été effectuée dans le but de prévenir la dépurination des adduits pendant l'extraction. Lors de l'analyse des échantillons d'ADN cellulaire, la contamination par l'ARN observée en UV était inférieure à 1%. La très faible quantité d'ARN retrouvée dans les échantillons conjuguée au fait que les ribonucléosides modifiés correspondant ne se dépurinent pas efficacement dans les conditions d'hydrolyse optimisées constituent le gage d'une quantification précise des adduits à l'ADN. Dès la concentration minimale de traitement, *i.e* 10 µM, un signal largement au-dessus du bruit de fond a été obtenu pour chacun des adduits analysés (Figure 14).

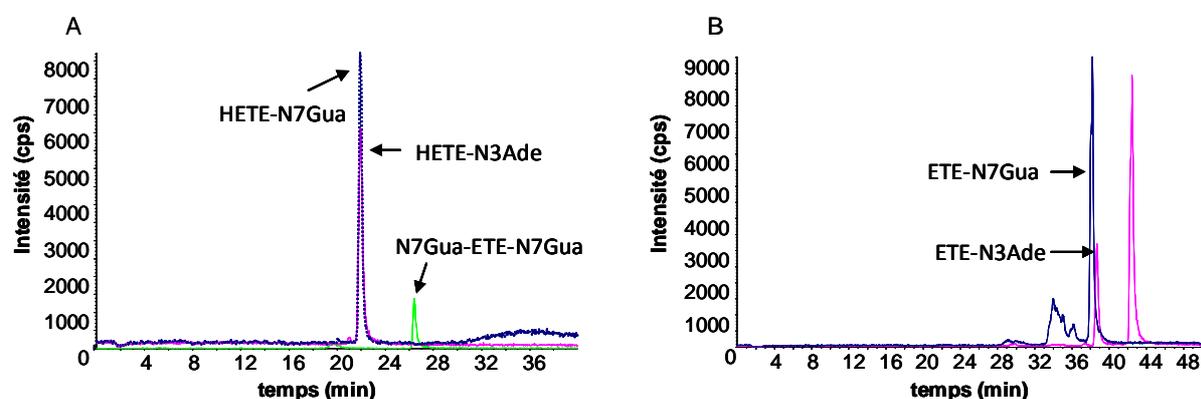


Figure 14 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'ADN extrait de monocytes THP1 exposés à 10 µM d'ypérite ou de CEES
ypérite (A), CEES (B)

Comme pour l'ADN isolé, les adduits majoritaires formés par l'ypérite et le CEES concernent la position N7 de guanine. Pour le gaz moutarde (Figure 15A), des proportions similaires de chacun des adduits ont été retrouvées, soit 81% de HETE-N7Gua, 7% de HETE-N3Ade et 12% de N7Gua-ETE-N7Gua. En revanche, pour le CEES (Figure 15B), la proportion de ETE-N3Ade est plus importante dans les cellules (11%) que dans l'ADN isolé (2%). Quel que soit le toxique considéré, la fréquence des adduits dans l'ADN isolé est plus importante à concentration égale que dans les cellules, ce qui montre que dans ces dernières une partie de l'ypérite et du CEES interagit avec d'autres composants cellulaires avant d'atteindre le noyau. En effet, le gaz moutarde forme environ dix fois plus d'adduits au total dans l'ADN isolé que

dans les cellules, ce ratio étant de 14 pour le CEES. De plus, l'ypérite est encore plus réactive que le CEES dans les cellules où elle forme dix fois plus d'adduits que ce dernier.

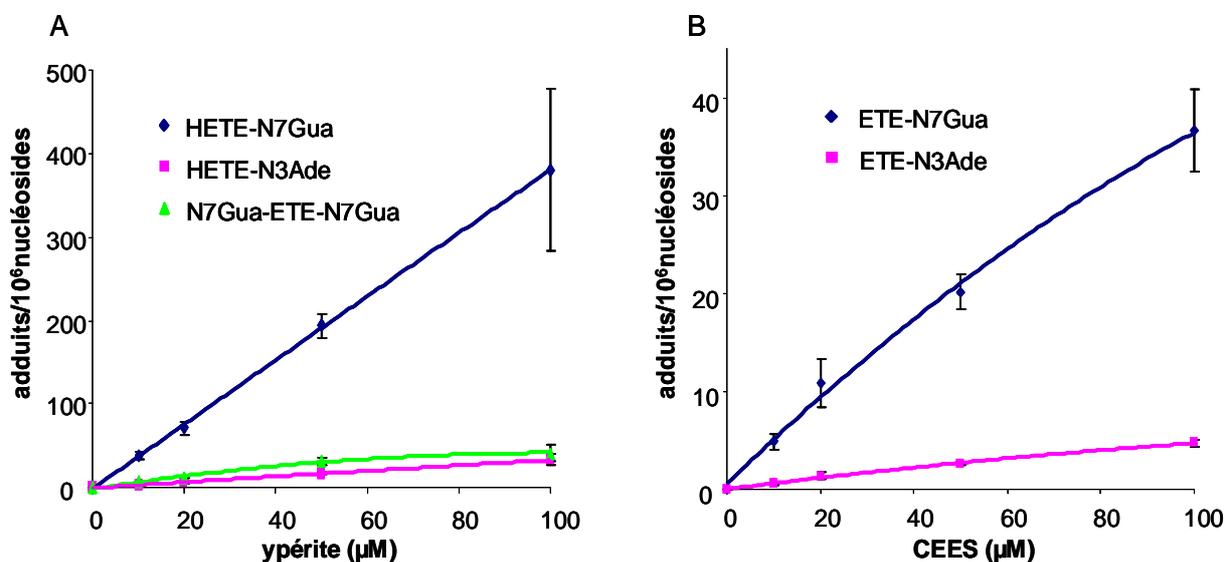


Figure 15 : Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans les monocytes THP1

Des monocytes THP1 (20×10^6 cellules) ont été traités à 10, 20, 50 ou 100 μM d'ypérite (A) ou de CEES (B) dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. Plusieurs lavages au PBS ont été effectués pour éliminer d'éventuelles traces d'ypérite. L'ADN a ensuite été extrait et hydrolysé avant d'être analysé en HPLC-MS/MS. Les transitions suivies correspondent à la partie réactive de l'ypérite ($m/z = 105$) et du CEES ($m/z = 89$). Pour N7Gua-ETE-N7Gua, la transition suivie est $389 \rightarrow 210$. Les résultats ont été normalisés par rapport à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

4. Conclusion

Afin d'étudier la génotoxicité de l'ypérite, nous avons développé une méthode de détection quantitative des adduits qu'elle génère par HPLC-MS/MS. Après la synthèse et la caractérisation des adduits par cette technique (temps de rétention et fragmentations), un large pan de la mise au point a concerné l'aspect quantitatif de la mesure en relation avec l'instabilité des adduits. La stratégie adoptée a été tout d'abord de vérifier si la dépurination de l'adduit majoritaire du gaz moutarde était effective dans les conditions de la digestion optimisée au laboratoire. Une fois que celle-ci a été confirmée, des essais d'hydrolyse en diminuant le temps ou en changeant la nature des nucléases ont été conduits mais aucun n'a permis de diminuer la dépurination. Le fait d'abaisser la température de l'une des étapes a, en revanche, eu pour conséquence une baisse de cette dépurination. Toutefois, l'hydrolyse à

Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS

basse température ne l'a pas complètement prévenue puisque la base modifiée correspondante était toujours détectable. Par conséquent, dans ces conditions, la quantification des adduits sous forme de 2'-désoxyribonucléosides modifiés était impossible car sous-estimée.

Nous avons donc fait le choix d'une détection des adduits sous forme de bases modifiées. La stratégie suivie a alors été d'optimiser les conditions d'hydrolyse afin d'une part de forcer complètement la dépurination des adduits à l'ADN et d'autre part de limiter celle des adduits à l'ARN. Les conditions finalement retenues sont une hydrolyse enzymatique suivie par une hydrolyse thermique neutre de 20 min à 90°C. Une fois la méthode au point, nous l'avons étendue aux adduits formés par le CEES, analogue du gaz moutarde très utilisé dans la littérature.

La méthode a ensuite été validée analytiquement en mesurant la linéarité, la répétabilité et la reproductibilité du signal qui se sont avérées très bonnes. De plus aucun effet matrice n'a été observé sur la détection des adduits.

Enfin, nous avons évalué la distribution des différents adduits après traitement d'ADN isolé et de monocytes THP1 à des concentrations croissantes d'ypérite et de CEES. Les résultats obtenus ont confirmé la prédominance de l'alkylation en position N7 de guanine par l'ypérite et le CEES. Ils ont également confirmé de manière indirecte que ces toxiques interagissent avec d'autres constituants cellulaires dans la mesure où la fréquence des adduits était supérieure d'un facteur au moins 10 dans l'ADN isolé. En outre, nous avons observé que l'ypérite formait plus de monoadduits que le CEES. Ce résultat pourrait expliquer en partie pourquoi, même en l'absence de formation de biadduits, le CEES est moins toxique que le gaz moutarde.

La mise au point de la première méthode HPLC-MS/MS pour la détection simultanée et la quantification individuelle des trois adduits de l'ypérite ainsi que celles des deux adduits du CEES nous a donc permis d'obtenir une image claire de la génotoxicité de ces composés dans de l'ADN isolé et dans celui de cellules humaines en culture. L'autre aspect novateur de cette mise au point concerne l'optimisation des conditions d'hydrolyse qui pourrait être généralisée à d'autres adduits instables. En outre, plus d'une centaine d'analyses par semaine, de l'extraction d'ADN à l'injection en HPLC-MS/MS, peuvent-être réalisées grâce à cette méthode dont la mise au point a fait l'objet d'une publication.

Chapitre 4: Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

I. Introduction

Disposant d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite qui permet l'analyse de grandes séries d'échantillons avec une détection du signal sensible, spécifique et reproductible, nous l'avons appliquée à l'étude de leur formation et de leur persistance chez l'animal. Le modèle retenu pour cette étude est la souris sans poils SKH-1. Ce modèle a déjà été utilisé lors de travaux impliquant le gaz moutarde ou son analogue (Joseph *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2009). Il présente au niveau de la peau les symptômes caractéristiques d'une exposition à l'ypérite chez l'homme : érythème, œdème, microvésications et ulcérations (Smith *et al.*, 1997). C'est de plus un modèle peu onéreux, facilement manipulable et particulièrement adapté à des expérimentations réalisées avec des molécules très toxiques telle que l'ypérite. A l'IRBA, ce modèle est bien maîtrisé pour l'exposition cutanée à l'ypérite aussi bien liquide que vapeur (Clery-Barraud *et al.*, 2013; Dorandeu *et al.*, 2011; Taysse *et al.*, 2011; Vallet *et al.*, 2012).

Afin d'étudier la formation et la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris SKH-1, nous avons commencé par réaliser une pré-expérimentation avec un petit nombre d'animaux ($n = 10$). Cette dernière nous a permis de paramétrer les conditions d'exposition, avec entre autres les doses de traitement ainsi que les temps de sacrifice des souris, et de confirmer que nous étions en mesure de quantifier les adduits de l'ypérite dans la peau traitée mais également dans d'autres tissus. Finalement, l'étude réalisée a porté sur 132 souris SKH-1 exposées sur le dos près des hanches à trois doses (2, 6 et 60 mg/kg) d'ypérite diluée dans du dichlorométhane. Ces trois doses correspondent respectivement à une brûlure du premier, du deuxième et du troisième degré. De plus, la dose 2 mg/kg correspond à environ $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, dose à laquelle des phlyctènes sont formées sur la peau humaine (Ghanei *et al.*, 2010; Momeni *et al.*, 1992; Naraghi *et al.*, 2005). Dans le but d'approcher des conditions d'expositions réelles, le traitement a été effectué par un dépôt d'une gouttelette de $2 \mu\text{L}$. L'exposition s'est déroulée pendant 4 heures à l'issue desquelles la peau exposée a été décontaminée à l'aide d'hypochlorite de sodium diluée. Un suivi du processus lésionnel au niveau cutané a été réalisé pendant 21 jours par la mesure de la perte insensible en eau, méthode non invasive qui reflète la fonction barrière de la peau. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps post-exposition : 6 h, un jour après exposition (J1), J3, J7, J14 et J21. A l'issue de ces différents temps, les mêmes tissus que lors de la pré-expérimentation ont été prélevés : peau exposée, poumons, cerveau, reins et foie. Nous avons en outre récupéré deux

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

échantillons de peau supplémentaires, l'un adjacent à la peau exposée et l'autre à 2 cm de celle-ci, ainsi que la rate. Les différents échantillons de peau ont été prélevés dans le but de mettre en évidence une éventuelle diffusion radiale du gaz moutarde via la détection des adduits qu'il forme. Tous ces prélèvements ont été broyés pour en extraire l'ADN, l'hydrolyser et l'analyser en HPLC-MS/MS. Sur les 132 souris exposées, 4 sont mortes pendant l'expérimentation et ce indépendamment de la dose d'exposition. Les groupes témoins (aucune exposition ou exposition au dichlorométhane) étaient constitués de 4 souris et les groupes exposés, classés par dose d'exposition et temps de sacrifice, de 5 ou 6 animaux. Dans le but de comparer les voies d'exposition en termes de formation de dommages, une douzaine de souris ont également été exposées à des vapeurs saturantes d'ypérite pendant 8 (n = 6) ou 16 min (n = 6). Les souris témoins précédemment mentionnées ont servi pour les deux types d'exposition.

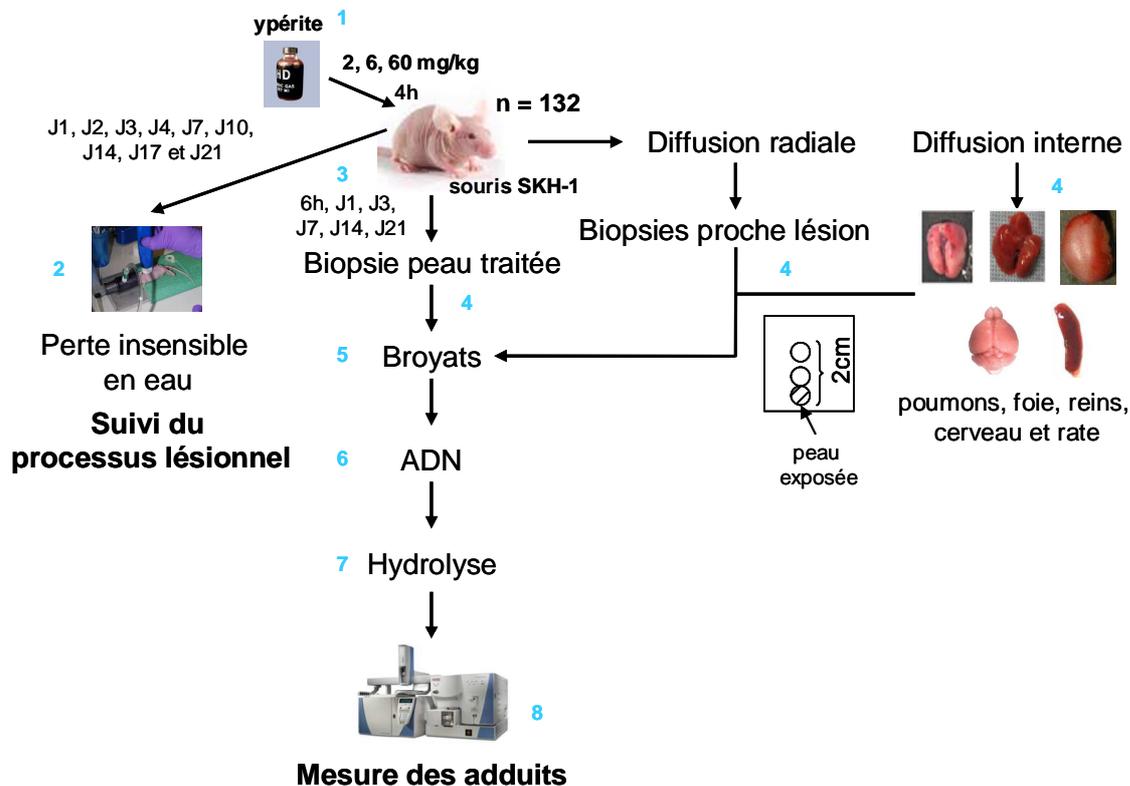


Schéma 47 : Mode opératoire de l'étude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris SKH-1 après une exposition cutanée liquide

1 : exposition des souris à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h ; 2 : suivi du processus lésionnel par la mesure de la perte insensible en eau à différents temps post-exposition ; 3 : sacrifice des animaux à différents temps post-exposition ; 4 : prélèvement échantillons de peau (exposée, adjacente et éloignée) et organes internes (poumons, cerveau, reins, rate et foie) ; 5 : broyage des organes ; 6 : extraction d'ADN ; 7 : hydrolyse d'ADN (digestion enzymatique suivie d'une hydrolyse thermique neutre) ; 8 : quantification des adduits par HPLC-MS/MS.

II. Formation et persistance des adduits de l'ypérite dans la peau

1. Peau exposée

1.1. Suivi du processus lésionnel

Le suivi du processus lésionnel a été réalisé sur trois semaines en évaluant la sévérité de la brûlure au niveau macroscopique et en mesurant la perte insensible en eau. Dès J1, au niveau macroscopique, œdème et érythème, sont observés pour chacune des doses étudiées (Photo 6). Un début de nécrose est décelable pour la dose 6 mg/kg. De plus, le diamètre de la zone lésée est dose-dépendant. A J3 post-exposition, pour les doses 2 et 6 mg/kg, la zone lésée est totalement nécrosée. Pour la plus forte dose d'exposition, l'œdème est encore visible en plus de la nécrose à J3 et à J7, toute la zone touchée est nécrosée. La gravité de la brûlure occasionnée par une exposition liquide à l'ypérite semble donc maximale pour les trois doses testées entre J3 et J7 post-exposition. Pour ce dernier temps, un début de cicatrisation est visible pour la dose 2 mg/kg. La cicatrisation est bien avancée pour les doses 2 et 6 mg/kg à J14 post-exposition. A J21, la zone lésée est presque entièrement fermée pour ces deux dernières. Pour la dose 60 mg/kg, le processus de cicatrisation ne devient apparent qu'à J14 post-exposition et à J21, l'escarre commence à desquamer.

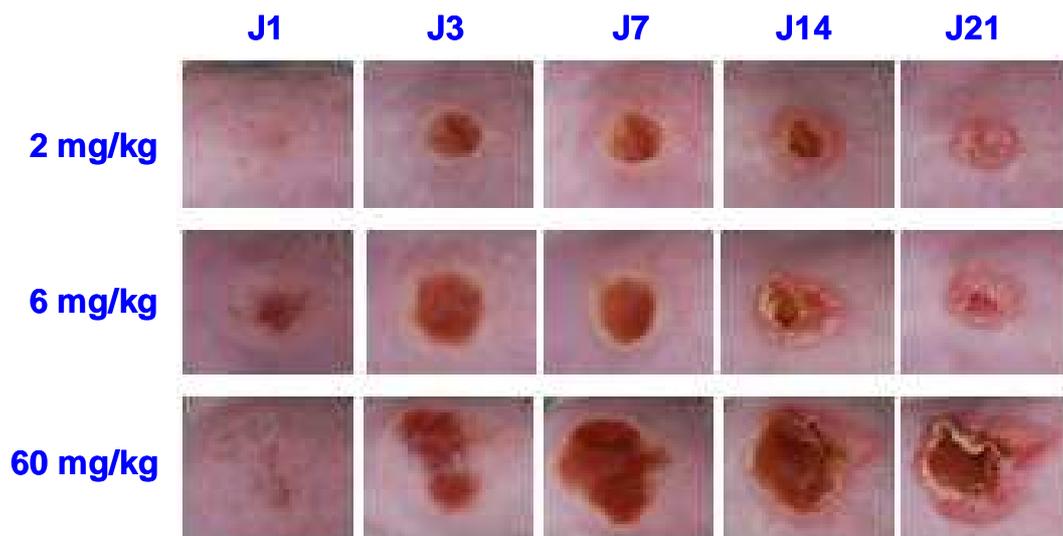


Photo 6 : Peaux des souris SKH-1 exposées à l'ypérite

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Les photos ont été prises à J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition.

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

La perte insensible en eau a été mesurée à l'aide d'un évaporimètre avant traitement (valeur basale) et à différents temps après exposition (Figure 16). Chez les souris témoins, elle est de $10.8 \pm 1.3 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et reste constante tout au long des trois semaines de mesure. Les résultats obtenus indiquent une augmentation significative de la perte insensible en eau quelle que soit la dose considérée dès J1 post-exposition. Elle est de 47.3 ± 6.5 , 98.0 ± 6.2 et $71.3 \pm 12.5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour les doses 2, 6 et 60 mg/kg, respectivement. Elle est donc légèrement supérieure pour la dose 6 mg/kg par rapport aux autres doses de traitement, ce qui pourrait être dû au fait qu'au même temps, *i.e* J1, un début de nécrose soit observable spécifiquement pour cette dose d'exposition.

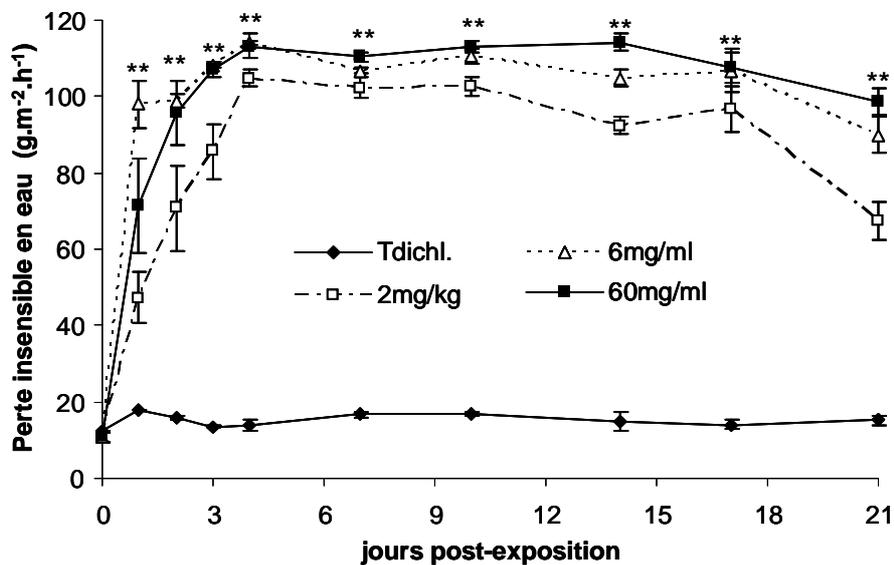


Figure 16 : Mesure de la perte insensible en eau au cours du temps après une exposition cutanée liquide

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Les souris témoins ont été traitées avec le dichlorométhane (véhicule). La perte insensible en eau a été mesurée en utilisant l'évaporimètre Aquaflux®AF200 avant le traitement et J1, J2, J3, J4, J7, J14, J17 et J21 post-exposition. Les résultats représentent la mesure de la perte insensible en eau et sont exprimés en moyenne (contrôle : $n = 4$; traitées : $n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité (traités vs. témoins) : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

La perte insensible en eau continue d'augmenter pour chacune des doses étudiées. Elle est corrélée avec les observations macroscopiques, puisqu'elle est maximale à J4 post-exposition. Les mesures obtenues pour les doses 6 et 60 mg/kg sont identiques et légèrement supérieures à celles évaluées pour la dose 2 mg/kg. Par rapport aux souris témoins, elles sont respectivement 8.2 et 7.6 fois supérieures. Pour la plus faible dose d'exposition, une diminution significative de la perte insensible en eau est obtenue entre J14 et J21, ce qui n'est

pas le cas pour les doses 6 et 60 mg/kg. Même après trois semaines post-exposition et une cicatrisation bien avancée pour les doses d'exposition les plus faibles, la perte insensible en eau mesurée dans les peaux traitées reste significativement supérieure à celle mesurée dans la peau des souris témoins.

1.2. Formation des adduits

La formation des adduits du gaz moutarde a été quantifiée 6 h après traitement. En plus du traitement liquide, nous avons testé un deuxième type d'exposition cutanée, à savoir le traitement à des vapeurs saturantes d'ypérite pure pendant 8 ou 16 min. La zone de peau traitée et la décontamination (4 h post-exposition à l'aide d'hypochlorite de sodium diluée) sont identiques.

1.2.1. Exposition liquide

Six heures après traitement à une exposition liquide, les trois adduits formés par l'ypérite (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua) ont été détectés dès la plus faible dose d'exposition, *i.e* 2 mg/kg (Figure 17).

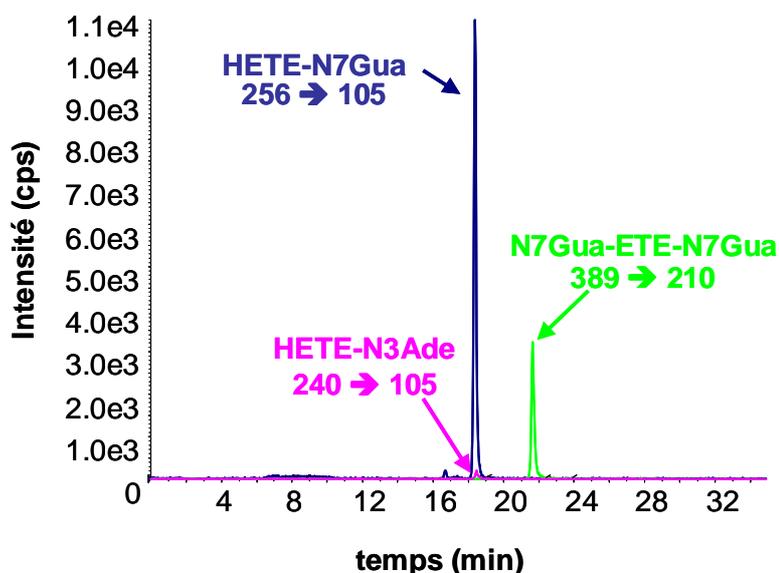


Figure 17 : Chromatogramme obtenu après l'analyse HPLC-MS/MS d'ADN extrait de peau de souris exposée à 2 mg/kg d'ypérite

Pour cette dernière, 77 ± 10 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides, 0.4 ± 0.1 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides et 13.8 ± 1.3 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides ont été formés (Figure 18).

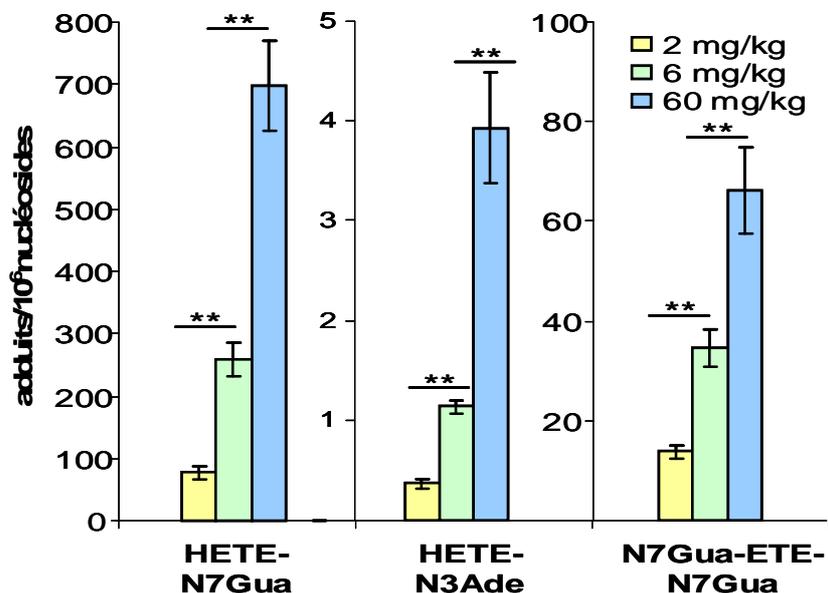


Figure 18 : Formation des adduits de l'ypérite dans la peau traitée après une exposition cutanée liquide

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées et la peau exposée biopsiée. L'ADN a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

La fréquence de chacun des adduits est dose-dépendante. Par exemple, celle de l'adduit majoritaire du gaz moutarde, HETE-N7Gua, augmente de 77 ± 10 à 259 ± 28 et $697 \pm 73/10^6$ nucléosides pour les doses 2, 6 et 60 mg/kg, respectivement. Entre les doses 2 et 6 mg/kg, le nombre des trois adduits augmente linéairement avec la dose. En revanche, entre 6 et 60 mg/kg, une saturation a été observée. En effet, l'accroissement du taux d'adduits, qui aurait été de 10 s'il n'y avait pas de saturation, est seulement d'un facteur 3. L'adduit HETE-N7Gua est majoritaire avec une proportion de près de 90% alors que cette valeur n'était que de 80% dans l'ADN isolé et dans celui des monocytes THP1. Celle de N7Gua-ETE-N7Gua est de 10%. La proportion de HETE-N3Ade est moins d'un pourcent de l'ensemble des adduits dans la peau des souris SKH-1 contre 6 à 7% *in vitro*.

1.2.2. Exposition vapeur

Comme après l'exposition liquide, les trois adduits formés par le gaz moutarde ont été quantifiés suite à un traitement à des vapeurs saturantes d'ypérite pendant 8 ou 16 min (Figure 19). Six heures post-traitement, les taux de HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua formés après 8 min d'exposition vapeur sont respectivement de 24 ± 4 , $0,07 \pm 0,03$ et $9 \pm 2/10^6$ nucléosides. Une dose-dépendance de la fréquence des adduits a également été obtenue, celle du biadduit, par exemple, passant de 9 ± 2 à $27 \pm 3/10^6$ nucléosides.

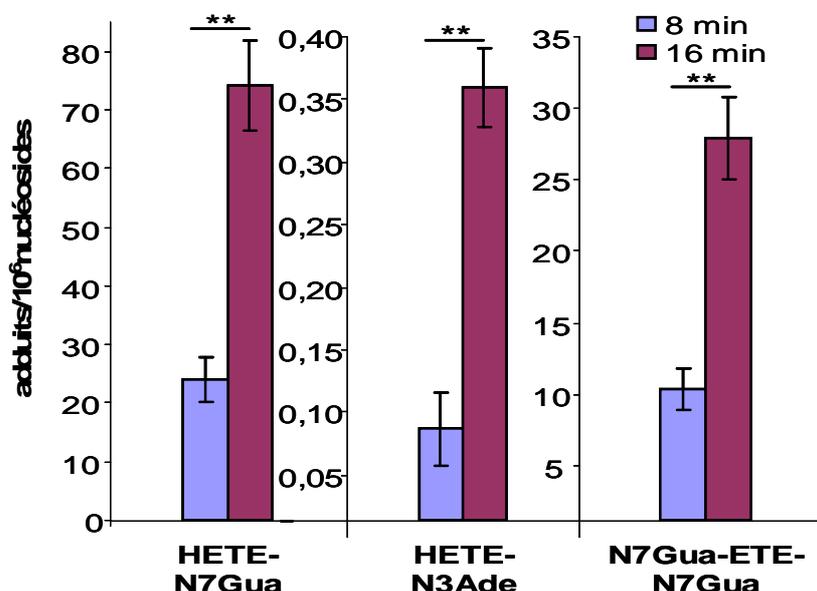


Figure 19 : Formation des adduits de l'ypérite dans la peau traitée après une exposition cutanée vapeur

Les souris SKH-1 ont été exposées à des vapeurs saturantes d'ypérite sur le dos pendant 8 ou 16 min. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées et la peau exposée biopsiée. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 6$) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

De manière intéressante, la quantité de ce dernier est le double de celle obtenue après une exposition liquide à 2m/kg. De plus, les niveaux de HETE-N7Gua et de HETE-N3Ade sont sensiblement identiques lorsque les expositions vapeur 16 min et liquide 2 mg/kg sont comparées. Le taux de HETE-N7Gua est augmenté d'un facteur 3 lorsque le temps d'exposition vapeur est doublé. Ce facteur est de 5 pour HETE-N3Ade. Ces résultats contrastent avec la saturation observée pour l'exposition liquide à la plus forte dose de

traitement. La proportion de HETE-N3Ade reste inférieure à 1% du total des adduits après un traitement à des vapeurs saturantes d'ypérite. En revanche, celle de HETE-N7Gua passe sous les 75% au profit de celle N7Gua-ETE-N7Gua qui s'établit à hauteur de 27%, soit plus du double de sa proportion après une exposition liquide.

1.3. Induction de l'apoptose par l'ypérite

Afin d'établir un lien entre formation des adduits et cytotoxicité, nous avons quantifié le nombre de cellules apoptotiques dans l'épiderme de souris SKH-1 24 h post-exposition à 6 et 60 mg/kg d'ypérite (marquage et quantification effectués à l'IRBA). Pour cela, nous avons réalisé un marquage de l'ADN fragmenté avec la méthode TUNEL (pour « terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling ») (Figure 20).

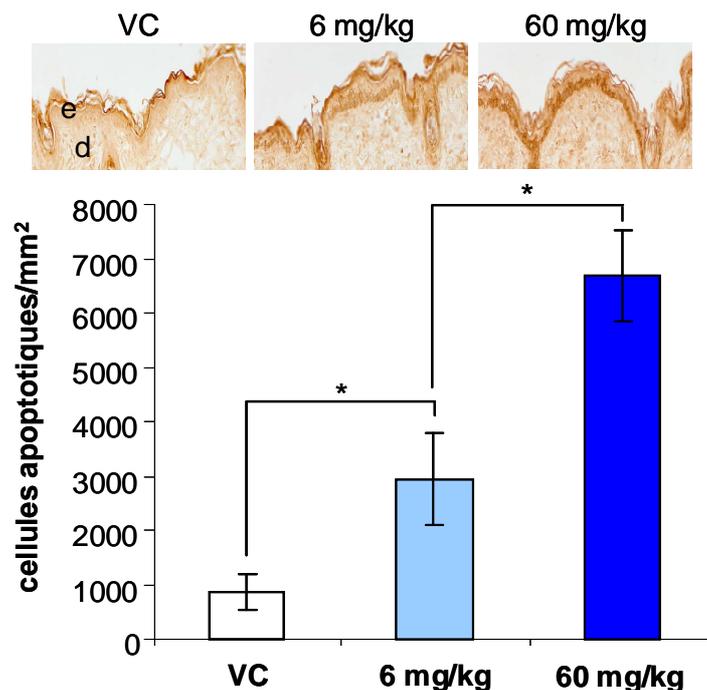


Figure 20 : Induction de l'apoptose par l'ypérite 24 h post-exposition

Les souris SKH-1 ont été exposées à 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Elles ont été sacrifiées 24 h post-exposition. La peau traitée a été biopsiée, fixée et incluse dans de la paraffine. Les cellules apoptotiques ont été quantifiées en utilisant le test TUNEL dans des sections de peau de 7 μ M (e : épiderme ; d : derme). Les résultats représentent le nombre de cellules apoptotiques quantifiées au microscope (grossissement x 200) dans au moins 5 champs par condition et sont exprimés en moyenne (n = 5 ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

Dans l'épiderme des souris témoins, le marquage est essentiellement retrouvé dans la couche cornée. Par opposition, les épidermes des peaux traitées renferment des cellules apoptotiques qui sont en grande majorité situées au niveau de la membrane basale. De plus, le nombre de cellules apoptotiques déterminé dans ces derniers est bien plus important. En effet, il est 7.7 fois plus important après une exposition à 60 mg/kg (6678 cellules apoptotiques/mm² contre 872 dans les épidermes témoins). En outre, une dose réponse de l'induction de l'apoptose a été obtenue puisque pour les souris exposées à 6 mg/kg d'ypérite, 2930 cellules apoptotiques/mm² ont été quantifiées.

Une corrélation a ensuite été recherchée entre le nombre de cellules apoptotiques quantifiées à 24 h post-exposition et la fréquence des adduits déterminée 6 h post-traitement à 6 et 60 mg/kg d'ypérite. Le coefficient de corrélation obtenue est de 0.496. Un test de Student, après calcul du t à partir du coefficient de corrélation r de Pearson, a été effectué et a révélé que cette corrélation était significative (Figure 21) (p<0.05).

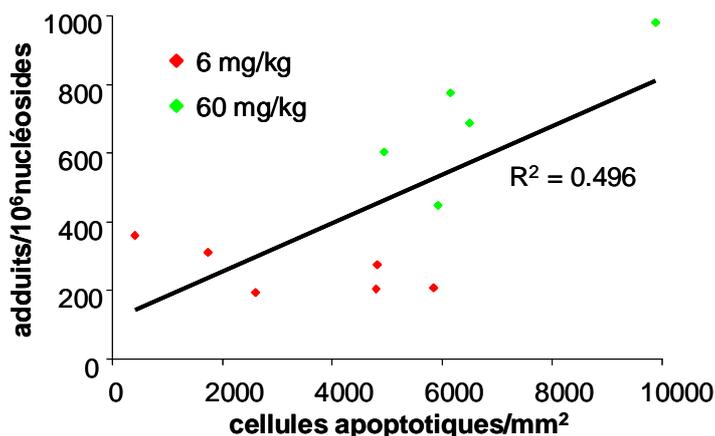


Figure 21 : Etude de la corrélation entre la fréquence des adduits déterminée 6 h post-traitement et le nombre de cellules apoptotiques quantifiées 24 h post-exposition à 6 et 60 mg/kg

1.4. Persistance des adduits

La persistance des adduits de l'ypérite a été étudiée de 6 h à J21 après exposition liquide à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite (Figure 22 pour la dose 6 mg/kg, Tableau 5 pour les doses 2 et 6 mg/kg). Quelle que soit la dose considérée, le taux d'adduits décroît continuellement après l'exposition. Cette diminution est globalement significative entre chaque temps étudié à partir de 6 h post-exposition. Par exemple, le taux de l'adduit majoritaire de l'ypérite passe de

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

36.9±4.3 à 4.3±1.1/10⁶ nucléosides de J1 à J7 après une exposition à 2 mg/kg d'ypérite. Le moins fréquent des adduits du gaz moutarde, HETE-N3Ade, a été détecté jusque J3, J7 et J21 pour les doses 2, 6 et 60 mg/kg respectivement. Le taux de HETE-N3Ade correspondant est identique pour les trois doses étudiées, à savoir 0.04±0.02/10⁶ nucléosides, qui reflète vraisemblablement la limite de quantification de cet adduit. HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua ont, quant à eux, été quantifiés jusque J21 pour chacune des doses testées. Après trois semaines d'exposition à 2 mg/kg d'ypérite, 0.7±0.1 HETE-N7Gua/10⁶ nucléosides et 0.2±0.04 N7Gua-ETE-N7Gua/10⁶ nucléosides étaient toujours détectables.

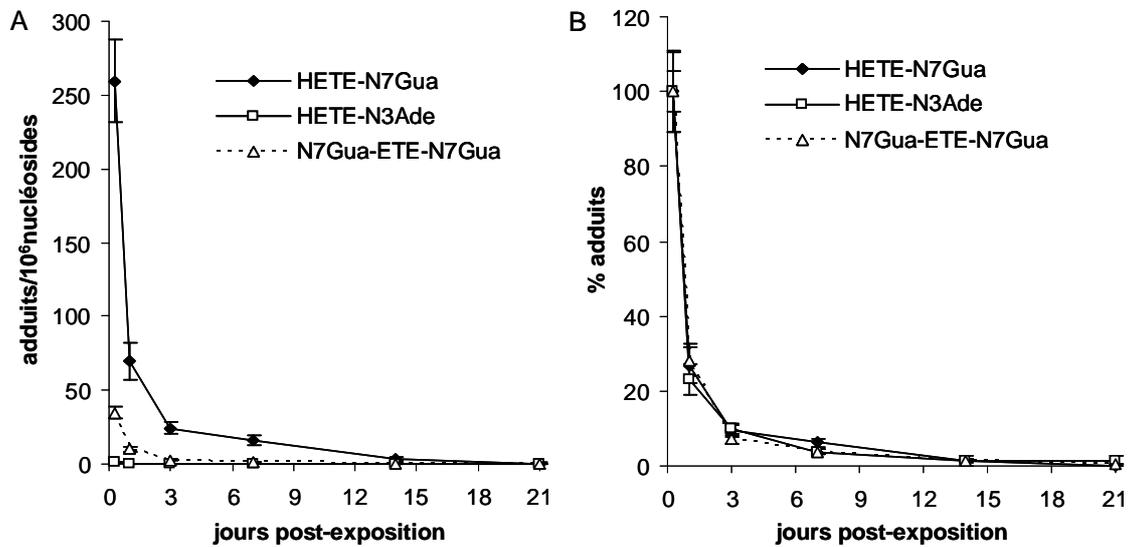


Figure 22 : *Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans la peau exposée*

Les souris SKH-1 ont été exposées à 6 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, elles ont été sacrifiées, la peau exposée biopsiée et l'ADN extrait. Il a été ensuite hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux (A) ou en pourcentage (B) et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) ± l'erreur standard.

Afin de déterminer les constantes d'élimination des adduits, nous avons considéré que leur cinétique de disparition était d'ordre 1. Pour la dose de traitement 2 mg/kg, la constante d'élimination du biadduit est la plus faible, le temps de demi-vie correspondant étant de 5.1±0.7 jours (Tableau 6). Celui-ci diminue à 3.4±0.3 jours lorsque la dose augmente à 6 mg/kg. Le temps de demi-vie de HETE-N7Gua augmente avec la dose entre 6 et 60 mg/kg, il passe de 3.0±0.2 à 4.1±0.4 jours. Pour HETE-N3Ade, une relation de dose-dépendance est clairement établie. En effet, sa demi-vie augmente de 0.8 à 2.3 puis à 4 jours pour une concentration de traitement de 2, 6 et 60 mg/kg, respectivement.

| temps (jours) | 2 mg/kg | | |
|---------------|------------|-------------|-----------------|
| | HETE-N7Gua | HETE-N3Ade | N7Gua-ETE-N7Gua |
| 0,25 | 77 ± 10 | 0,4 ± 0,1 | 13,8 ± 1,3 |
| 1 | 37 ± 4 | 0,2 ± 0,02 | 6,3 ± 0,5 |
| 3 | 12,5 ± 4,0 | 0,04 ± 0,01 | 1,6 ± 0,5 |
| 7 | 4,3 ± 1,1 | nd | 0,5 ± 0,1 |
| 14 | 0,6 ± 0,1 | nd | 0,8 ± 0,1 |
| 21 | 0,7 ± 0,1 | nd | 0,2 ± 0,04 |

| temps (jours) | 60 mg/kg | | |
|---------------|------------|-------------|-----------------|
| | HETE-N7Gua | HETE-N3Ade | N7Gua-ETE-N7Gua |
| 0,25 | 697 ± 73 | 3,9 ± 0,6 | 66,3 ± 8,7 |
| 1 | 542 ± 133 | 2,1 ± 0,5 | 46,8 ± 7,6 |
| 3 | 135 ± 14 | 0,4 ± 0,04 | 9,4 ± 0,8 |
| 7 | 88 ± 31 | 0,1 ± 0,03 | 4,4 ± 1,3 |
| 14 | 57 ± 21 | 0,1 ± 0,03 | 2,6 ± 0,9 |
| 21 | 10,0 ± 1,6 | 0,04 ± 0,02 | 0,7 ± 0,2 |

Tableau 5 : *Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans la peau exposée*

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, elles ont été sacrifiées, la peau exposée biopsiée et l'ADN extrait. Il a été ensuite hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) ± l'erreur standard (nd : non détecté).

A la plus forte dose d'exposition pour laquelle les trois adduits ont été détectés jusqu'à J21, les constantes d'élimination sont sensiblement identiques avec des temps de demi-vie correspondant de 4.1 ± 0.4 , 4.0 ± 0.4 et 3.6 ± 0.3 jours pour HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua, respectivement.

| dose (mg/kg) | constantes d'élimination (jour^{-1}) | | |
|--------------|---|-------------------------|-----------------------|
| | HETE-N7Gua | HETE-N3Ade | N7Gua-ETE-N7Gua |
| 2 | 0,20 ± 0,02 (3,5±0,3) | 0,89 ± 0,14 (0,78±0,02) | 0,14 ± 0,02 (5,1±0,7) |
| 6 | 0,23 ± 0,02 (3,0±0,2) | 0,30 ± 0,05 (2,3±0,1) | 0,21 ± 0,02 (3,4±0,3) |
| 60 | 0,17 ± 0,02 (4,1±0,4) | 0,17 ± 0,02 (4,0±0,4) | 0,19 ± 0,02 (3,6±0,3) |

Tableau 6 : *Constantes d'élimination des adduits de l'ypérite dans la peau exposée*

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, elles ont été sacrifiées, la peau exposée biopsiée et l'ADN extrait. Il a été ensuite hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent les constantes d'élimination (en jour^{-1}) des adduits et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) ± l'erreur standard. Les temps de demi-vie correspondant (en jour) sont indiqués entre parenthèses.

2. Peaux non directement exposées

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle diffusion radiale de l'ypérite dans la peau, nous avons prélevé en plus de la zone exposée, deux échantillons de peau supplémentaires, l'un adjacent avec la zone traitée (« peau adjacente ») et l'autre à 2 cm de celle-ci (« peau éloignée ») (Photo 7).



Photo 7 : Les différentes zones de peau biopsiées

2.1. Formation des adduits

Six-heures post-exposition à la plus forte dose (60 mg/kg), les trois adduits formés par le gaz moutarde ont été détectés à la fois dans la peau adjacente (158.7 ± 52.4 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides, 0.7 ± 0.2 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides et 25.4 ± 7.1 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides) (Figure 23) et dans la peau éloignée (11.5 ± 2.9 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides, 0.2 ± 0.01 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides et 2.2 ± 0.5 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides). Comparées à celles obtenues dans la peau exposée, les fréquences de HETE-N7Gua dans les peaux adjacentes et éloignées sont respectivement 4.4 et 60.4 fois plus faibles. Les adduits HETE-N3Ade et de N7Gua-ETE-N7Gua sont aussi détectés dans les peaux adjacente et éloignée, là encore en moindre quantité que dans la zone traitée.

Dans la peau adjacente, les trois adduits de l'ypérite ont également été détectés à la dose d'exposition 6 mg/kg avec 16.7 ± 4.9 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides, 0.1 ± 0.03 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides et 4.2 ± 1.2 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. L'effet dose constaté dans la peau exposée est également retrouvé dans la peau adjacente. En outre, HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua ont été aussi détectés après exposition à la plus faible dose, *i.e* 2

mg/kg. En revanche, dans la peau éloignée, aucun adduit n'a été détecté après une exposition à 2 ou 6 mg/kg.

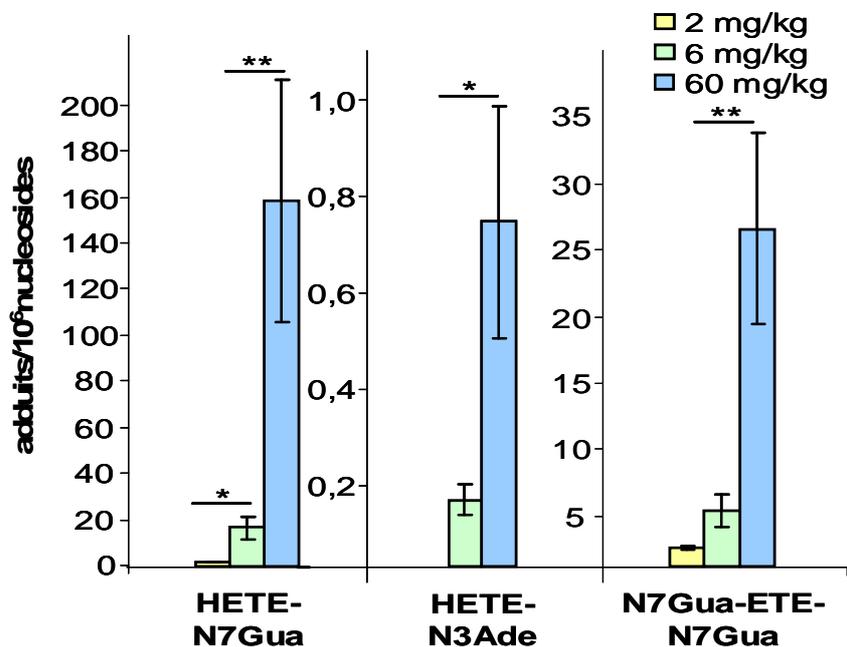


Figure 23 : Formation des adduits de l'ypérite dans la peau adjacente après une exposition cutanée liquide

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées et la peau adjacente biopsiée. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

L'ADN des peaux adjacente et éloignée a également été analysé après exposition à des vapeurs saturantes d'ypérite. Aucun adduit n'a été détecté et ce quelle que soit la durée d'exposition (8 ou 16 min).

2.2. Persistance des adduits

La persistance des adduits dans les peaux adjacente et éloignée a, comme pour la peau exposée, été étudiée après traitement à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite. Dans la peau adjacente (Tableau 7), une diminution continue de la fréquence des adduits est mise en évidence après leur formation.

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

| temps (jours) | dose (mg/kg) | HETE-N7Gua | HETE-N3Ade | N7Gua-ETE-N7Gua |
|---------------|--------------|------------|-------------|-----------------|
| 0,25 | 2 | 1,7 ± 0,3 | nd | 1,4 ± 0,2 |
| | 6 | 16,7 ± 4,9 | 0,14 ± 0,03 | 4,2 ± 1,2 |
| | 60 | 159 ± 52 | 0,7 ± 0,2 | 25,4 ± 7,1 |
| 1 | 2 | 2 ± 0,7 | nd | 0,7 ± 0,1 |
| | 6 | 4,7 ± 1,4 | 0,12 ± 0,07 | 0,9 ± 0,2 |
| | 60 | 73 ± 23 | 0,5 ± 0,3 | 19,6 ± 7,5 |
| 3 | 2 | 0,7 ± 0,2 | nd | 0,2 ± 0,1 |
| | 6 | 2 ± 0,8 | nd | 0,6 ± 0,2 |
| | 60 | 6,5 ± 1,7 | nd | 1 ± 0,3 |
| 7 | 2 | nd | nd | nd |
| | 6 | nd | nd | nd |
| | 60 | 2,5 ± 0,7 | nd | 0,4 ± 0,1 |
| 14 à 21 | 2 | nd | nd | nd |
| | 6 | nd | nd | nd |
| | 60 | nd | nd | nd |

Tableau 7 : *Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans la peau adjacente*

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, elles ont été sacrifiées, la peau adjacente biopsiée et l'ADN extrait. Il a été ensuite hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) ± l'erreur standard (nd : non détecté).

Par exemple, entre 6 h et J3 post-exposition, le taux de HETE-N7Gua diminue de 1.7 ± 0.3 à $0.7 \pm 0.2 / 10^6$ nucléosides. Une élimination complète des adduits a été observée à partir de J7 pour les doses d'exposition 2 et 6 mg/kg. Pour la plus forte dose, HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua sont en revanche encore détectables à J7 (2.5 ± 0.7 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides et 0.4 ± 0.1 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides) mais ne le sont plus à partir de J14. Dans la peau éloignée, les trois adduits détectables à 6 h post-exposition à 60 mg/kg d'ypérite le sont encore à J1 avec une diminution de leur fréquence. Celle du biadduit, par exemple, passe de 2.2 ± 0.5 à 1.1 ± 0.0 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. A partir de J3 plus aucun adduit n'a été décelé.

Les résultats issus de l'étude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite suite à une exposition cutanée à de l'ypérite en solution ont fait l'objet d'un article qui a été soumis.

III. Formation et persistance des adduits dans les organes internes

1. Formation des adduits

La formation des adduits de l'ypérite, suite à une exposition cutanée liquide à 2, 6 et 60 mg/kg, a été évaluée dans 5 cinq organes internes : les poumons, le cerveau, le foie, les reins et la rate. De la même façon que pour les échantillons de peau prélevés après le sacrifice des animaux aux différents temps étudiés, la totalité des organes internes récoltés a été broyée pour en extraire l'ADN exception faite du foie. Pour ce dernier, 1/4 à 1/3 de la masse a été broyée. Les résultats obtenus montrent que la fréquence des adduits mesurée après exposition à 60 mg/kg d'ypérite est bien plus importante que celle déterminée pour les plus faibles doses d'exposition.

1.1. Formation des adduits après traitement à 60 mg/kg

Pour la dose d'exposition la plus importante, la fréquence maximale des adduits a été obtenue, comme pour les différents échantillons de peau, dès 6 h post-traitement pour tous les organes étudiés. Le cerveau est un des organes pour lequel la fréquence des adduits est la plus importante (Figure 25 et Tableau 8). On y dénombre 44.8 ± 6.9 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Bien que la fréquence de HETE-N7Gua mesurée dans les poumons soit inférieure à celle obtenue dans le cerveau ($28.9 \pm 5.9/10^6$ nucléosides), cette différence n'est pas significative. Après le cerveau et les poumons, ce sont les reins qui contiennent le plus de HETE-N7Gua avec $27.8 \pm 3.4/10^6$ nucléosides. Viennent ensuite la rate et le foie avec respectivement 15.1 ± 2.5 et 2.4 ± 0.5 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Le taux de HETE-N3Ade est le plus élevé dans le cerveau, les poumons et la rate. Celui du biadduit est également le plus important dans le cerveau et dans la rate. Les quantités mesurées sont respectivement de 3.0 ± 0.4 et 3.3 ± 0.5 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. La proportion de ce dernier est en outre la plus importante dans la rate où il représente en moyenne légèrement plus de 20% du total des adduits. Elle est la plus faible dans les reins avec environ 3% de la somme des adduits. La proportion de l'adduit majoritaire est la plus élevée dans les reins où elle atteint 95% de l'ensemble des adduits et la moins forte dans la rate avec une valeur de 75%. Mis à part les reins où elle est la moins élevée, la proportion de HETE-N3Ade est supérieure à 2% dans tous les organes. Elle est la plus importante dans le foie avec plus de 5% du total des adduits.

1.2. Formation des adduits après une exposition à 2 et 6 mg/kg

Pour la plus faible dose d'exposition et 6 h post-traitement, HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua ont été détectés dans tous les organes étudiés excepté le foie (Figure 24 pour ADN de cerveau). HETE-N3Ade a également été détecté après traitement à 2 mg/kg dans le cerveau, les poumons et les reins. Pour cette dose d'exposition et ce temps post-traitement, le taux de monoadduits le plus important a été déterminé dans le cerveau avec 0.6 ± 0.05 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides et 0.017 ± 0.002 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides (Figure 25 et Tableau 8). Après le cerveau, l'adduit majoritaire formé par le gaz moutarde est le plus fréquemment retrouvé dans les poumons et la rate puis les reins. Toutefois, contrairement aux résultats obtenus après traitement à 60 mg/kg, la fréquence de HETE-N7Gua n'est pas maximale à 6 h post-exposition dans tous les organes. En effet, dans le cerveau la fréquence de l'adduit majoritaire de l'ypérite augmente de manière significative entre 6 h et J1, temps pour lequel elle atteint sa valeur maximale à savoir 1.1 ± 0.1 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. La fréquence la plus importante de biadduit a été mesurée 6 h post-exposition à la fois dans le cerveau et dans la rate. Pour chacun de ces deux organes elle est de 0.08 ± 0.01 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides.

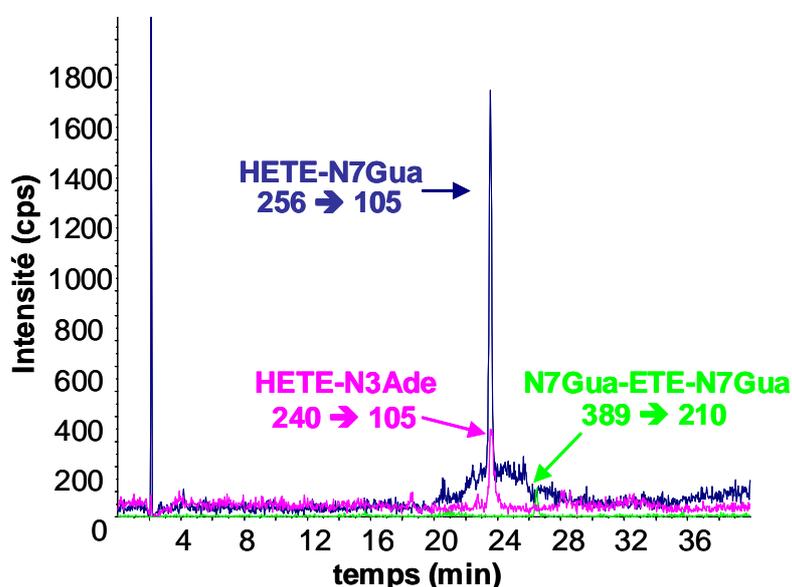


Figure 24 : Chromatogramme obtenu après l'analyse HPLC-MS/MS d'ADN extrait de cerveau de souris exposée à 2 mg/kg d'ypérite

Tous les adduits ont été détectés 6 h post-exposition à 6 mg/kg d'ypérite dans chacun des organes prélevés sauf dans le foie. Pour cette dose d'exposition et ce temps, le taux de HETE-

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

N7Gua est le plus important dans le cerveau et les poumons avec respectivement 1.1 ± 0.1 et $1.2 \pm 0.2/10^6$ nucléosides. Viennent ensuite la rate puis les reins (0.53 ± 0.05 et 0.11 ± 0.04 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides). Le taux de biadduit après 6 h de traitement est le plus élevé dans le cerveau, les poumons et la rate (Tableau 8). On y en dénombre en moyenne 0.1 ± 0.01 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Les fréquences de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua dans le cerveau et les reins continuent d'augmenter entre 6 h et J1 où elles sont maximales. Les quantités mesurées de HETE-N7Gua sont respectivement de 1.9 ± 0.1 et de $0.24 \pm 0.06/10^6$ nucléosides et celles de N7Gua-ETE-N7Gua sont de 0.14 ± 0.01 et de $0.02 \pm 0.003/10^6$ nucléosides. A J1 post-exposition, les taux de ces adduits deviennent significativement plus importants dans le cerveau. De plus, la fréquence de HETE-N7Gua n'est plus différente dans les reins et la rate.

| organe | dose (mg/kg) | HETE-N3Ade | N7Gua-ETE-N7Gua |
|---------|--------------|---------------------|---------------------|
| cerveau | 2 | $0,02 \pm 0,002$ | $0,08 \pm 0,01$ |
| | 6 | $0,04 \pm 0,004$ | $0,09 \pm 0,01$ |
| | 60 | $1,2 \pm 0,2$ | $3,0 \pm 0,4$ |
| poumons | 2 | $0,01 \pm 0,001^*$ | $0,03 \pm 0,004^*$ |
| | 6 | $0,03 \pm 0,01$ | $0,08 \pm 0,01$ |
| | 60 | $1,1 \pm 0,2$ | $2,5 \pm 0,5^*$ |
| reins | 2 | $0,002 \pm 0,000^*$ | $0,004 \pm 0,001^*$ |
| | 6 | $0,004 \pm 0,001^*$ | $0,008 \pm 0,002^*$ |
| | 60 | $0,6 \pm 0,07^*$ | $1,0 \pm 0,2^*$ |
| rate | 2 | nd | $0,08 \pm 0,01$ |
| | 6 | $0,04 \pm 0,01$ | $0,12 \pm 0,002$ |
| | 60 | $1,6 \pm 0,3$ | $3,3 \pm 0,5$ |
| foie | 2 | nd | nd |
| | 6 | nd | nd |
| | 60 | $0,2 \pm 0,005^*$ | $0,4 \pm 0,07^*$ |

Tableau 8 : *Formation de HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua dans différents organes internes après une exposition cutanée liquide*

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées et cerveau, poumons, reins, rate et foie ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent les fréquences de HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua normalisées à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) (comparaison des fréquences obtenues dans le cerveau à celle des autres organes)

Pour ce qui est de la fréquence de HETE- N3Ade, elle est maximale 6 h post-exposition dans tous les organes où l'adduit est détecté. Le cerveau, les poumons et la rate sont les organes

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

pour lesquels on en compte le plus avec en moyenne 0.04 ± 0.004 HETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides.

Une différence notable entre la rate et les reins concerne la quantité de HETE-N7Gua mesurée qui est plus importante dans la rate pour les faibles doses d'exposition mais qui à 60 mg/kg est détectée plus fortement dans les reins (27.7 ± 3.4 vs 15.1 ± 2.5 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides).

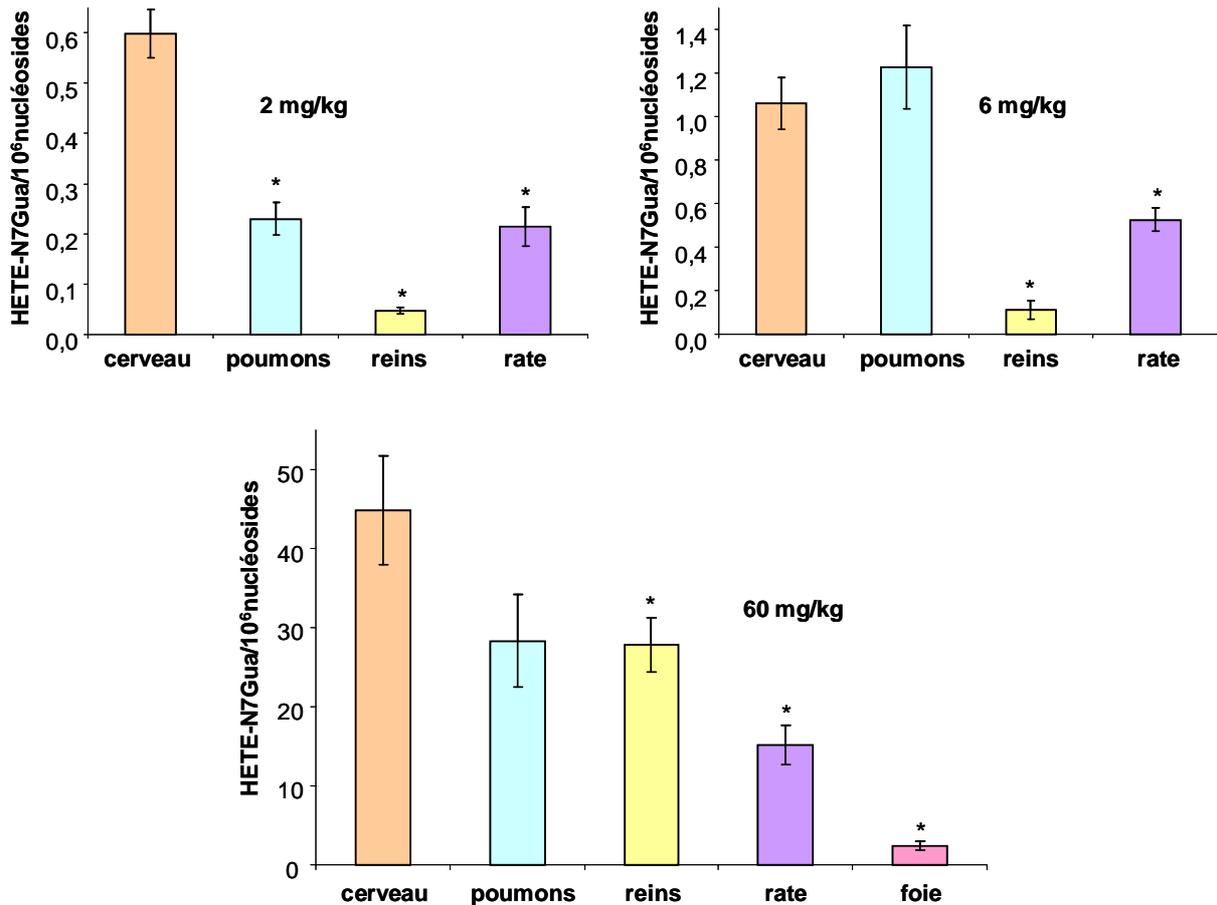


Figure 25 : Formation de HETE-N7Gua dans différents organes internes après une exposition cutanée liquide

Les souris SKH-1 ont été exposées à 2, 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées et cerveau, poumons, reins, rate et foie ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence de HETE-N7Gua normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) (comparaison des fréquences de HETE-N7Gua obtenues dans le cerveau à celles des autres organes).

L'analyse d'ADN issu de ces mêmes organes internes après une exposition à des vapeurs saturantes d'ypérite n'a permis de détecter aucun adduit quel que soit le temps d'exposition, 8 ou 16 min.

2. Persistance des adduits

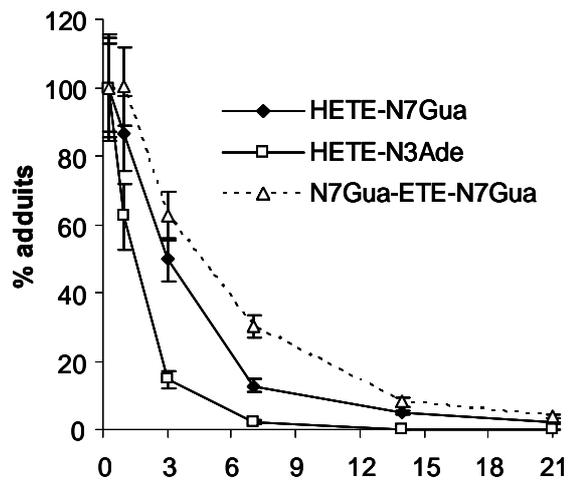
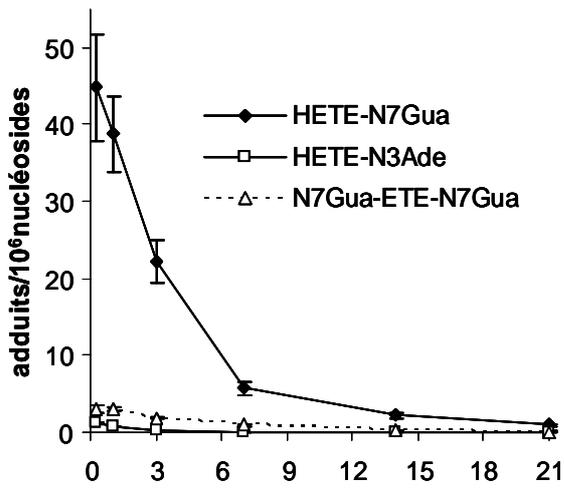
Nous avons étudié la persistance des adduits de l'ypérite dans tous les organes internes pendant 3 semaines aux différentes doses d'exposition (Figure 26 pour la dose 60 mg/kg). En fonction des organes considérés, la diminution de la fréquence des adduits est globalement significative entre chacun des temps étudiés à partir de 6 h ou de J1 post-exposition.

L'adduit minoritaire formé par le gaz moutarde, HETE-N3Ade, a été détecté jusque J3 dans les poumons et les reins et jusque J7 dans le cerveau pour la dose de traitement 2 mg/kg. Après une exposition à 6 mg/kg, cet adduit a été détecté dans ces mêmes organes jusque J7. Dans la rate, sa fréquence n'a pu être mesurée que 6 h post-exposition à 2 et 6 mg/kg d'ypérite. Pour la dose d'exposition la plus élevée, il a été détecté jusque J14 dans le cerveau et les poumons.

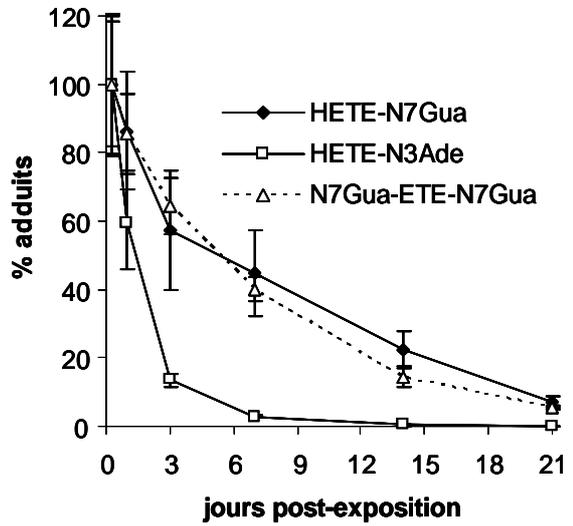
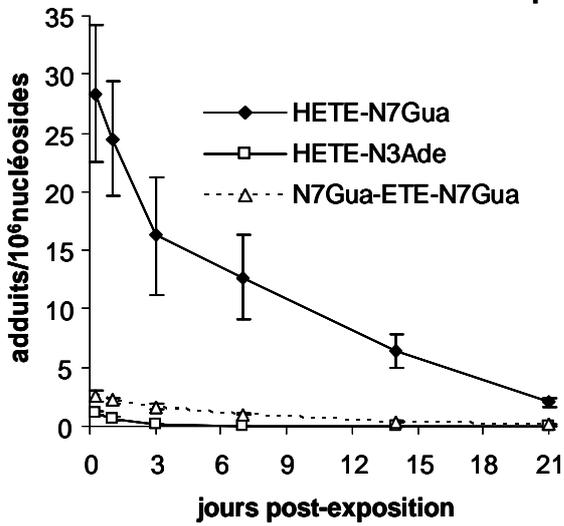
Dans le foie, où les adduits de l'ypérite n'ont été détectés que pour la dose 60 mg/kg, HETE-N3Ade, N7Gua-ETE-N7Gua et HETE-N7Gua sont quantifiables jusque J3, J14 et J21, respectivement. Dans la rate, les quantités de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua ont été décelées jusque J7 post-exposition à 6 mg/kg d'ypérite.

Pour les doses 2 et 6 mg/kg, HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua sont détectables jusqu'au moins J7 dans le cerveau, les poumons et les reins. De plus, HETE-N7Gua est le seul adduit à être quantifié 3 semaines après traitement à 60 mg/kg de gaz moutarde dans tous les organes avec un taux de 0.89 ± 0.13 , 2.0 ± 0.41 , 0.71 ± 0.12 , 0.15 ± 0.03 et $0.07 \pm 0.03/10^6$ nucléosides dans le cerveau, les poumons, les reins, la rate et le foie, respectivement.

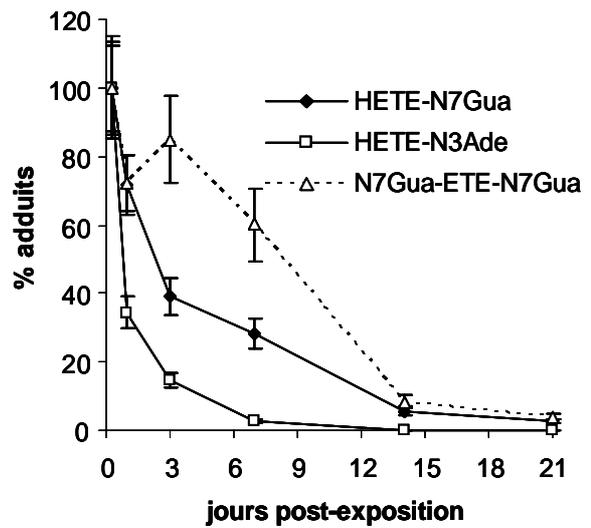
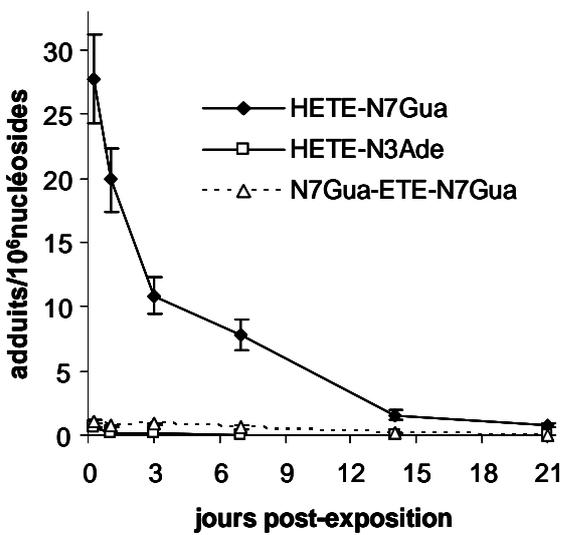
cerveau



poumons



reins



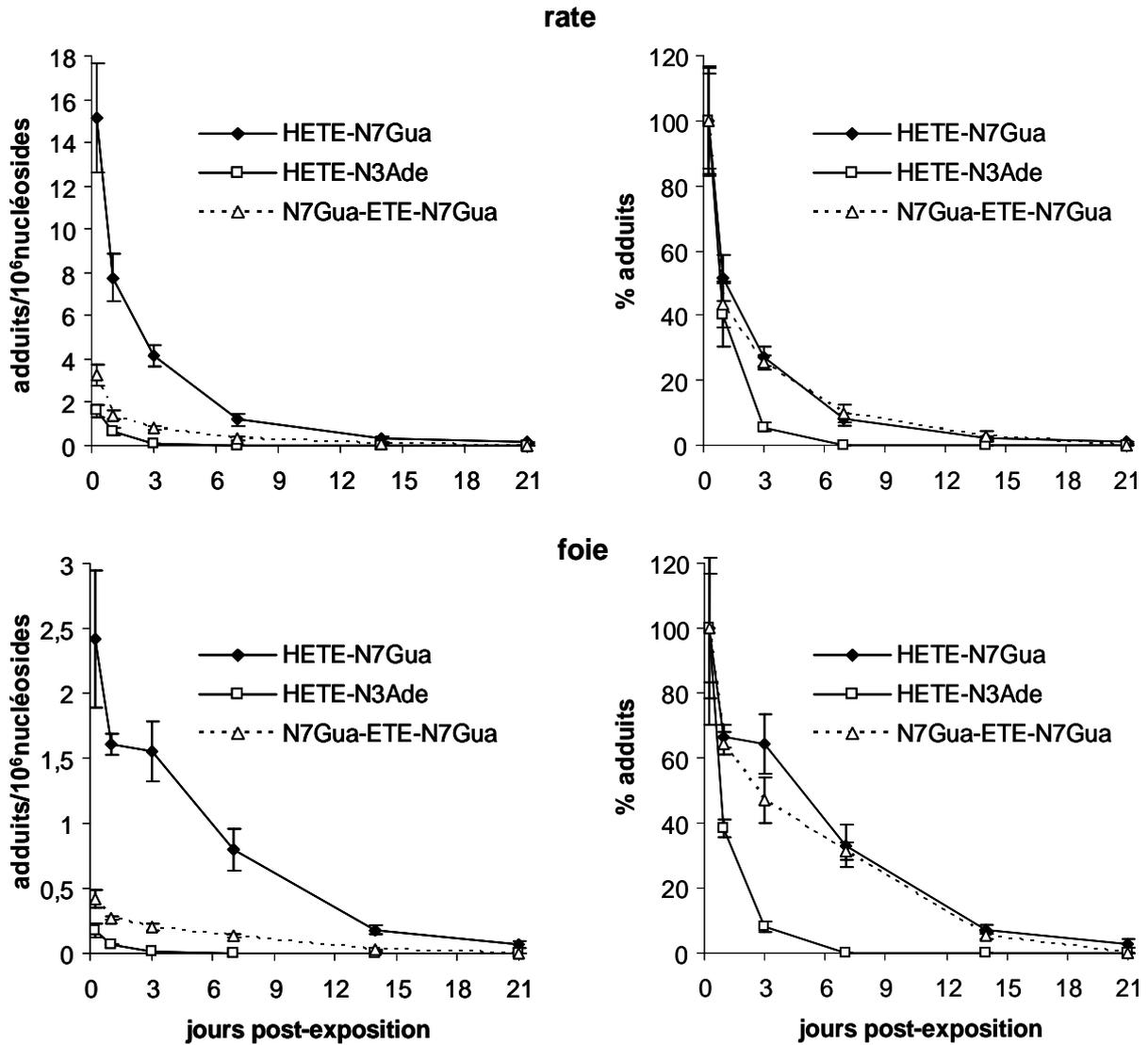


Figure 26 : Persistance des adduits de l'ypérite au cours du temps dans différents organes internes

Les souris SKH-1 ont été exposées à 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, les souris ont été sacrifiées et cerveau, poumons, reins, rate et foie ont été prélevés. L'ADN a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux (gauche) ou en pourcentage (droite) et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard.

En considérant, comme pour la peau exposée, que la cinétique d'élimination des adduits était une cinétique d'ordre 1, nous avons déterminé les constantes d'élimination de ces derniers à la dose d'exposition la plus élevée (Tableau 9). Les résultats obtenus montrent que les constantes d'élimination de HETE-N3Ade sont plus élevées quel que soit l'organe considéré, c'est-à-dire que son temps de demi-vie est le plus court. Dans la rate et le foie, il est de moins d'une journée. Aucune différence significative concernant les temps de demi-vie

de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua n'a été observée pour chacun des organes étudiés. Les temps de demi-vie des monoadduits de l'ypérite sont les plus longs dans les poumons avec 5.8 et 1.7 jours pour HETE-N7Gua et HETE-N3Ade, respectivement. Après les poumons, la constante d'élimination de HETE-N7Gua est la plus faible dans le foie et les reins puis le cerveau et la rate. Pour HETE-N3Ade, ce sont le cerveau et les reins qui ont le temps de demi-vie le plus élevé après les poumons. En ce qui concerne N7Gua-ETE-N7Gua, aucune différence significative n'a été obtenue entre les poumons, les reins, la rate et le foie. Toutefois, sa demi-vie est plus importante dans les poumons par rapport au cerveau avec respectivement 5.0 ± 0.3 contre 4.1 ± 0.2 jours.

| organes | constantes d'élimination (jour ⁻¹) | | |
|---------|--|------------------------|-----------------------|
| | HETE-N7Gua | HETE-N3Ade | N7Gua-ETE-N7Gua |
| cerveau | 0,19 ± 0,01 (3,6±0,2) | 0,46 ± 0,02 (1,5±0,1) | 0,17 ± 0,01 (4,1±0,2) |
| poumons | 0,12 ± 0,01 (5,8±0,6) | 0,41 ± 0,01 (1,7±0,1) | 0,14 ± 0,01 (5,0±0,3) |
| reins | 0,18 ± 0,01 (3,9±0,2) | 0,50 ± 0,01 (1,4±0,04) | 0,16 ± 0,01 (4,2±0,3) |
| rate | 0,20 ± 0,01 (3,5±0,2) | 0,96 ± 0,02 (0,7±0,01) | 0,15 ± 0,02 (4,5±0,4) |
| foie | 0,16 ± 0,01 (4,5±0,3) | 0,86 ± 0,02 (0,8±0,02) | 0,16 ± 0,01 (4,5±0,3) |

Tableau 9 : *Constantes d'élimination des adduits de l'ypérite dans différents organes internes*
 Les souris SKH-1 ont été exposées à 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, les souris ont été sacrifiées et cerveau, poumons, reins, rate et foie ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent les constantes d'élimination (en jour⁻¹) des adduits et sont exprimés en moyenne (n = 5 ou 6) ± l'erreur standard. Les temps de demi-vie correspondant (en jour) sont indiqués entre parenthèses.

3. Effet de la détersion sur la persistance des adduits

Comme il a été précédemment décrit dans certains organes, les taux d'adduits sont plus importants à J1 qu'à 6 h post-exposition. En outre, pour la dose d'exposition la plus élevée, la diminution de la fréquence d'adduits (en pourcentage) entre 6 h et J1 dans les organes internes est plus faible que dans la peau exposée. Ces résultats semblent indiquer la constitution d'un réservoir de gaz moutarde à partir duquel il serait relargué et continuerait d'endommager l'ADN des organes internes entre 6 h et J1 post-exposition. Il a été établi *ex vivo* dans des explants de peau humaine et de cochons qu'après une exposition liquide, l'ypérite s'accumulait dans la peau et notamment dans les membranes des cellules épidermiques lors de la pénétration percutanée (Chilcott *et al.*, 2001; Hattersley *et al.*, 2008). Par conséquent, nous avons cherché à éliminer ce réservoir potentiel et à évaluer l'effet de son

élimination sur la persistance des adduits dans les organes internes les plus atteints en termes de dommages à l'ADN, le cerveau et les poumons. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les résultats obtenus lors de l'étude de la persistance des adduits. Ainsi, 18 souris SKH-1 ont été exposées sur le dos dans les mêmes conditions que précédemment décrites à 6 et 60 mg/kg d'ypérite pendant 4 h à l'issue desquelles la peau exposée a été détergée à l'aide d'un système hydrochirurgical haute pression, le Versajet® (Schéma 48).

Ce système est composé d'une console, d'une pédale et d'une pièce à main. Il repose comme son nom l'indique sur l'utilisation d'eau ou de liquide physiologique à haute pression dont l'application tangentielle permet d'éliminer les zones de peau lésées. La pression du liquide est réglable sur la console et son arrivée au niveau de la pièce à main est effectuée en appuyant sur la pédale. Du fait de la haute pression, il se crée dans la pièce à main une dépression qui assure, en plus de la détergence, l'aspiration des débris. Ce système est notamment employé pour éliminer les tissus nécrotiques issus de brûlures thermiques (Duteille and Perrot, 2012). Il a en outre été utilisé pour débrider les tissus non cicatrisés consécutifs à une exposition accidentelle à l'ypérite en France (Boudana *et al.*, 2010).

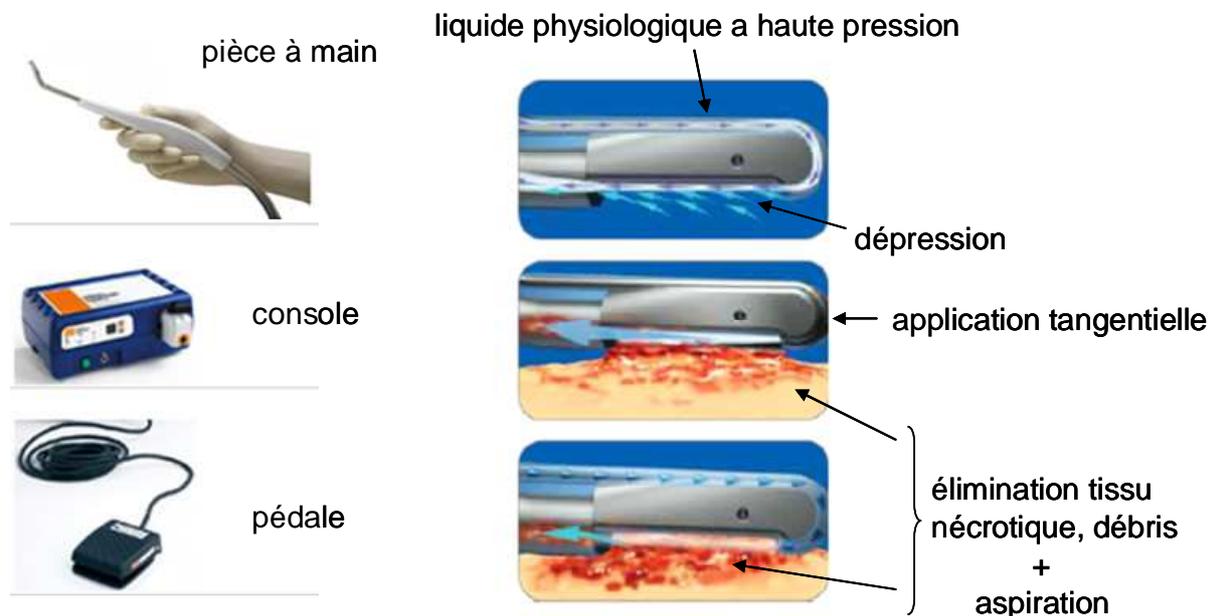


Schéma 48 : Principe de fonctionnement du système hydrochirurgical haute pression Versajet®

(d'après <http://www.smith-nephew.com>)

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

Suite à la détersion, les souris ont été sacrifiées à J3 et J7 post-exposition. Poumons et cerveau ont été prélevés, broyés et l'ADN extrait a été hydrolysé avant d'être analysé en HPLC-MS/MS. Nous nous sommes focalisés sur HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua qui sont les adduits les plus abondamment détectés pour ces doses et ces temps post-exposition. Les souris témoins ayant servi à cette étude correspondent à des souris traitées aux mêmes doses et sacrifiées à des temps identiques mais dont la zone de peau exposée n'a pas été détergée.

Les fréquences des adduits déterminées dans les poumons et les cerveaux des souris témoins sont sensiblement identiques à celles mesurées lors de l'étude de la persistance des adduits. Ceci montre la reproductibilité des conditions d'exposition ainsi que la robustesse de notre méthode de quantification. Trois jours et J7 post-traitement à 6 mg/kg, aucune différence concernant les taux de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua déterminés chez les souris détergées et les souris témoins n'a été observée et ce aussi bien dans les poumons que dans le cerveau (Figure 27). En revanche, pour la dose d'exposition 60 mg/kg, la quantité de HETE-N7Gua diminue à J3 post-exposition dans les deux organes. De plus, elle baisse aussi à J7 mais uniquement dans les poumons passant de 12.7 ± 2.5 à 2.0 ± 0.0 HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Dans le cerveau, la fréquence de N7Gua-ETE-N7Gua est, à l'instar de l'adduit majoritaire, plus faible après détersion à J3 post-exposition. En comparant la diminution de ces fréquences pour chaque adduit, on constate que celle de HETE-N7Gua est plus importante, 50% contre 40% pour N7Gua-ETE-N7Gua. Le taux de ce dernier est en outre légèrement plus faible à J7 avec 0.6 ± 0.1 contre 0.9 ± 0.1 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Dans les poumons également, la quantité de biadduit décroît à J7 après la détersion et de la même manière que dans le cerveau cette décroissance est moins importante que celle de HETE-N7Gua pour le même temps, 46 contre 83% respectivement. En outre, à J3 post-exposition, le taux de N7Gua-ETE-N7Gua reste relativement le même dans les poumons que les souris aient été détergées ou non.

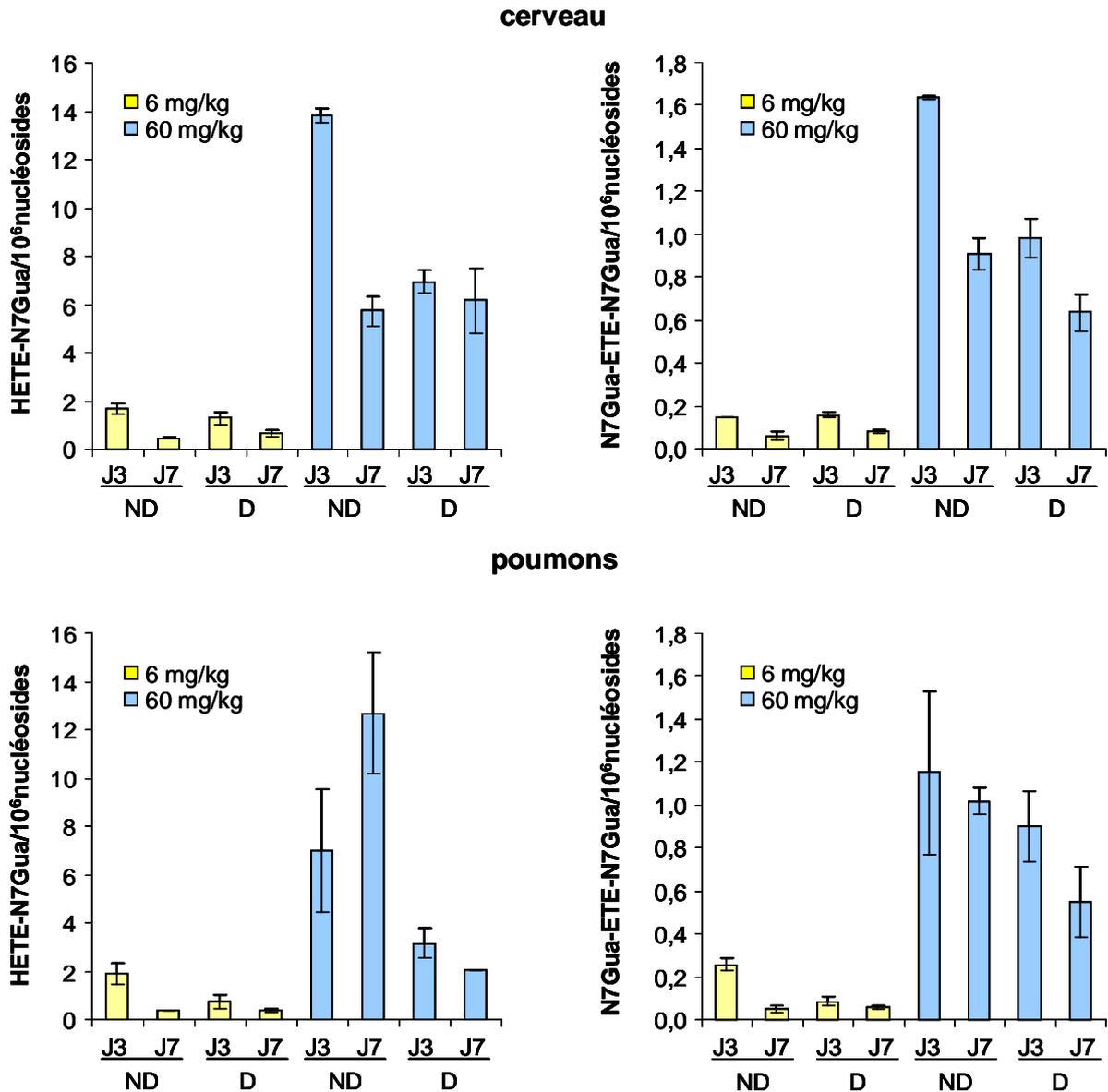


Figure 27 : Effet de la déterision sur la persistance des adduits de l'ypérite dans le cerveau et les poumons

Les souris SKH-1 ont été exposées à 6 et 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h à l'issue desquelles la peau exposée a été détergée avec le système hydrochirurgical Versajet®. Les souris ont été sacrifiées J3 et J7 post-exposition. Cerveau et poumons ont alors été prélevés. L'ADN a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'erreur standard (ND : non détergé ; D : détergé).

4. Dosage de la 8-oxo-dGuo

Outre les dommages à l'ADN formés directement par alkylation des bases, nous avons cherché à évaluer les lésions indirectes dues à une exposition au gaz moutarde et plus

particulièrement les lésions oxydatives. En effet, l'ypérite, en consommant le GSH, provoque un déséquilibre de la balance oxydoréductrice et par suite une augmentation de la formation des ERO qui peuvent alors oxyder lipides, protéines et ADN. Pour évaluer l'importance de cette voie dans la génotoxicité du gaz moutarde, nous avons dosé la 8-oxo-dGuo qui constitue, au niveau de la double hélice, le biomarqueur du stress oxydant par excellence. Une méthode de dosage de cette lésion par HPLC-MS/MS avait déjà été mise au point au laboratoire (Ravanat *et al.*, 1998). Contrairement aux adduits de l'ypérite, la 8-oxo-dGuo ne se dépurine pas, elle est donc quantifiée sous forme de 2'-désoxyribonucléoside modifié. Pour cela, la digestion enzymatique effectuée classiquement au laboratoire suffit à la détection quantitative de cette lésion. De plus, l'étape d'hydrolyse thermique que nous avons optimisée pour les adduits de l'ypérite constitue une cause d'augmentation artéfactuelle de l'oxydation de l'ADN. Il a donc fallu, à l'issue de la digestion enzymatique, séparer en deux les échantillons d'ADN extraits des différents tissus étudiés. Pour cette raison, nous n'avons pas dosé la 8-oxo-dGuo dans les échantillons de peau car les quantités d'ADN y sont beaucoup plus faibles que celles obtenues dans les organes internes.

Le dosage de la 8-oxo-dGuo a été réalisé après l'exposition liquide à la plus forte dose d'exposition de 6 h à J21. Les résultats obtenus n'indiquent aucune augmentation de cette lésion dans l'ADN des 5 organes internes étudiés. En effet, quel que soit le temps post-traitement examiné, le taux de 8-oxo-dGuo mesuré après exposition dans ces organes n'est pas significativement différent de celui évalué dans les organes des souris témoins. Par exemple, dans les deux organes où les dommages directs ont été détectés en plus grande quantité, *i.e* cerveau (Figure 28A) et poumons (Figure 28B), la fréquence de 8-oxo-dGuo est respectivement de 1.1 ± 0.02 et de $2.8 \pm 0.2/10^6$ nucléosides chez les souris témoins à J1 post-exposition et elle est de 1.0 ± 0.1 et de $2.6 \pm 0.4/10^6$ nucléosides chez les souris exposées. De plus, les quantités de 8-oxo-dGuo dénombrées sont dans l'ensemble stables au cours du temps pour chaque organe.

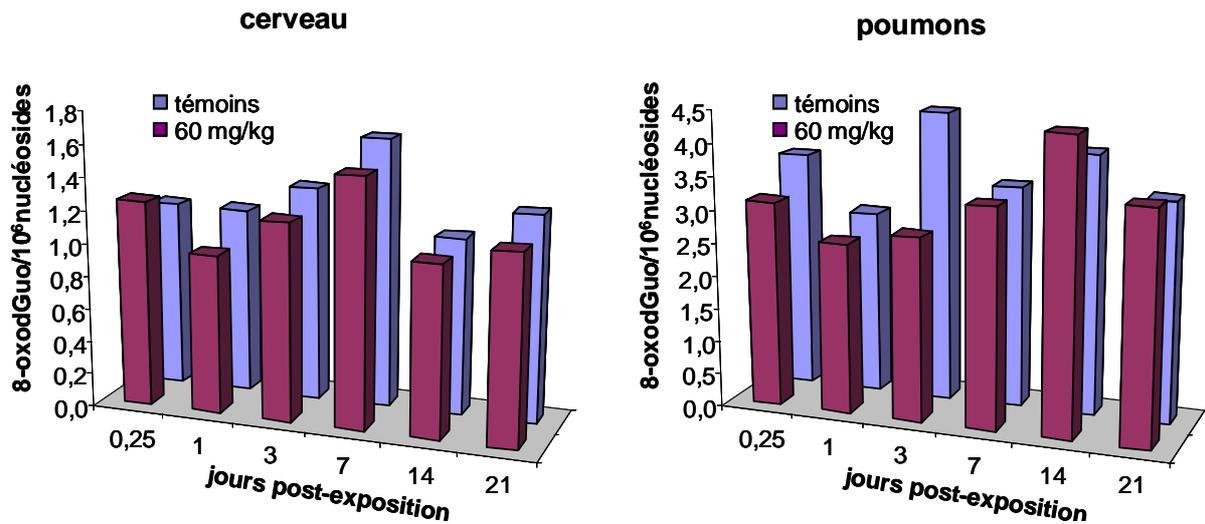


Figure 28 : Dosage de la 8-oxo-dGuo au cours du temps dans les organes internes après une exposition cutanée liquide

Les souris SKH-1 ont été exposées à 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, les souris ont été sacrifiées et cerveau, poumons, reins, rate et foie ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence de la 8-oxo-dGuo dans le cerveau et les poumons normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne (contrôle : n = 4 ; traitées : n = 6). Les erreurs standards sont de l'ordre de 10% en moyenne.

Nous avons également évalué l'effet de la voie d'exposition sur la formation de la 8-oxo-dGuo. Pour cela, nous avons dosé cette dernière dans les organes de souris après exposition cutanée à des vapeurs saturantes d'ypérite pendant 16 min (Figure 29). Contrairement aux résultats obtenus après l'exposition liquide, la fréquence de la 8-oxo-dGuo après un traitement vapeur diffère de celle des souris témoins dans tous les organes exceptés les reins où elle reste légèrement supérieure à $4.0/10^6$ nucléosides dans les deux cas. Dans le cerveau, ce taux augmente significativement. Il passe respectivement de 1.2 ± 0.1 à 1.9 ± 0.5 8-oxo-dGuo/ 10^6 nucléosides. Dans le foie, une augmentation encore plus prononcée a été constatée avec un accroissement de plus de 200% du taux de 8-oxo-dGuo qui varie de 0.3 ± 0.08 à $1.0 \pm 0.09/10^6$ nucléosides. Dans les poumons, une diminution significative de la quantité de 8-oxo-dGuo a été observée suite à l'exposition vapeur. En effet, elle baisse de 4.5 ± 0.1 à 2.4 ± 0.2 8-oxo-dGuo/ 10^6 nucléosides. Une réduction encore plus importante a été relevée dans la rate où sa fréquence est diminuée de près de 75% en passant de 6.7 ± 0.8 à 1.7 ± 0.5 8-oxo-dGuo/ 10^6 nucléosides

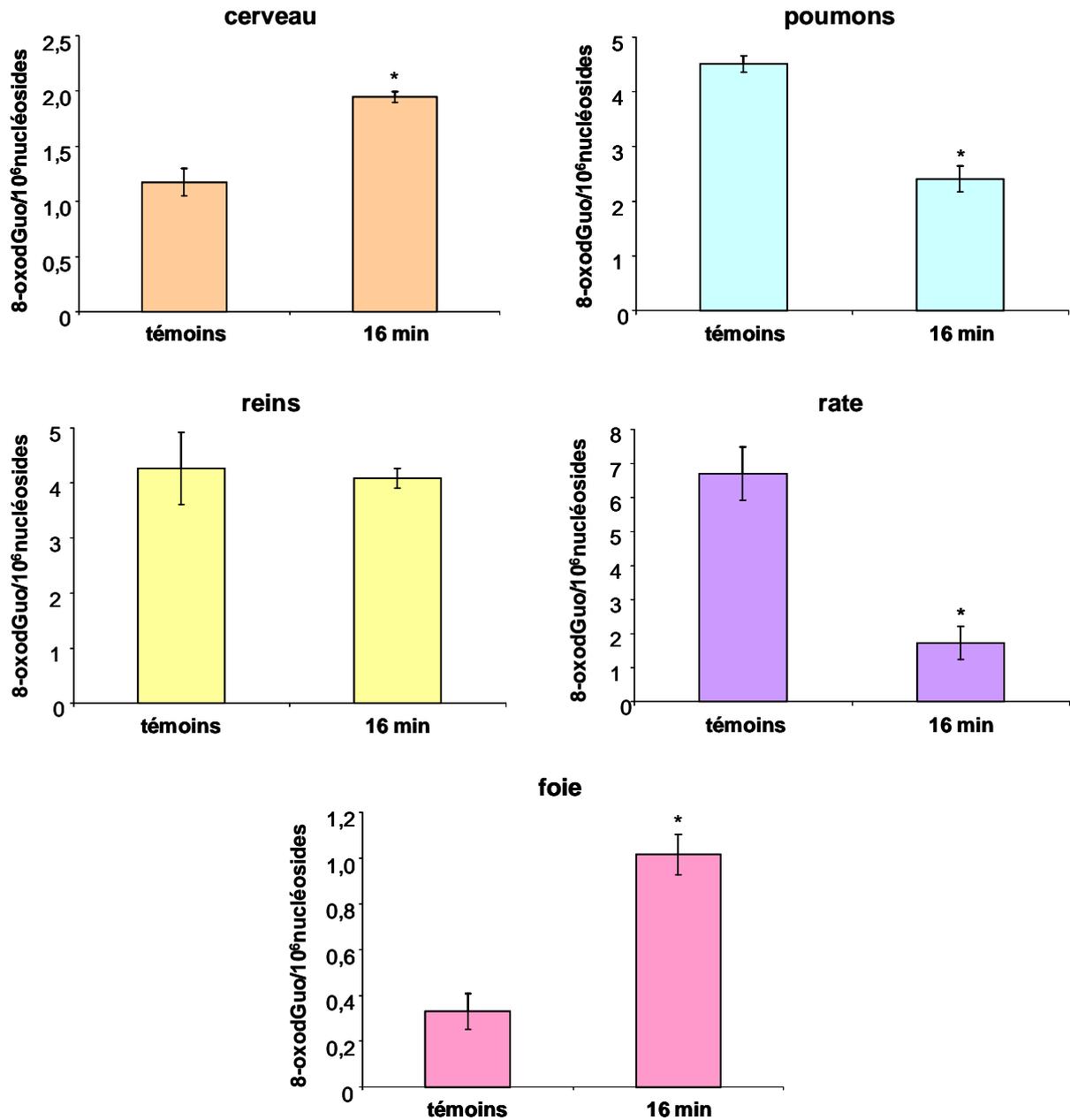


Figure 29 : Dosage de la 8-oxo-dGuo dans différents organes internes après une exposition cutanée vapeur

Les souris SKH-1 ont été exposées à des vapeurs saturantes d'ypérite sur le dos pendant 16 min. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées et cerveau, poumons, reins, rate et foie ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence de la 8-oxo-dGuo normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne (contrôle : $n = 4$; traitées : $n = 6$) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) (comparaison des fréquences de 8-oxo-dGuo obtenues dans les groupes traités à celles des groupes témoins).

IV. Conclusion

Dans le but de mieux caractériser la génotoxicité de l'ypérite, nous avons réalisé, chez la souris sans poils SKH-1, une étude de la formation et de la persistance des adduits à l'ADN qu'elle génère. Dans le souci d'approcher des conditions réelles d'exposition, les animaux, plus d'une centaine, ont été exposés à volume constant (2 µL) d'ypérite en solution. Pour cette étude, qui s'est déroulée sur trois semaines, plusieurs doses (2, 6 et 60 mg/kg) en rapport avec la sévérité de la brûlure occasionnée ont été retenues. A l'issue des différents temps de sacrifice, plusieurs échantillons de peau (exposée, adjacente et éloignée) ainsi que différents organes internes (poumons, cerveau, reins, foie et rate) ont été prélevés et broyés pour en extraire l'ADN qui a alors été hydrolysé avant d'être analysé en HPLC-MS/MS avec la méthode précédemment mise au point.

Les résultats obtenus ont montré une fréquence maximale des trois adduits de l'ypérite à des temps courts après exposition pour chacune des doses étudiées dans les échantillons de peau et à la dose la plus élevée dans les organes internes. Si les quantités des adduits sont souvent maximales à 6 h, elles le sont dans certains organes à J1 pour les plus faibles doses d'exposition. Dans tous les échantillons analysés, une diminution importante de leur quantité entre chacun des temps étudiés à partir de 6 h ou J1, a été observée. La diminution de la quantité des dommages à l'ADN formés par l'ypérite est la résultante de deux phénomènes, l'un biologique et l'autre chimique. Le premier correspond à la prise en charge des dommages par les enzymes de réparation de l'ADN et le second est le fait de leur dépurination. En effet, bien que moins importante par rapport aux nucléosides isolés, la dépurination des adduits du gaz moutarde se produit dans l'ADN double brin comme cela a été montré pour HETE-N7dGuo (Brookes and Lawley, 1960). Ces adduits dépurinés ne se trouvent plus dans l'ADN et ne sont donc plus détectables, expliquant ainsi en partie la cinétique d'élimination dans les différents organes étudiés. Malgré l'instauration de cette cinétique, la persistance des adduits du gaz moutarde est relativement longue comme en témoigne la détection de l'adduit majoritaire et du biadduit 3 semaines post-exposition à toutes les doses étudiées dans la peau exposée et celle de HETE-N7Gua dans chacun des organes internes prélevés pour la dose 60 mg/kg.

Dans la peau exposée, la formation des adduits à 6 h post-exposition a été corrélée positivement au nombre de cellules apoptotiques déterminé 24 h pour les doses 6 et 60 mg/kg.

Ces résultats confirment l'importance des dommages à l'ADN comme une source majeure de déclenchement d'apoptose et donc comme un facteur clé dans la cytotoxicité induite par le gaz moutarde (Greenberg *et al.*, 2006; Kehe and Szinicz, 2005). L'évolution du processus lésionnel a été étudiée par la mesure de la perte insensible en eau, méthode non invasive qui reflète la fonction barrière de la peau. Elle a été récemment décrite comme étant adaptée pour le suivi de la brûlure cutanée générée par une exposition à des vapeurs saturantes d'ypérite chez le même modèle (Clery-Barraud *et al.*, 2013). Corrélée aux observations macroscopiques, la valeur de la perte insensible en eau est maximale 4 jours après exposition. Elle augmente fortement à J1 et plus faiblement jusqu'à J4, temps à partir duquel elle reste constante jusqu'à J21. Ainsi, la formation des adduits qui précède ou est concomitante avec l'apparition des premiers symptômes pourrait être responsable d'un accroissement important de la perte insensible en eau et donc à une perte de l'intégrité de la fonction barrière de la peau dans les premières heures suivant l'exposition. Cette observation rappelle l'hypothèse de Papirmeister *et al.* qui fait des dommages à l'ADN l'évènement déclencheur de la formation des phlyctènes induites par l'ypérite (Papirmeister *et al.*, 1985). La perte de l'intégrité de la fonction barrière est maintenue jusque J21, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les cellules basales, à partir desquelles l'épiderme et ses différentes couches sont régénérées, sont les cellules majoritairement apoptotiques après l'exposition au toxique.

En détectant les adduits de l'ypérite dans des échantillons de peau non directement exposés, nous avons montré pour la première fois, à notre connaissance, sa diffusion radiale dans la peau. Toutefois, celle-ci est relativement limitée dans l'espace. En effet, pour la peau éloignée, les adduits n'ont été quantifiés qu'à la dose d'exposition la plus élevée et ce jusque J1 post-exposition. De plus, elle n'a pas été observée après une exposition à des vapeurs saturantes d'ypérite pendant 8 ou 16 min. De manière intéressante, après une exposition vapeur pendant 16 min, la fréquence d'adduits mesurée dans la peau exposée est quasiment identique à celle obtenue après une exposition à 2 mg/kg d'ypérite sauf pour celle du biadduit qui est deux fois plus importante.

Dans la peau exposée à la plus faible dose de traitement, le temps de demi-vie du biadduit est le plus important des trois adduits de même qu'il est plus élevé qu'aux doses 6 et 60 mg/kg. Autrement dit, la cinétique d'élimination du biadduit est plus lente après un traitement à 2 mg/kg, laissant suggérer une cinétique de réparation plus lente, celle de sa dépurination étant indépendante de la dose d'exposition. Aucune différence de temps de demi-vie n'a été constaté entre les trois adduits pour le dose 60 mg/kg.

Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1

Contrairement à la diffusion radiale, la diffusion interne de l'ypérite après un traitement cutané est bien connue (Chilcott *et al.*, 2000; Cullumbine, 1947). Avec la détection de dommages à l'ADN notamment dans le cerveau et les poumons, nous avons mis en évidence la toxicité systémique du gaz moutarde après une exposition percutanée causant une brûlure du 1^{er} degré. Toutefois, le nombre d'adduits quantifiés est relativement faible, ceux-ci étant surtout détectés après une exposition à 60 mg/kg d'ypérite qui provoque une brûlure du 3^{ème} degré.

De façon surprenante, la formation des adduits est globalement plus importante dans le cerveau qui ne fait pas parti des trois organes principalement ciblés par le gaz moutarde à contrario des poumons. Le foie constitue l'organe le moins touché en termes de fréquence d'adduits. Aucun adduit n'y a de plus été détecté aux plus faibles doses d'exposition. Les temps de demi-vie de chacun des dommages, déterminés à partir des fréquences mesurées pour la dose 60 mg/kg, sont plus importants dans les poumons que dans le cerveau. En outre, la quantité d'adduits retrouvée aux temps post-exposition les plus longs est également plus importante dans les poumons que dans le cerveau, ce qui diffère avec les résultats obtenus pour les temps post-exposition les plus courts. Ce basculement de la prépondérance des adduits dans les poumons au cours du temps s'explique, comme pour le biadduit dans la peau traitée à 2 mg/kg, par des différences de cinétique de réparation.

Nous avons de plus cherché à évaluer l'effet de la voie d'exposition sur la formation des adduits en exposant les souris SKH-1 à des vapeurs saturantes d'ypérite pendant 8 ou 16 min. Aucun adduit n'a été détecté après ces expositions.

Se basant sur le fait que l'ypérite est capable d'alkyler le GSH et par suite d'augmenter potentiellement la formation des ERO, nous avons, pour les deux types d'exposition, réservé une partie de l'ADN extrait des organes pour le dosage de la 8-oxo-dGuo. Aucune différence entre les quantités basales de 8-oxo-dGuo et celles mesurées après traitement à 60 mg/kg d'ypérite n'a été obtenue quel que soit le temps considéré tandis que suite à une exposition vapeur pendant 16 min, une augmentation de cette quantité a été observée à la fois dans le cerveau et dans le foie. De façon inattendue, le taux de 8-oxo-dGuo diminue dans les poumons et la rate. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat serait que les activités de réparation de la 8-oxo-dGuo soient plus importantes dans ces organes que dans le cerveau et le foie.

En somme, cette étude, qui a porté au total sur plus d'un millier d'échantillons, nous a permis d'obtenir, chez la souris sans poils SKH-1, une meilleure compréhension de la

génotoxicité de l'ypérite après une exposition cutanée liquide via l'évaluation quantitative de la formation et la persistance des adduits qu'elle génère. Les résultats obtenus dans les organes internes, et plus précisément l'augmentation de la quantité de certains adduits dans plusieurs organes entre 6 h et J1 pour les plus faibles doses d'exposition et la diminution moins importante de cette quantité par rapport à la peau exposée à la plus forte dose, suggèrent la constitution d'un réservoir d'ypérite que certaines études ont localisé dans la peau (Chilcott *et al.*, 2001; Hattersley *et al.*, 2008). Nous avons donc évalué l'effet de l'élimination de ce réservoir sur la persistance des adduits en nous appuyant, pour le choix des doses de traitement et des temps de sacrifice des animaux, sur les résultats précédemment obtenus. Celle-ci, réalisée 4 h après traitement à l'aide du système hydrochirurgical Versajet[®], a eu un effet positif pour la dose la plus élevée, *i.e* 60 mg/kg, comme en témoigne la diminution de la fréquence de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua 3 et 7 jours post-exposition dans le cerveau et les poumons.

Plus généralement, la démarche entreprise pour l'évaluation de la persistance des adduits après déterision pourrait être empruntée pour évaluer l'efficacité de molécules à visée thérapeutique, les dommages à l'ADN induits par l'ypérite servant à la fois de biomarqueurs d'exposition et d'effet.

Chapitre 5: Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation de l'ADN

I. Introduction

Afin d'approfondir la caractérisation de la génotoxicité du gaz moutarde, nous avons évalué son impact sur les activités de réparation de l'ADN. L'étude réalisée a porté sur 18 souris SKH-1 qui ont été exposées dans les mêmes conditions que précédemment décrites à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite. Comme la peau traitée est fortement nécrosée après une exposition à 60 mg/kg, ces doses ont été choisies afin de garantir l'extraction d'une quantité suffisante de protéines. Les souris ont été sacrifiées 4 et 24 h post-exposition et la peau exposée a été biopsiée. Nous avons également prélevé le cerveau, les poumons et les reins, organes pour lesquels nous avons mesuré le taux d'adduits le plus élevé.

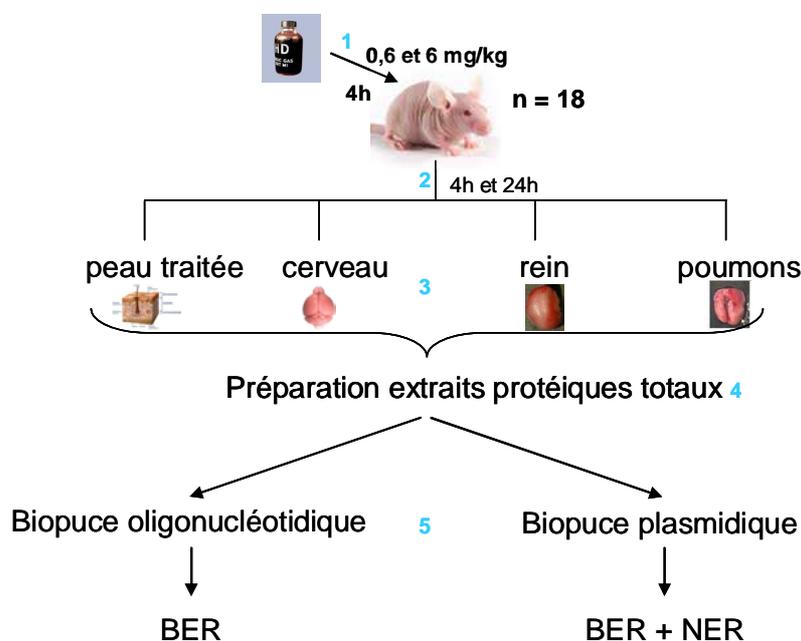


Schéma 49 : Mode opératoire pour l'étude de l'impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation de l'ADN

1 : exposition des souris à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h; 2 : sacrifice des animaux 4 et 24 h post-exposition ; 3 : prélèvement et broyage de la peau exposée, du cerveau, des poumons et des reins ; 4 : extraction des protéines totales ; 5 : mesure des activités de réparation

Dans le but de préserver les activités de réparation, tous les prélèvements ont été broyés le jour du sacrifice des animaux. Les protéines totales ont été extraites et ont pu alors être congelées avant l'étude des activités des enzymes de réparation de l'ADN. Pour cela, deux types de biopuces développées au laboratoire ont été employés. Celles-ci permettent de

mesurer plusieurs activités de réparation liées au BER (biopuces oligonucléotidique et plasmide) ou au NER (biopuce plasmide).

II. Impact d'une exposition à l'ypérite sur certaines activités glycosylases du BER

1. Principe de la biopuce oligonucléotidique

La biopuce oligonucléotidique correspond à une lame de verre recouverte de streptavidine sur laquelle des oligonucléotides support biotinylés sont greffés. Des oligonucléotides marqués avec un fluorophore (Cy3) et contenant des lésions spécifiques sont hybridés avec des oligonucléotides de séquence complémentaires. Après hybridation, ils sont fixés sur des positions spécifiques de la lame au niveau des oligonucléotides support. Les lésions contenues dans cette biopuce sont les suivantes : ethénoadénine en face d'une thymine (EthA_T), hypoxanthine en face d'une thymine (Hx_T), uracile en face d'une guanine (U_G), tétrahydrofurane (analogue stable d'un site abasique) en face d'une adénine (THF_A), 8-oxoguanine en face d'une cytosine (OxoG_C), adénine en face d'une 8-oxoguanine (A_OxoG), diols de thymine en face d'une adénine (Tg_A) et uracile en face d'une adénine (U_A). Toutes ces lésions sont prises en charge par le BER. En incubant des extraits protéiques avec la biopuce oligonucléotidique, ce sont les activités des glycosylases qui sont mesurées via une perte de la fluorescence. En effet, si dans les extraits il y a présence de glycosylases spécifiques d'une ou plusieurs lésions contenues dans la biopuce, elles vont les reconnaître et les exciser aboutissant au relargage du fluorophore et donc à une perte de fluorescence. L'excision de la base endommagée est le fait d'une glycosylase spécifique, celle du site abasique néoformé pouvant soit être médiée par l'action d'APE1 soit être réalisée par l'activité AP lyase dans le cas d'une glycosylase bifonctionnelle. La fluorescence résiduelle est mesurée à l'aide d'un scanner à 532 nm (longueur d'onde d'émission maximale de Cy3) et est corrigée avec celle d'un oligonucléotide témoin qui est marqué au Cy3 mais ne contient pas de lésion. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'excision en fonction des différentes lésions.

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

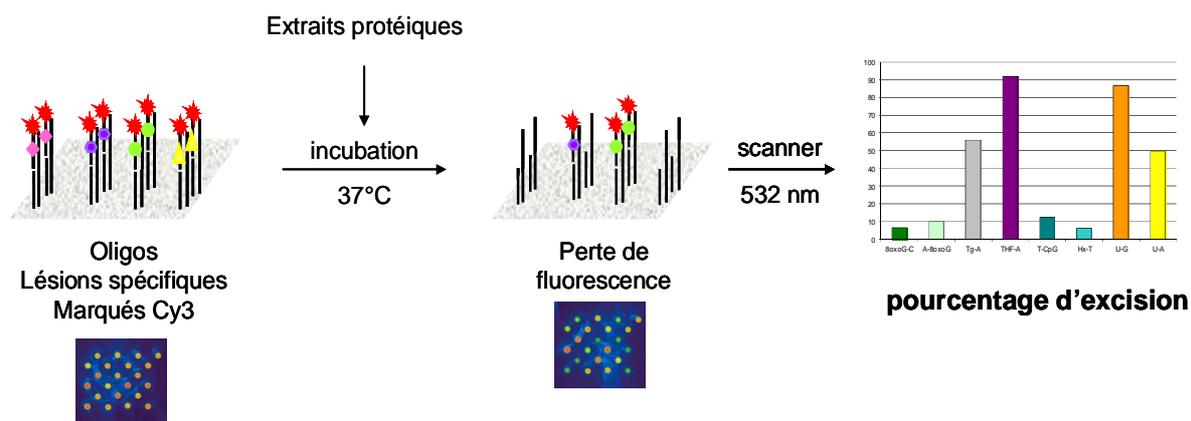


Schéma 50 : Principe de la mesure des activités d'excision avec la biopuce oligonucléotidique

2. Impact de l'ypérite sur certaines activités glycosylases du BER

Afin d'évaluer l'impact de l'ypérite sur certaines activités glycosylases du BER, nous avons préalablement réalisé différents tests pour déterminer les conditions d'incubation des extraits protéiques totaux avec les biopuces oligonucléotidiques. A l'issue de ces essais, nous avons retenu les conditions suivantes : incubation des protéines extraites à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ pendant 1 h avec les biopuces. Une fois les expérimentations effectuées et les résultats obtenus (Sylvain Caillat), des tests de comparaison multiples ont été réalisés par un ingénieur statisticien (Fanny Sarrazy) dans le but d'évaluer l'effet de la concentration du traitement à l'ypérite sur l'activité des glycosylases de chaque organe.

2.1. Effet de la concentration de l'ypérite sur les activités de réparation 4 h après exposition

Pour chacun des organes étudiés, le taux d'excision basal, c'est-à-dire en absence de traitement à l'ypérite, diffère en fonction de la lésion considérée (Figure 30). Ce taux basal est maximal pour la lésion THF_A avec un taux d'excision supérieur à 80% dans le cerveau, les poumons et la peau. Ce taux est proche de 60% dans les reins. Les taux de coupure des lésions OxoG_C, A_OxoG, Tg_A et U_A sont quasi-nuls dans les trois organes internes. Pour ces derniers, aucune différence significative n'a été observée entre les activités d'excision des

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

différentes lésions contenues sur la biopuce après traitement à l'ypérite et ce quelle que soit la dose d'exposition. En revanche, dans la peau, l'excision de THF_A diminue significativement pour des concentrations de traitement variant entre 0.6 et 6 mg/kg, cette diminution étant de 18 %. Le taux de coupure de cette lésion baisse aussi (24%) entre une absence d'exposition au toxique et la dose de traitement la plus élevée. De plus, dans ces conditions, le taux d'excision de la lésion EthA_T est également moins important, il diminue de 66%.

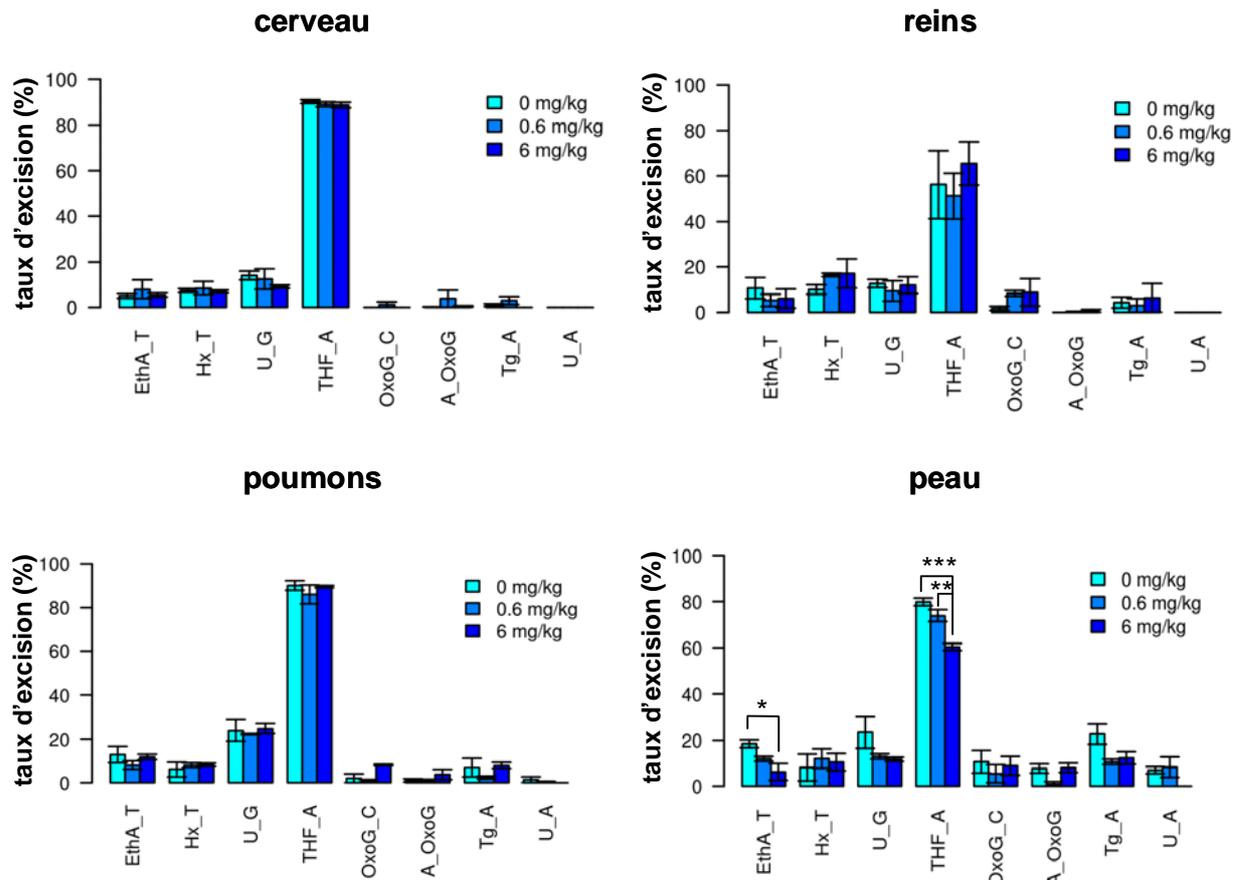


Figure 30 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités d'excision des glycosylases à 4 h post-exposition

Les souris SKH-1 ont été exposées à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h à l'issue desquelles elles ont été sacrifiées. Peau traitée, cerveau, poumons et reins ont alors été prélevés et broyés le jour même pour en extraire les protéines. Elles ont ensuite été incubées à une concentration de 10 µg/mL pendant 1 h à 37°C avec les puces oligonucléotidiques. Les résultats représentent les taux de coupure des différentes lésions par les glycosylases et sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

2.2. Effet de la concentration de l'ypérite sur les activités de réparation 24 h après exposition

De la même façon que 4 h après exposition, le taux d'excision basal est différent pour chacune des lésions contenues dans la biopuce et celui de THF_A reste le plus élevé dans les quatre organes étudiés (Figure 31). En outre, les comparaisons multiples effectuées pour les organes internes n'ont pas révélées d'effet de la concentration de l'ypérite sur les activités d'excision des différentes lésions.

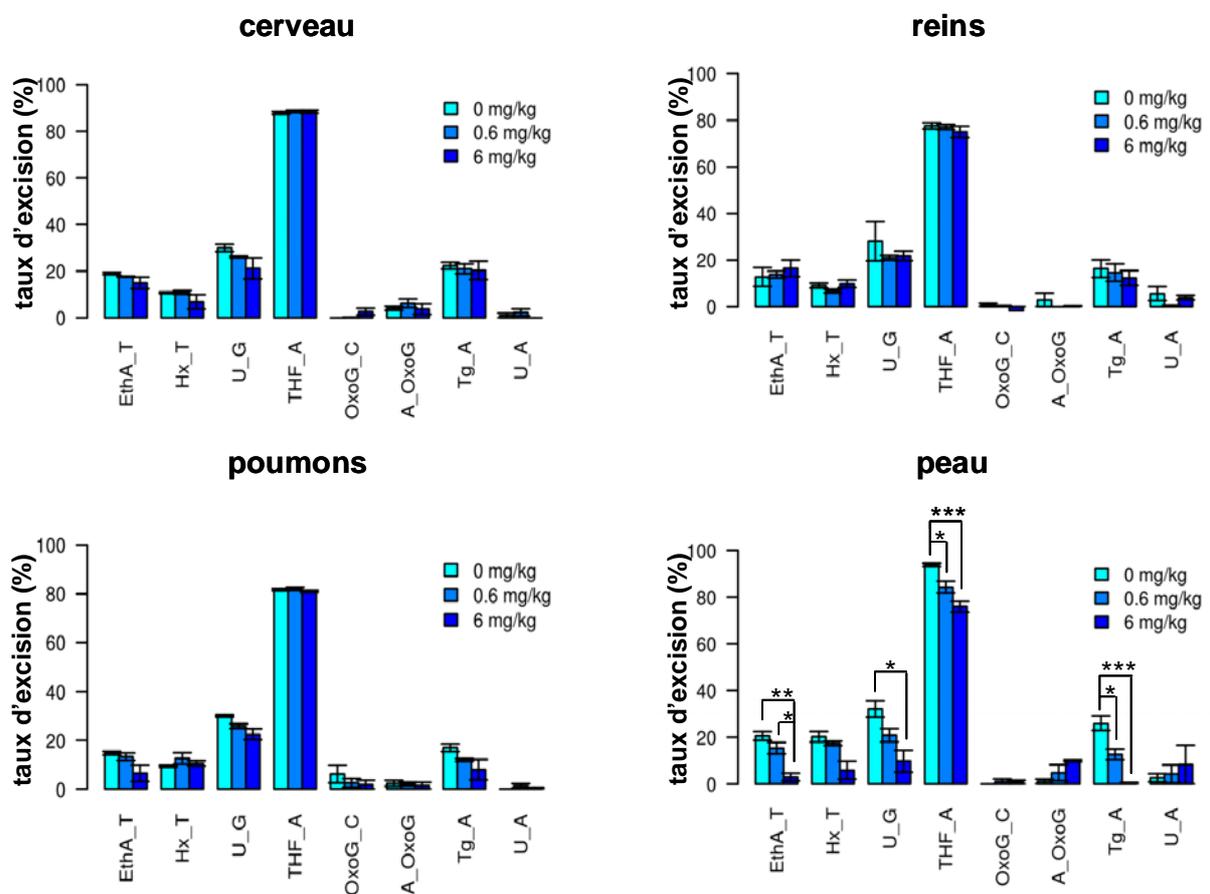


Figure 31 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités d'excision des glycosylases à 24 h post-exposition

Les souris SKH-1 ont été exposées à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Elles ont été sacrifiées 24 h post-exposition. Peau traitée, cerveau, poumons et reins ont alors été prélevés et broyés le jour même pour en extraire les protéines. Elles ont ensuite été incubées à une concentration de 10 µg/mL pendant 1 h à 37°C avec les puces oligonucléotidiques. Les résultats représentent les taux de coupure des différentes lésions par les glycosylases et sont exprimés en moyenne (n = 3) ± l'erreur standard. Niveaux de significativité : p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***)

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

En ce qui concerne la peau, les taux de coupure de THF_A et EthA_T sont aussi diminués 24 h post-traitement. Pour la lésion THF_A, cette diminution est de 10% celle entre 0 et 0.6 mg/kg. Pour EthA-T, en plus de l'atténuation du taux de coupure entre l'absence d'exposition et le traitement à 6 mg/kg observée à 4 h, une baisse de son activité d'excision de 80% entre les doses 0.6 et 6 mg/kg est décelée à 24 h post-traitement. Outre les lésions THF_A et EthA_T, les taux d'excision de Tg_A et U_G sont également diminués après 24 h d'exposition. Cette diminution est constatée pour ces deux lésions entre l'absence de traitement et celui à 6 mg/kg de gaz moutarde. La baisse d'activité de l'excision de Tg_A est de plus observée entre la peau témoin et celle traitée à 0.6 mg/kg d'ypérite (-51%).

III. Impact d'une exposition à l'ypérite sur la réparation de dommages par le BER et le NER

1. Principe de la biopuce plasmide

La biopuce plasmide correspond à une lame de verre recouverte d'hydrogel sur laquelle sont déposés des plasmides préalablement traités avec différents agents, physiques ou chimiques. La nature des dommages générés par ces derniers est connue de même que les systèmes de réparation les prenant en charge (BER ou NER). Les lésions contenues dans cette biopuce sont regroupées dans le Tableau 10.

| agent | type de dommage | système de réparation |
|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| UVC | photoproduits (6-4) et CPD (CPD) | NER |
| psoralène + UVA | pontage intra et inter-brins (Pso) | NER |
| cisplatine | pontage intra et inter-brins (CisP) | NER |
| decadienal | alkylation (AlkB) | BER |
| riboflavine + lumière | 8-oxoguanine (OxoG) | BER |
| traitement acide | sites abasiques (AbaS) | BER |
| permanganate de potassium | thymine et cytosine glycols (Glycol) | BER |

Tableau 10 : Types de dommages à l'ADN contenus dans la biopuce plasmide et système de réparation les prenant en charge

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

En incubant des extraits protéiques avec la biopuce plasmide, ce sont les activités de réparation globale (excision-resynthèse) du BER et du NER pour les dommages correspondant qui sont mesurées via une augmentation de fluorescence. En effet, lors de l'incubation de la biopuce avec les extraits, un mélange des quatre 2'-désoxyribose nucléotides triphosphate est ajouté et parmi eux la 2'-désoxycytidine triphosphate (dCTP) est marquée au Cy3. Ainsi, lors de la resynthèse du brin contenant la lésion qui a préalablement été excisée, il y a incorporation de fluorescence. Celle-ci est mesurée à l'aide d'un scanner à 532 nm et est corrigée avec celle d'un plasmide témoin qui ne contient pas de dommages. Les résultats sont exprimés en fluorescence en fonction des différentes lésions.

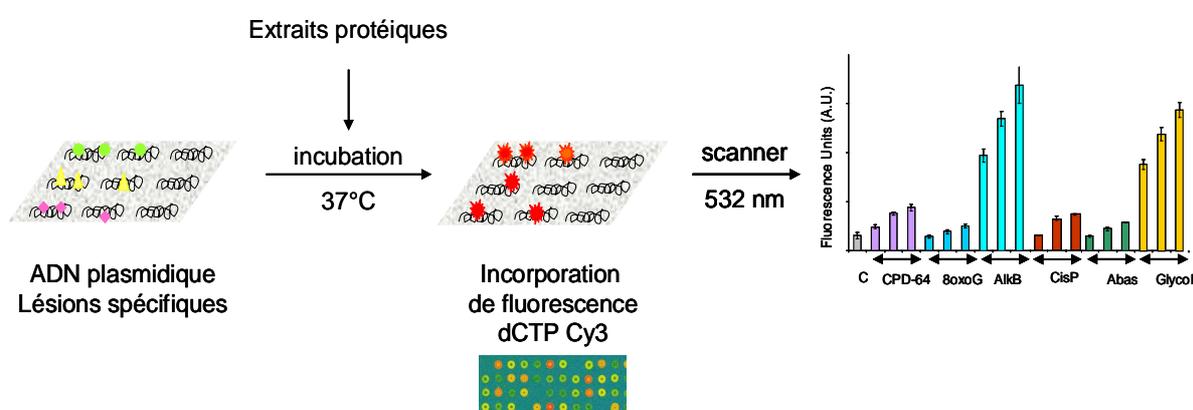


Schéma 51 : Principe de la mesure des activités de réparation avec la biopuce plasmide

2. Impact de l'ypérite sur la réparation globale de lésions prises en charge par le BER ou le NER

Dans le but d'étudier l'impact de l'ypérite sur la réparation globale (excision-resynthèse) de lésions prises en charge par le BER ou le NER, nous avons préalablement réalisé différents tests pour déterminer les conditions d'incubation des extraits protéiques totaux avec les biopuces plasmides. A l'issue de ces essais, nous avons retenu les conditions suivantes : incubation des protéines extraites à une concentration de 400 µg/mL pendant 2h avec les biopuces. Comme pour les résultats obtenus avec les biopuces oligonucléotidiques, des tests de comparaison multiples ont été réalisés dans le but d'évaluer l'effet de la concentration de traitement à l'ypérite sur les activités d'excision-resynthèse de chaque organe. Pour cela, les données de fluorescence obtenues ont été transformées en valeurs logarithmiques de base 10.

2.1. Effet de la concentration de l'ypérite sur les activités de réparation 4 h après exposition

Les activités de réparation basale (sans traitement) varient d'une lésion à l'autre pour un même organe. La réparation des dommages générés par le cisplatine est par exemple la plus faible pour tous les organes étudiés (Figure 32). Après exposition à l'ypérite, aucun effet de la concentration sur les activités de réparation n'a été relevé dans le cerveau ou dans les poumons.

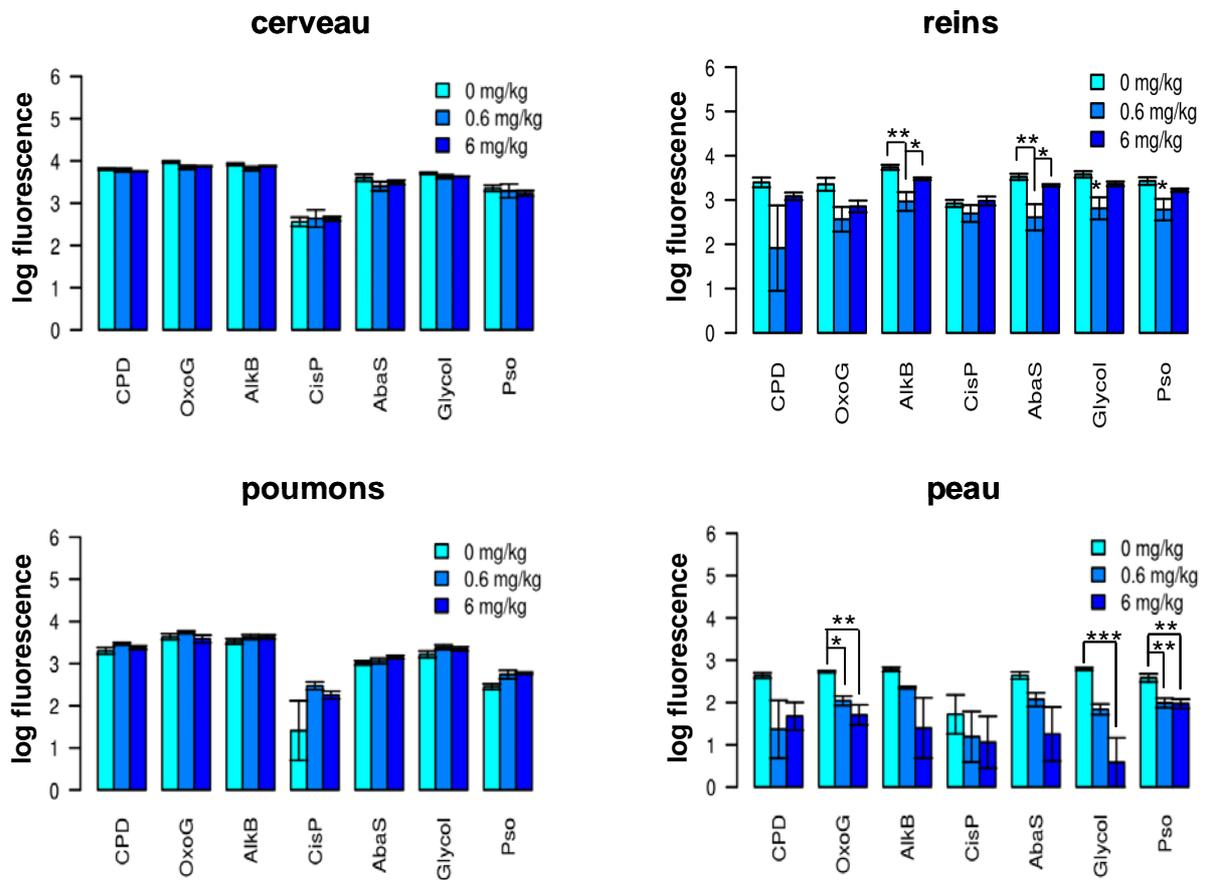


Figure 32 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités de réparation de plusieurs lésions 4 h post-exposition

Les souris SKH-1 ont été exposées à 0.6 et 6mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h à l'issue desquelles elles ont été sacrifiées. Peau traitée, cerveau, poumons et reins ont alors été prélevés et broyés le jour même pour en extraire les protéines. Elles ont ensuite été incubées à une concentration de 400 µg/mL pendant 2h à 37°C avec les biopuces plasmides. Les résultats représentent les activités d'excision-resynthèse des différentes lésions et sont exprimés en moyenne (n = 3) ± l'erreur standard. Niveaux de significativité : p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***).

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

En revanche et contrairement aux résultats obtenus pour les activités glycosylases, une modulation de la réparation de certaines lésions a été observée dans les reins. Ainsi, une diminution de la réparation des bases alkylées (-79%), des sites abasiques (-82%), des diols de thymines et de cytosines (-70%) ainsi que des lésions générées par le traitement psoralène-UVA (-78%) a été décelée. Pour toutes ces lésions, la baisse de la réparation a été visualisée entre les reins des souris témoins et ceux des souris traitées à 0.6 mg/kg. Entre les deux doses d'exposition, une augmentation de l'excision-resynthèse des bases alkylées (+162%) et des sites abasiques (+257%) a, en outre, été constatée. Dans la peau, la réparation des bases alkylées et des lésions induites par le traitement psoralène-UVA est également atténuée entre les peaux témoins et les peaux exposées. En plus de ces deux types de dommage, la baisse de la réparation de la 8-oxoguanine a été observée et ce de manière plus importante entre 0 et 6 mg/kg (-87%) qu'entre 0 et 0.6 mg/kg (-78%).

2.2. Effet de la concentration d'ypérite sur les activités de réparation 24 h après exposition

A l'instar des résultats obtenus 4 h post-traitement, les activités de réparation basale fluctuent en fonction des différentes lésions contenues dans la biopuce pour tous les organes étudiés (Figure 33). L'excision-resynthèse des lésions générées par le cisplatine reste la plus faible dans chacun d'entre eux. En outre, aucune influence de la concentration d'ypérite sur la réparation des différents dommages n'a été décelée dans les poumons.

Par opposition à l'absence d'effet de la dose de gaz moutarde sur les activités d'excision-resynthèse dans le cerveau à 4 h post-exposition, une diminution de celles de la 8-oxoguanine, des bases alkylées, des sites abasiques ainsi que des diols de cytosine et de thymine a été constatée au temps 24 h. Pour les trois premières, cette baisse concerne les cerveaux de souris exposées à 0.6 et 6 mg/kg. Entre l'absence de traitement et la dose 6 mg/kg, cette baisse est respectivement de 36, 33 et 79%. Pour les diols de cytosine et de thymine, la diminution de réparation n'est observée qu'entre 0 et 0.6 mg/kg (-35%).

Dans les reins, en plus des lésions pour lesquelles la réparation est modulée dans le cerveau, celle des lésions induites par le traitement psoralène-UVA est également diminuée (-73%). Par opposition, une augmentation de 150% de l'activité d'excision-resynthèse des lésions du cisplatine a été visualisée entre 0 et 6 mg/kg.

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

Dans la peau, on retrouve la baisse de réparation de la 8-oxoguanine (-84%) relevée dans le cerveau et les reins de même que celle des lésions générées par le traitement psoralène-UVA constatée dans les reins mais aussi à 4 h post-exposition.

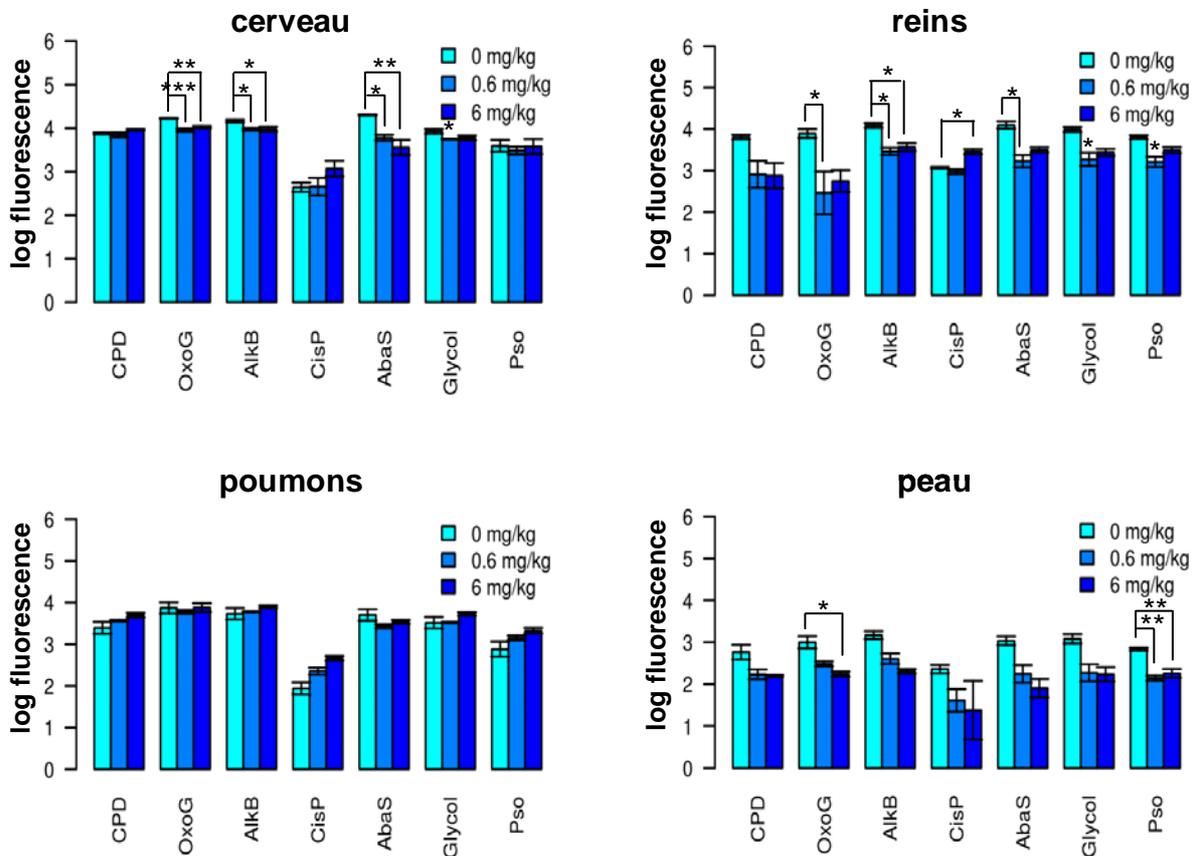


Figure 33 : Effet de la concentration d'ypérite sur les capacités de réparation de plusieurs lésions 24 h post-exposition

Les souris SKH-1 ont été exposées à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Elles ont été sacrifiées 24 h post-exposition. Peau traitée, cerveau, poumons et reins ont alors été prélevés et broyés le jour même pour en extraire les protéines. Elles ont ensuite été incubées à une concentration de 400 µg/mL pendant 2h à 37°C avec les biopuces plasmides. Les résultats représentent les activités d'excision-resynthèse des différentes lésions et sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

3. Corrélation entre les taux d'adduits et les activités de réparation du NER

Dans la mesure où il a été décrit *in vitro* que le NER était une voie de réparation importante dans la prise en charge des lésions de l'ypérite (Jowsey *et al.*, 2012; Matijasevic *et*

al., 2001; Matijasevic and Volkert, 2007), nous avons cherché s'il existait entre les différents organes étudiés (peau exposée, poumons, cerveau et reins) une corrélation reliant les taux d'adduits mesurés par HPLC-MS/MS et les activités de réparation des lésions prises en charge par le NER, à savoir celles générées par les UVC, le cisplatine et psoralène-UVA. Les études de corrélation ont été effectuées pour deux temps d'exposition, les temps 4 h (temps court considéré comme équivalent au temps 6 h auquel a été étudiée la formation des adduits de l'ypérite) et 24 h, et pour une seule dose de traitement commune aux deux études, à savoir la dose 6 mg/kg. Les échelles de variation entre les taux d'adduits et les activités de réparation ont été réduites dans le but de pouvoir les comparer. Pour cela, les taux d'adduits ont été transformés en $\log(1000x)$ où x représente le taux d'adduits et les activités de réparation en valeurs logarithmiques de base 10.

3.1. 4 h après exposition

Les études de corrélation réalisées à 4 h post-exposition sont représentées par la Figure 34. Chaque point représente un couple de valeurs {taux d'adduit-taux d'adduit, taux d'adduit-réparation ou réparation-réparation} pour un organe donné. La correspondance entre représentation graphique et coefficient de corrélation est symétrique. Par exemple, le graphique représentant la corrélation reliant, d'un organe à l'autre, le taux de HETE-N7Gua à l'activité d'excision-resynthèse des lésions générées par le cisplatine est situé à la 5^{ème} ligne et à la 1^{ère} colonne tandis que le coefficient de corrélation correspondant se trouve à la 1^{ère} ligne et à la 5^{ème} colonne (Figure 34).

Les résultats obtenus indiquent une corrélation positive qui relie les taux des différents adduits entre les organes. Cette association est plus forte entre les adduits formés au niveau de la position N7 de guanine, HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua. En effet le coefficient de corrélation obtenu entre les quatre organes étudiés est de 1. Pour ce qui est des activités de réparation, une corrélation positive est également mise en évidence pour les excision-resynthèse des lésions générées par le cisplatine et psoralène-UVA ($r = 0.98$).

S'agissant des corrélations associant taux d'adduits et activités de réparation entre organes, les études statistiques montrent une liaison négative entre les fréquences de l'adduit majoritaire et les activités d'excision-resynthèse des lésions CisP et Pso avec des coefficients de corrélation de -0.98 et -0.94, respectivement. Ainsi, plus la quantité de HETE-N7Gua est élevée et plus les activités de réparation de ces lésions est faible. De la même manière, entre

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

les différents organes, les taux de N7Gua-ETE-N7Gua sont anticorrélés de façon plus marquée avec l'activité d'excision-resynthèse de CisP qu'avec celle de Pso. Les coefficients de corrélation déterminés sont identiques à ceux obtenus pour HETE-N7Gua. En ce qui concerne HETE-N3Ade, une corrélation négative a été également obtenue avec l'activité de réparation de CisP ($r = -0.95$). Celle-ci est toutefois moins importante que celles observées pour HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua.



Figure 34 : Corrélation entre le taux d'adduits à 6 h post-exposition et les activités de réparation des lésions CPD, CisP et Pso à 4 h post-exposition

Les résultats représentent la moyenne du taux de chacun des adduits en fonction des différentes activités de réparation, chaque point représentant un couple de données pour un organe. Les coefficients de corrélation correspondant sont également indiqués. Niveau de significativité : $p < 0.1$ (°), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

3.2. 24 h après exposition

La corrélation positive associant les activités de réparation de CisP et Pso constatée 4 h post-exposition est également observée 24 h post-traitement (Figure 35). En revanche, celle entre les fréquences de HETE-N7Gua et HETE-N3Ade d'une part et celle entre N7Gua-ETE-N7Gua et HETE-N3Ade d'autre part ne le sont plus. Seule subsiste la corrélation positive entre les taux de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua qui est toutefois moins marquée qu'à 4 h ($r = 0.95$).

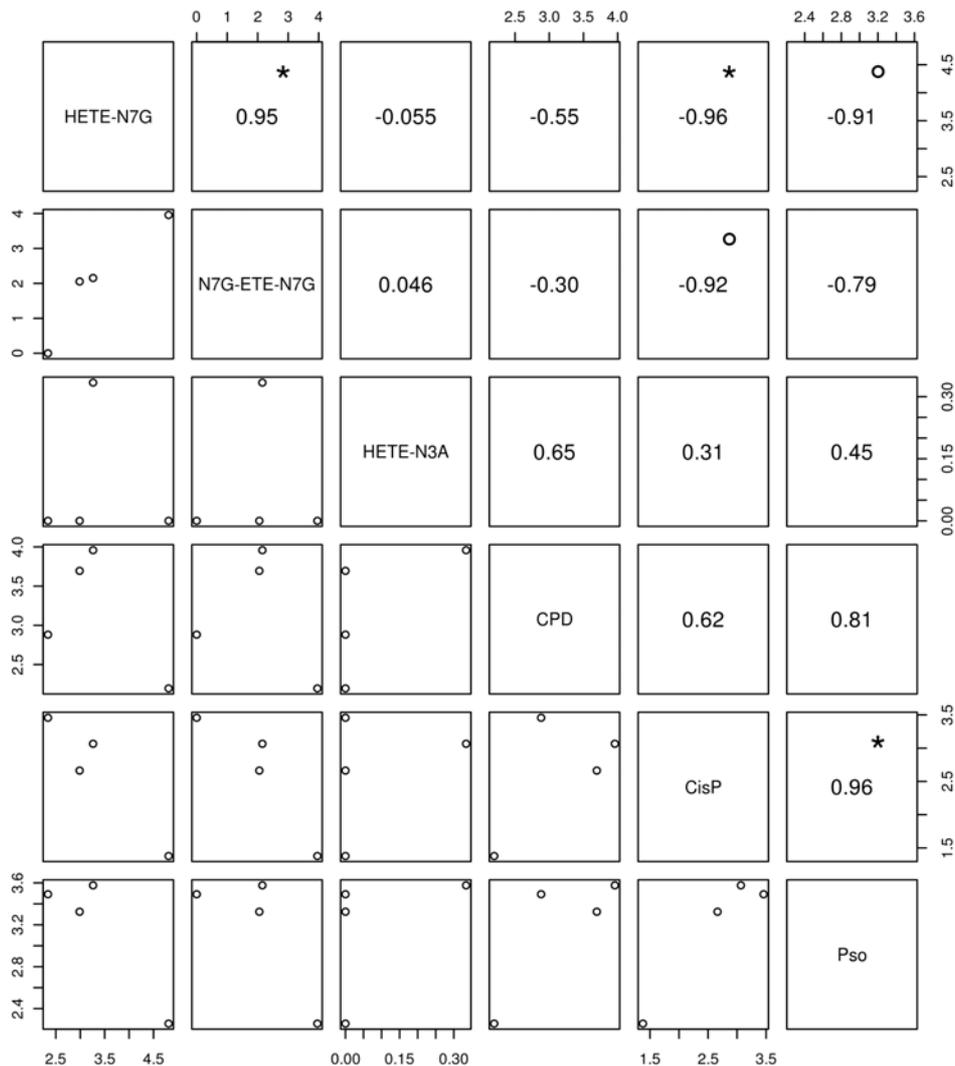


Figure 35 : Corrélation entre les taux d'adduits et les activités de réparation des lésions CPD, CisP et Pso à 24 h post-exposition

Les résultats représentent la moyenne du taux de chacun des adduits en fonction des différentes activités de réparation, chaque point représentant un couple de données pour un organe. Les coefficients de corrélation correspondant sont également indiqués. Niveau de significativité : $p < 0.1$ (°), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

Pour ce qui est des corrélations reliant quantités d'adduits et activités de réparation, l'association négative entre la fréquence de l'adduit majoritaire et l'activité d'excision-resynthèse de CisP obtenue à 4 h post-traitement est également décelée à 24 h post-exposition ($r = -0.96$). En revanche, celles associant cette même activité avec le taux de HETE-N3Ade ne l'est plus, de même que celle reliant la fréquence de N7Gua-ETE-N7Gua avec l'activité de réparation de Pso.

Les corrélations négatives entre organes reliant d'une part le taux de HETE-N7Gua avec l'activité d'excision-resynthèse de Pso et la fréquence de N7Gua-ETE-N7Gua avec celle de CisP sont, quant à elles, également significatives 24 h post-exposition mais de façon moins marquée qu'à 4 h post-traitement. Les coefficients de corrélation obtenus sont respectivement de -0.91 et -0.92.

IV. Conclusion

Après avoir caractérisé la génotoxicité de l'ypérite via la formation et la persistance des adduits qu'elle génère, nous avons cherché à déterminer l'impact de son exposition sur les activités de réparation. Celles-ci ont été mesurées à l'aide de deux types de biopuces, l'un permettant d'évaluer les activités d'excision de différents types de lésions prises en charge par le BER et l'autre permettant d'apprécier les activités de réparation globale (excision-resynthèse) de plusieurs dommages réparés par le BER ou le NER. Ces activités d'excision ou d'excision-resynthèse ont été mesurées dans la peau exposée, le cerveau, les poumons et les reins de 18 souris SKH-1 traitées à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite puis sacrifiées à 4 et 24 h post-exposition.

Les résultats obtenus ont montré qu'au niveau basal, les activités d'excision et d'excision-resynthèse diffèrent en fonction du type de lésions contenues dans les biopuces respectives pour un même organe. En outre, pour un type de dommage donné, des différences d'activités de réparation ont été observées entre organes. Ces résultats évoquent une différence d'expression des gènes codant pour les enzymes de réparation impliquées dans la prise en charge des lésions contenues dans les deux biopuces.

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

Les études statistiques réalisées ont révélé un effet significatif de la concentration de traitement, à 4 et 24 h, sur les activités d'excision de certaines glycosylases dans la peau traitée. En effet, l'excision de plusieurs dommages est diminuée aux deux temps étudiés. Parmi ces activités d'excision, on trouve notamment celle des sites abasiques mimés par le THF. Or, il est bien connu que les sites abasiques sont reconnus et excisés par APE1 (Hoeijmakers, 2001; Robertson *et al.*, 2009). Ainsi, la diminution du taux de coupure des sites abasiques observée à 4 h, où elle est dose-dépendante, et à 24 h post-exposition serait potentiellement due soit à une baisse de l'activité APE1 ou soit à son inhibition.

De manière plus générale, le nombre de lésions dont les activités d'excision dans la peau sont atténuées est plus important à 24 h qu'à 4 h, ce qui pourrait s'expliquer par une réponse cellulaire pour certaines activités plus lente que pour d'autres suite à l'exposition. Ce résultat pourrait aussi démontrer de façon indirecte la formation d'un réservoir d'ypérite à partir duquel elle impacterait négativement ces activités jusque 24 h post-exposition.

Concernant les organes internes, aucun effet de la concentration de gaz moutarde n'a été mis en évidence et ce quel que soit le temps post-exposition considéré.

Pour ce qui est des activités d'excision-resynthèse des dommages contenus dans la biopuce plasmide, les résultats ont montré, à l'instar de ceux obtenus dans la peau avec la biopuce oligonucléotidique, qu'elles étaient généralement diminuées aux deux temps étudiés après exposition des souris à l'ypérite. A 4 h post-exposition, ces diminutions ont été observées à la fois dans la peau exposée et dans les reins. Aucun effet dose sur la baisse d'activités de réparation n'a été observé dans la peau. De manière intéressante, dans les reins, une augmentation des activités d'excision-resynthèse des bases alkylées et des sites abasiques a été constatée entre les doses d'exposition 0.6 et 6 mg/kg alors qu'entre l'absence de traitement et la dose 0.6 mg/kg, elles sont atténuées. Globalement, à 24 h post-exposition, les mêmes activités de réparation qu'au temps 4 h sont diminuées dans la peau et les reins. En outre, certaines activités d'excision-resynthèse sont modulées dans le cerveau après 24 h post-exposition contrairement au temps 4 h. Comme pour la peau et les reins, elles baissent. Ces résultats appuient l'hypothèse de la constitution d'un réservoir d'ypérite en confirmant les résultats de l'évolution de la fréquence des adduits HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua qui augmente entre 6 h et 24 h post-exposition aux plus faibles doses étudiées. Pour certaines d'entre elles, cette baisse est dose-dépendante.

Aucun effet de la concentration de gaz moutarde n'a en revanche été décelé sur les activités de réparation dans les poumons aux deux temps étudiés.

Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation à l'ADN

Une corrélation entre organes pour la dose d'exposition 6 mg/kg associant fréquence d'adduits et activités de réparation du NER a été recherchée aux temps court (6 et 4 h respectivement) et au temps 24 h. Une corrélation négative reliant le taux de HETE-N7Gua et celui de N7Gua-ETE-N7Gua aux activités d'excision-resynthèse des lésions générées par le cisplatine et le psoralène a été obtenue pour les temps courts. Ces résultats confirmeraient de façon indirecte *in vivo* l'importance du NER dans la prise en charge des dommages à l'ADN induits par l'ypérite qui a été montrée *in vitro* (Jowsey *et al.*, 2012; Matijasevic *et al.*, 2001; Matijasevic and Volkert, 2007) dans la mesure où lorsque le taux d'adduits est élevé, les activités de réparation étudiées sont faibles. Pour le temps 24 h, cette corrélation, lorsqu'elle est encore significative, est généralement moins marquée qu'à 4 h post-exposition.

Pour résumé, l'ypérite, en plus d'endommager l'ADN, possède un impact globalement néfaste sur les activités glycosylases du BER et les activités d'excision-resynthèse du BER et du NER qu'elle module, ce qui potentialise sa génotoxicité.

Chapitre 6: Vers de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite

I. Introduction

Parallèlement à la caractérisation de la génotoxicité de l'ypérite via l'étude de la formation et de la persistance des adduits (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua) qu'elle forme, nous avons cherché à mettre au point des méthodes de détection quantitative par HPLC-MS/MS de nouveaux biomarqueurs d'exposition. Dans le cadre de ces travaux, nous avons identifié un nouvel adduit à l'ADN, formé après conjugaison de l'ypérite au GSH, et mis au point son dosage. Nous nous sommes également intéressés à des biomarqueurs autres que ceux formés au niveau de l'ADN et nous avons mis au point une méthode de détection quantitative des conjugués formés par l'analogue du gaz moutarde, le CEES, avec le glutathion, la N-acétylcystéine et la cystéine.

Les résultats présentés ci-après regroupent des données préliminaires de détection de ces biomarqueurs dans différents échantillons biologiques. Une partie d'entre eux a été obtenue sur cultures cellulaires, ce qui nous a permis d'étudier des modèles humains.

II. Caractérisation d'un nouvel adduit à l'ADN formé par l'ypérite

Se basant sur les travaux illustrant la formation par le 1,2-dibromoéthane d'un adduit en position N7 de guanine suite à sa conjugaison avec le GSH (Inskeep and Guengerich, 1984; Inskeep *et al.*, 1986; Koga *et al.*, 1986; Ozawa and Guengerich, 1983), nous avons mis en évidence la formation par l'ypérite d'un adduit similaire. Afin de mettre au point une méthode de détection quantitative de cet adduit, nous avons procédé de la même manière que pour les autres dommages à l'ADN générés par le gaz moutarde (voir p.129).

1. Synthèse et caractérisation HPLC-MS/MS de l'adduit formé par le conjugué ypérite-GSH

Afin de synthétiser l'adduit à l'ADN formé par le conjugué ypérite-GSH, nous avons fait réagir une solution d'ADN de thymus de veau (1 mg/mL) et de GSH (200 mM) dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) avec de l'ypérite (100 mM) pendant 4 h à température ambiante. A l'issue des 4 h de réaction, l'ADN a été précipité par ajout d'éthanol absolu et de

NaCl. Plusieurs lavages à l'éthanol 70% (v/v) ont été effectués dans le but d'éliminer d'éventuelles traces d'ypérite. L'ADN a alors été resuspendu dans de l'eau ultrapure avant d'être hydrolysé. Une digestion enzymatique a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment décrites (voir p.126) pour caractériser l'adduit sous forme de 2'-désoxyribonucléoside modifié. Pour déterminer les fragments fils majoritaires de ce dernier, le mode « ion product » du système triple quadripolaire a été utilisé. Aucun pic correspondant au rapport m/z (661) de la forme 2'-désoxyribonucléoside modifiée n'a été détecté. En revanche, un pic correspondant au rapport m/z (545) de l'adduit sous forme de base modifiée a été obtenu. Ce résultat illustre la grande instabilité de la forme 2'-désoxyribonucléoside modifiée et donc que la position ciblée au niveau de la guanine est vraisemblablement l'atome N7. Le groupement thiol du GSH étant le plus nucléophile, la structure la plus probable de l'adduit est donc le N7-gluthationyl-hydroxyéthylthioéthyl-guanine (GSH-HETE-N7Gua). L'étude de la fragmentation de GSH-HETE-N7Gua montre que le fragment majoritaire généré dans la cellule de collision correspond à la perte d'un fragment de la molécule de GSH, l'ion fils détecté ayant un rapport m/z de 416 (Figure 36).

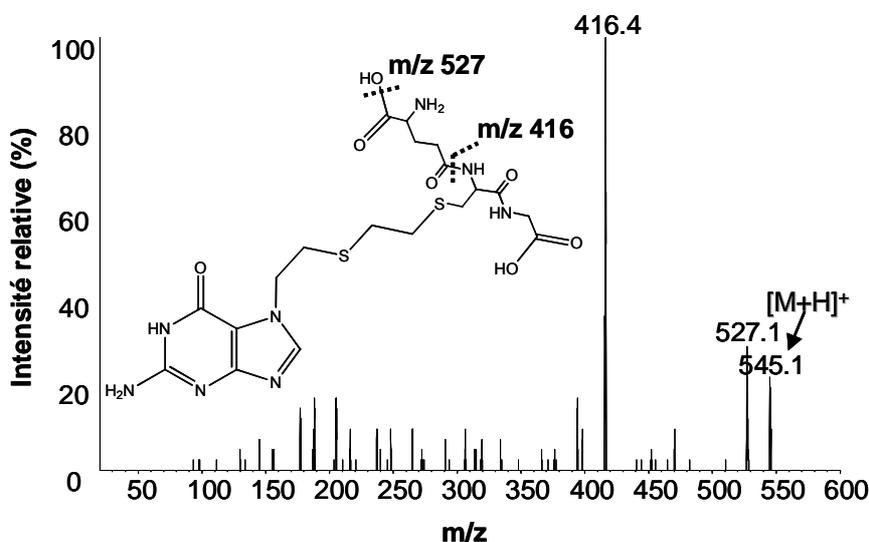


Figure 36 : Spectre de masse de l'adduit GSH-HETE-N7Gua

Nous avons ensuite préparé une solution calibrée de GSH-HETE-N7Gua à partir de la solution d'ADN et de GSH traitée à l'ypérite. Nous avons comme pour les autres adduits ajouter une étape d'hydrolyse thermique neutre (20 min à 90°C) à la digestion enzymatique. L'adduit a alors été purifié par un système HPLC-collecteur avant d'être calibré en UV (Figure 37).

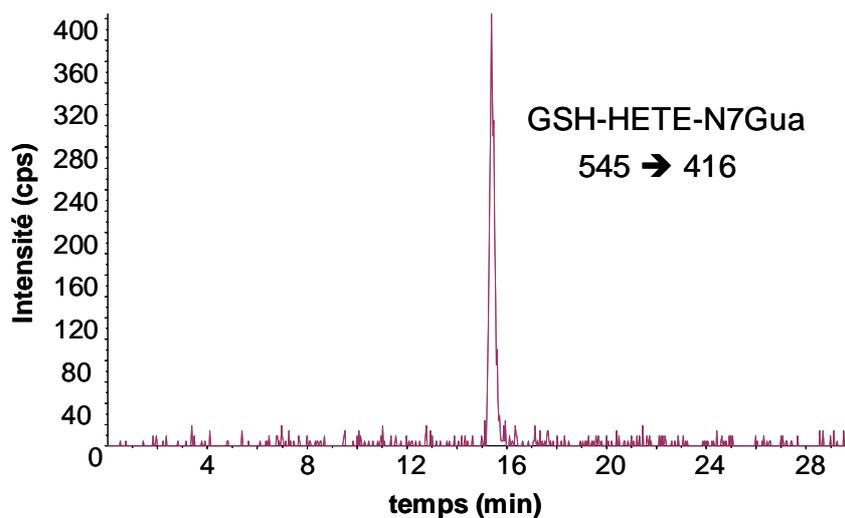


Figure 37 : Chromatogramme obtenu après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole de GSH-HETE-N7Gua

2. Quantification de l'adduit GSH-HETE-N7Gua *in vitro* et *in vivo*

Une fois la méthode de détection quantitative de l'adduit GSH-HETE-N7Gua au point, nous l'avons appliquée à des monocytes THP1 exposés à des concentrations croissantes d'ypérite. Des mesures ont aussi été effectuées dans l'ADN de quelques organes prélevés lors de l'étude de la formation et de la persistance des dommages à l'ADN générés par l'ypérite.

2.1. Quantification *in vitro*

La quantification de l'adduit GSH-HETE-N7Gua a été effectuée après traitement de monocytes THP1 par 10, 20, 50 ou 100 μM d'ypérite (Figure 38). Les résultats obtenus montrent une dose-réponse de la quantité de GSH-HETE-N7Gua avec une fréquence qui augmente de 6.8 ± 0.9 à $76 \pm 3/10^6$ nucléosides entre les doses 10 et 100 μM . Pour les traitements à 10, 20 et 50 μM d'ypérite, le taux de GSH-HETE-N7Gua est sensiblement identique à celui de N7Gua-ETE-N7Gua déterminé précédemment dans le même modèle cellulaire (voir p.147). En revanche, pour la concentration de traitement 100 μM , la quantité de GSH-HETE-N7Gua est plus élevée (76 ± 3 GSH-HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides contre 41 ± 10 N7Gua-ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides). Ce résultat s'explique par l'absence de saturation du taux de GSH-HETE-N7Gua qui avait été observé pour N7Gua-ETE-N7Gua.

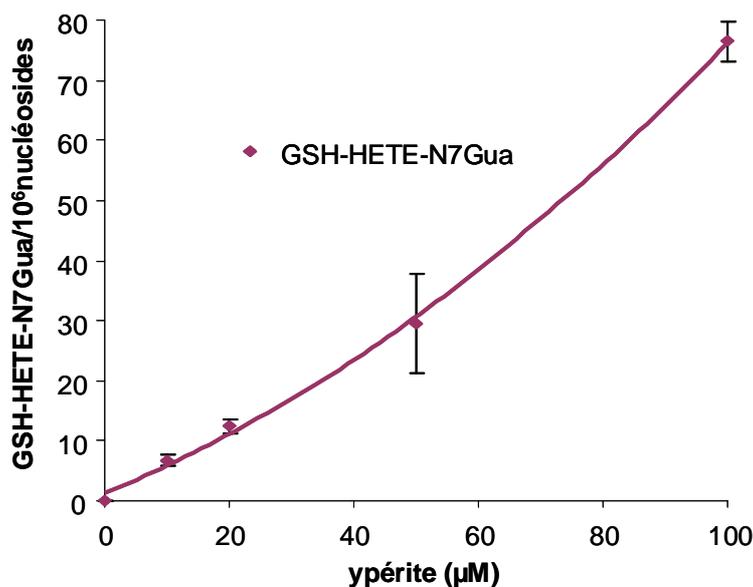


Figure 38 : Quantification de l'adduit GSH-HETE-N7Gua dans les monocytes THP1

Des monocytes THP1 (20×10^6 cellules) ont été traités à 10, 20, 50 ou 100 μM d'ypérite dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. Plusieurs lavages au PBS ont été effectués pour éliminer d'éventuelles traces d'ypérite. L'ADN a ensuite été extrait et hydrolysé avant d'être analysé en HPLC-MS/MS. La transition suivie pour la détection de GSH-HETE-N7Gua est $545 \rightarrow 416$. Les résultats ont été normalisés par rapport à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

2.2. Quantification *in vivo*

L'adduit GSH-HETE-N7Gua a été quantifié dans l'ADN de plusieurs organes (peau exposée, poumons, cerveau, reins et rate) de souris SKH-1 exposées à 60 mg/kg d'ypérite.

2.2.1. Formation

La fréquence de GSH-HETE-N7Gua est, comme celles de HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua, maximale dans chacun des organes étudiés à 6 h post-exposition (Figure 39). Elle est de $90 \pm 15 / 10^6$ nucléosides dans la peau traitée. Dans les organes internes étudiés, la quantité de GSH-HETE-N7Gua est la plus importante dans le cerveau avec $3.4 \pm 0.5 / 10^6$ nucléosides. Bien qu'inférieure dans les poumons (2.7 ± 0.6 GSH-HETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides), le taux de cet adduit n'est pas significativement différent de celui mesuré dans le cerveau. Dans les reins et la rate, la fréquence de GSH-HETE-N7Gua est plus faible avec respectivement $1.6 \pm$ et $1.0 \pm 0.3 / 10^6$ nucléosides. Le dosage de l'adduit GSH-

HETE-N7Gua dans un petit nombre d'échantillons d'ADN extrait de foie semble indiquer, à l'instar des résultats obtenus pour les autres adduits de l'ypérite, que c'est l'organe où il s'en forme le moins.

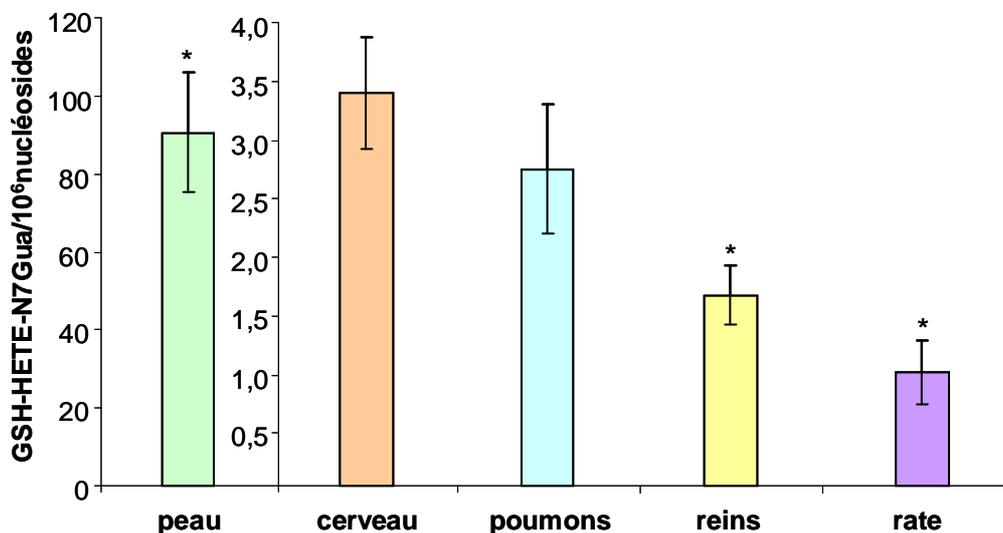


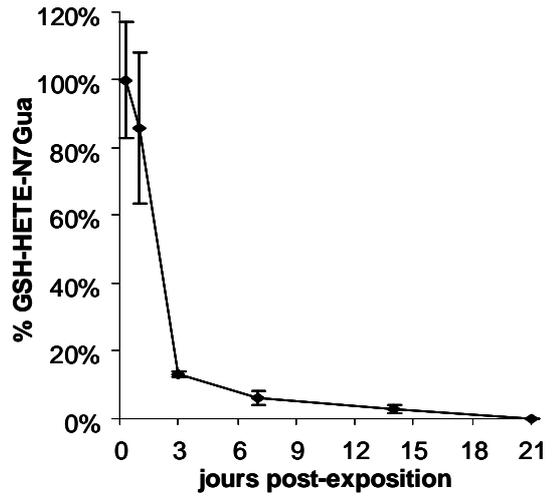
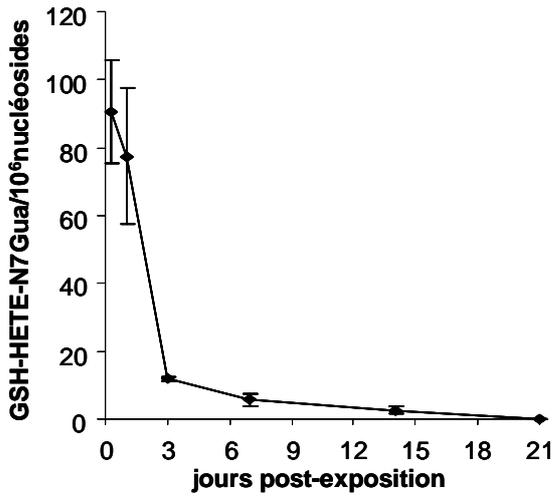
Figure 39 : Formation de GSH-HETE-N7Gua dans différents organes internes après une exposition cutanée liquide

Les souris SKH-1 ont été exposées à 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures post-exposition les souris ont été sacrifiées. La peau exposée a été biopsiée et le cerveau, les poumons, les reins et la rate ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence de GSH-HETE-N7Gua normalisée à un million de nucléosides normaux et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard. Niveaux de significativité : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) (comparaison des fréquences de GSH-HETE-N7Gua obtenues dans le cerveau à celles des autres organes).

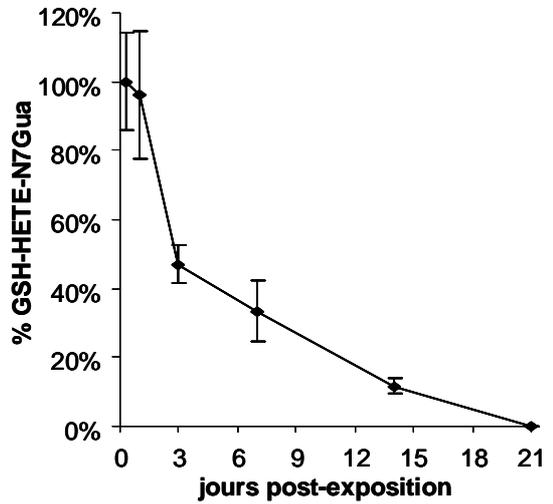
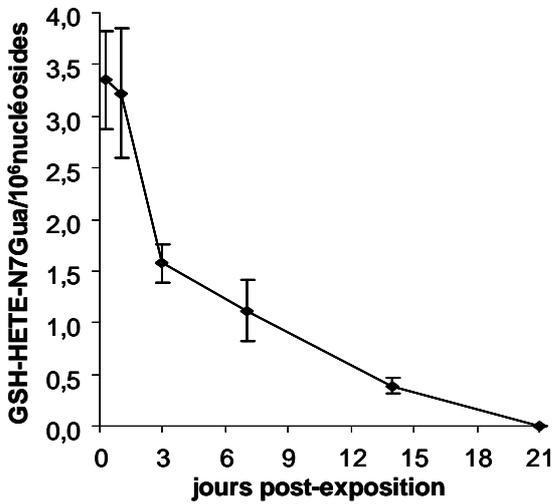
2.2.2. Persistance

La persistance de l'adduit GSH-HETE-N7Gua a été évaluée pendant 21 jours après l'exposition à 60 mg/kg d'ypérite (Figure 40). Aucune différence significative n'a été obtenue pour chacun des organes étudiés entre les fréquences mesurées à 6 h et à J1 post-exposition. En revanche, à partir de J1, la quantité de GSH-HETE-N7Gua diminue de manière globalement significative entre chacun des temps étudiés. Cet adduit est détectable jusque J14 dans la peau exposée, le cerveau et les poumons avec respectivement 2.6 ± 1.1 , 0.4 ± 0.1 et 0.4 ± 0.1 GSH-HETE-N7Gua/10⁶ nucléosides. Dans les reins, il est détecté jusque J7 (0.4 ± 0.1 GSH-HETE-N7Gua/10⁶ nucléosides) tandis que dans la rate il n'a pu être décelé que pour le temps 6 h.

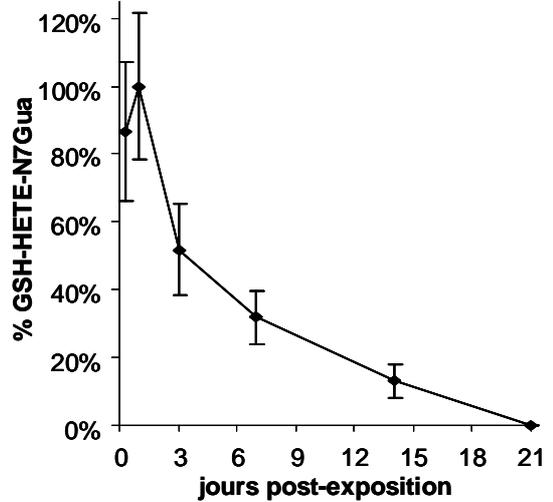
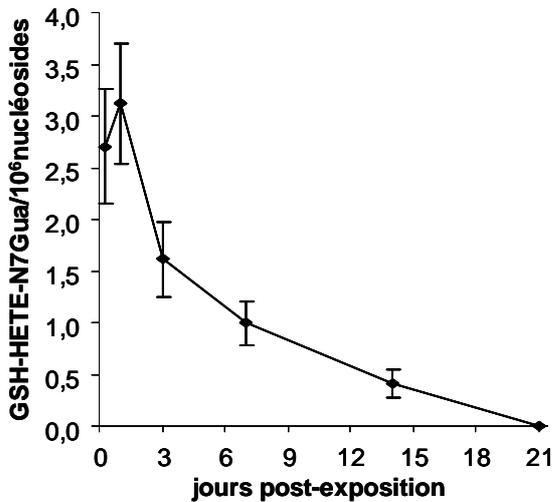
peau



cerveau



poumons



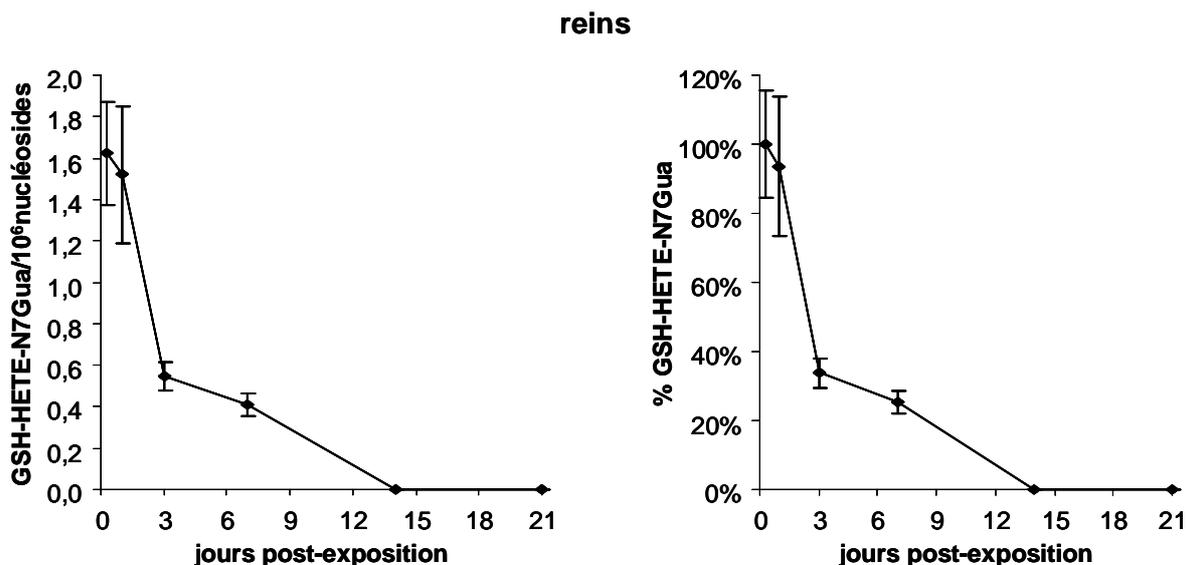


Figure 40 : Persistence de GSH-HETE-N7Gua au cours du temps dans différents organes internes

Les souris SKH-1 ont été exposées à 60 mg/kg d'ypérite sur le dos pendant 4 h. Six heures, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition, les souris ont été sacrifiées. Peau exposée, cerveau, poumons, reins et rate ont été prélevés. L'ADN en a été extrait, hydrolysé et analysé en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence de GSH-HETE-N7Gua normalisée à un million de nucléosides normaux (gauche) ou en pourcentage (droite) et sont exprimés en moyenne ($n = 5$ ou 6) \pm l'erreur standard.

En considérant, comme précédemment, que la cinétique d'élimination était d'ordre 1, nous avons déterminé le temps de demi-vie de GSH-HETE-N7Gua dans les différents organes étudiés. Il est le plus important dans le cerveau et les poumons avec respectivement 4.3 ± 0.3 et 4.4 ± 0.4 jours. Dans la peau exposée, le temps de demi-vie de GSH-HETE-N7Gua est le plus faible avec 2.5 ± 0.2 jours. Ces résultats expliquent pourquoi, bien que la formation de GSH-HETE-N7Gua soit beaucoup moins importante dans le cerveau et les poumons que dans la peau exposée, cet adduit y soit tout de même détecté jusque J14. Dans les reins, le temps de demi-vie de l'adduit formé par le conjugué ypérite-GSH est de 3.4 ± 0.2 jours.

III. Mise au point d'une méthode de quantification des conjugués formés par le CEES avec le glutathion, la N-acétylcystéine et la cystéine

Dans le but de nous rapprocher de modèles humains, nous avons effectué des études cellulaires avec des kératinocytes primaires humains issus d'explants mammaires et des

cellules A549 (lignée cancéreuse de cellules épithéliales alvéolaires). L'intérêt des cellules en culture réside dans le grand nombre de conditions pouvant être testées. Dans la mesure où il n'était pas possible d'effectuer ces études avec l'ypérite, nous nous sommes tournés vers son analogue monofonctionnel, le CEES, qui est largement utilisé dans la littérature. Nous nous sommes ainsi intéressés à la cinétique de formation des adduits à l'ADN du CEES pour lesquels nous avons étendu la mise au point de la méthode de détection quantitative par HPLC-MS/MS des adduits de l'ypérite (voir p.139). Nous avons également étudié l'effet de la dose de traitement sur cette formation ainsi que leur cinétique d'élimination.

A l'instar du gaz moutarde, le CEES est capable d'alkyler d'autres molécules que l'ADN comme le GSH qui se trouve en majeure partie dans le cytoplasme des cellules. Nous avons donc développé une méthode de quantification, toujours par HPLC-MS/MS, du conjugué qu'il forme avec le CEES ainsi que des produits de sa métabolisation, à savoir les conjugués avec la N-acétylcystéine et la cystéine. Ces différents conjugués ont été dosés, en plus des adduits, dans le cytoplasme des mêmes cellules (Schéma 52).

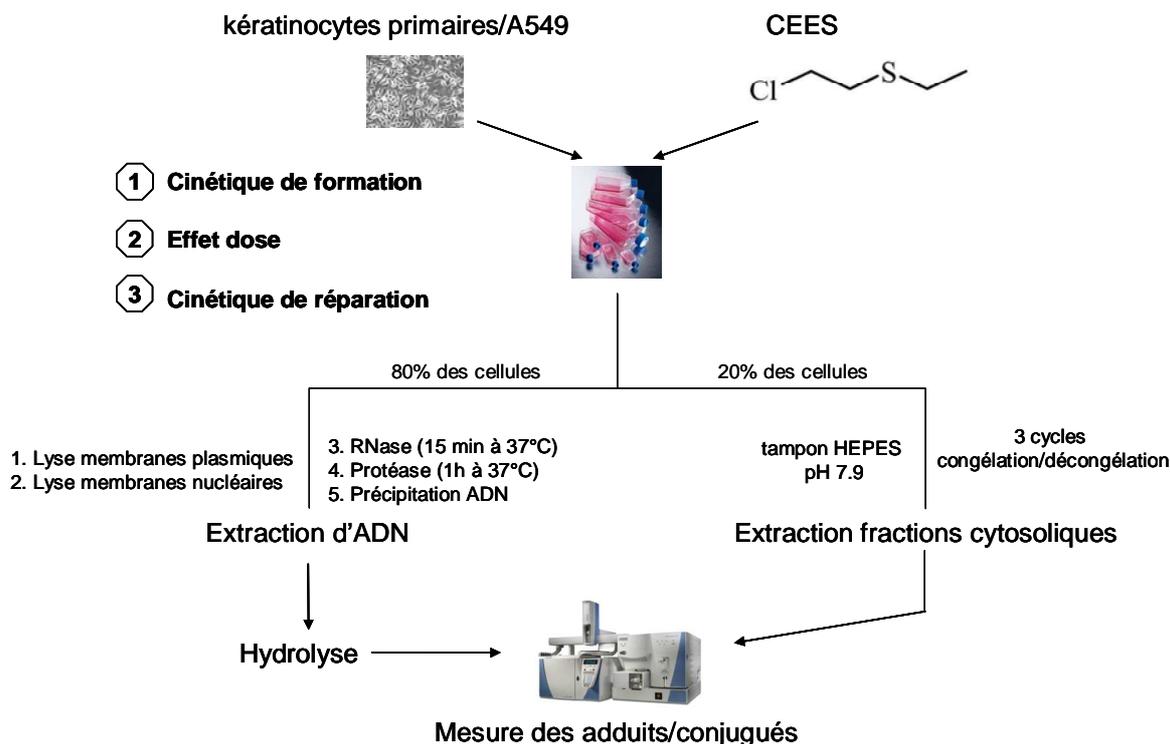


Schéma 52 : Mode opératoire pour le dosage des adduits et des conjugués du CEES dans les kératinocytes primaires et les cellules A549

Pour ce faire, une fois les traitements effectués et les cellules récoltées, deux types de lyse ont été effectués. La plus grande partie des cellules (80%), réservée pour la quantification des

adduits, a été lysée dans les mêmes conditions que décrites précédemment (voir p.147). Les 20% de cellules restantes ont été lysées par 3 cycles successifs de congélation-décongélation (azote liquide/température ambiante) pour récupérer la fraction cytosolique et doser les conjugués.

1. Mise au point d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS des conjugués du CEES avec le glutathion, la N-acétylcystéine et la cystéine

Afin de mettre au point une méthode de détection quantitative des conjugués formés par le CEES avec le glutathion (GSH-CEES), la N-acétylcystéine (Nac-CEES) et la cystéine (Cys-CEES), nous avons procédé de la même façon que pour les autres méthodes précédemment décrites.

Nous avons tout d'abord synthétisé les conjugués en faisant réagir une solution de GSH (284 mM), de N-acétylcystéine (284 mM) ou de cystéine (284 mM) dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) avec 142 mM de CEES pendant 4 h à température ambiante. A la fin des 4 h, les conjugués ont été soustraits du milieu réactionnel par une extraction au dichlorométhane. Celle-ci a été répétée à plusieurs reprises afin d'éliminer d'éventuelles traces de CEES.

Une fois la synthèse achevée, nous avons caractérisé les conjugués en HPLC-MS/MS. L'étude de la fragmentation de ces derniers montre que l'ion fils majoritaire généré dans la cellule de collision pour chacun d'entre eux correspond à la partie réactive du CEES ($m/z = 89$) (Figure 41 pour GSH-CEES).

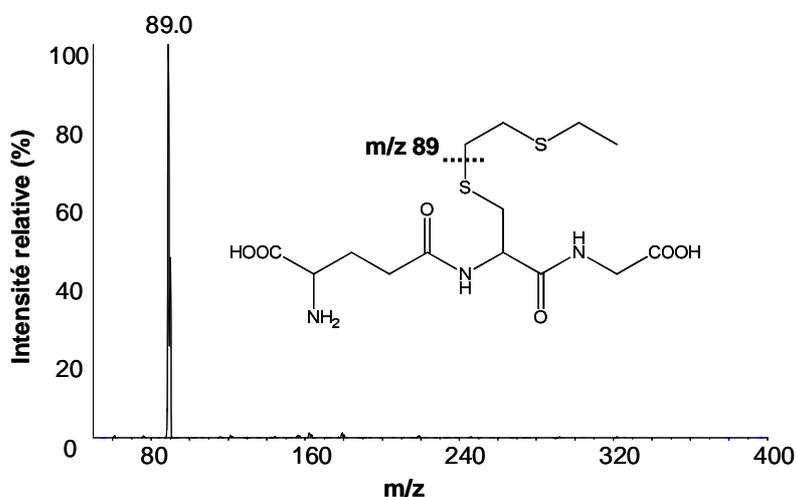


Figure 41 : Spectre de masse du conjugué GSH-CEES

Nous avons ensuite préparé des solutions calibrées de chacun des conjugués. Pour cela, nous avons purifié par HPLC-collection les produits de la synthèse précédemment effectuée et les concentrations des conjugués ont été déterminées après une calibration UV (Figure 42).

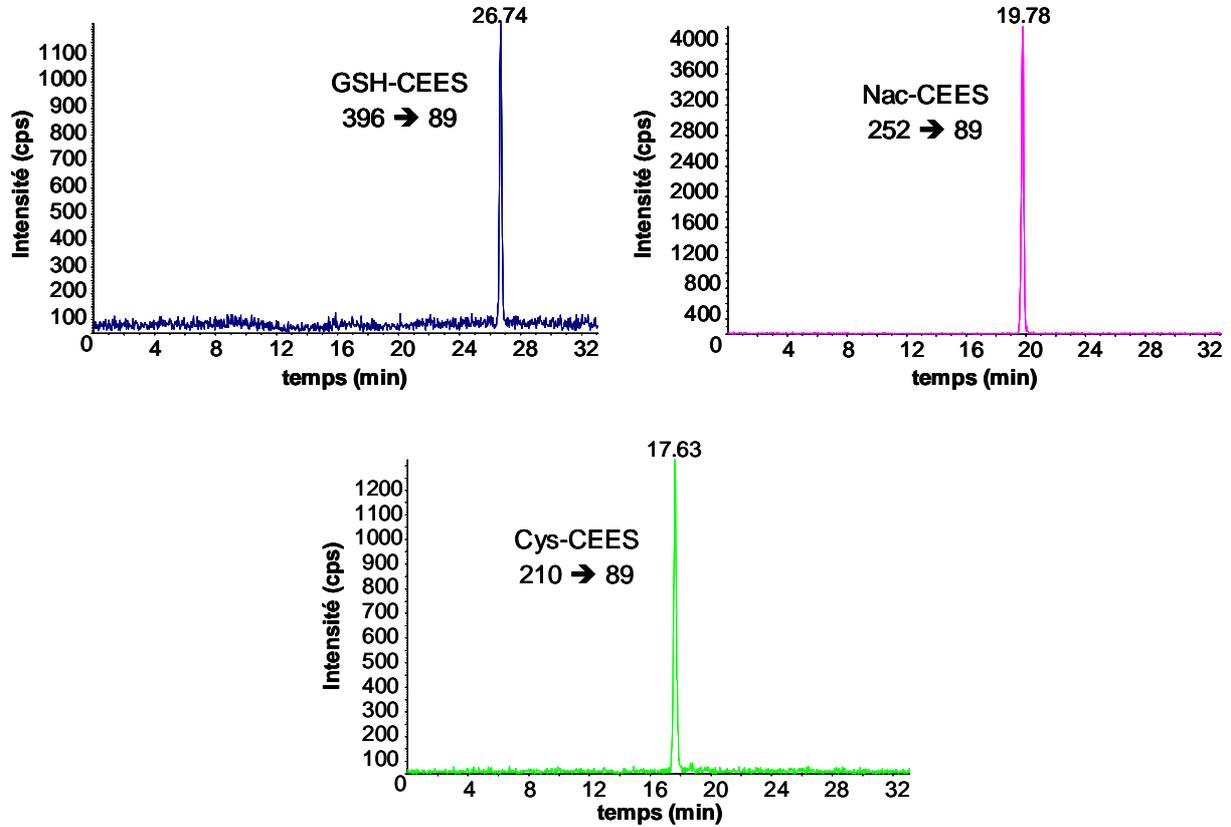


Figure 42 : Chromatogrammes obtenus après injection en HPLC-MS/MS d'une picomole des conjugués GSH-CEES, Nac-CEES et Cys-CEES

Une fois la méthode mise au point, nous avons quantifié les adduits et les conjugués du CEES dans les kératinocytes primaires et les cellules A549.

2. Quantification des adduits et des conjugués formés par le CEES dans des kératinocytes primaires

2.1. Evaluation de la cytotoxicité du CEES

La cytotoxicité du CEES a été évaluée par une mesure de la viabilité cellulaire en utilisant le test au MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium). Le MTT, ou sel de tétrazolium, est transformé par la succinate déshydrogénase des cellules vivantes (enzyme mitochondriale) en un précipité de couleur violette, le formazan. Celui-ci, dont la quantité formée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes, est resolubilisé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et la viabilité est déterminée par spectrophotométrie à 540 nm.

Pour étudier la cytotoxicité de l'analogue monofonctionnel de l'ypérite, les kératinocytes primaires de trois donneurs ont été exposés à une gamme de concentration allant de 0.1 à 10 mM de CEES (Figure 43). Les résultats obtenus montrent que la survie des kératinocytes est globalement identique quel que soit le donneur considéré. Aucune différence de survie n'a été observée suite à une exposition à 0.1 ou 0.2 mM de CEES. En revanche, à partir du traitement 0.5 mM, la survie des kératinocytes diminue pour s'établir à environ 80% de la valeur contrôle. Pour un traitement à une concentration 10 fois plus élevée (5 mM), la survie (20%) est en moyenne inférieure d'un facteur 3.8.

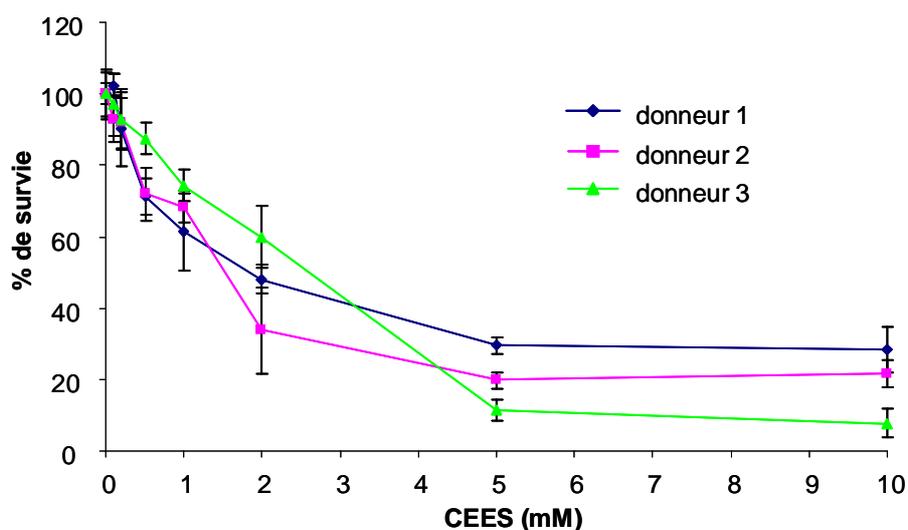


Figure 43 : Evaluation de la survie des kératinocytes primaires de trois donneurs après une exposition au CEES

Pour les différentes études présentées ci-après, nous avons exposés les kératinocytes primaires à des concentrations de CEES non cytotoxiques.

2.2. Cinétique de formation

Afin d'étudier la cinétique de formation des adduits et des conjugués formés par le CEES, nous avons traité les kératinocytes primaires issus d'explants mammaires à 20 μM de CEES dans le milieu de culture à 37°C pendant 5 à 480 min (Figure 44). Le taux de ETE-N7Gua formé est maximal dès le temps le plus court d'exposition, *i.e* 5 min, avec $10.2 \pm 1.2/10^6$ nucléosides. Au-delà du temps de traitement 20 min, la fréquence de ETE-N7Gua mesurée diminue. Au bout de 8h de traitement, elle est de 5.1 ± 0.4 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides, soit deux fois moins élevée que celle déterminée après 5 min d'exposition. La quantité de ETE-N3Ade est de $0.04 \pm 0.01/10^6$ nucléosides après 5 min de traitement et reste constante pour chacun des temps étudiés.

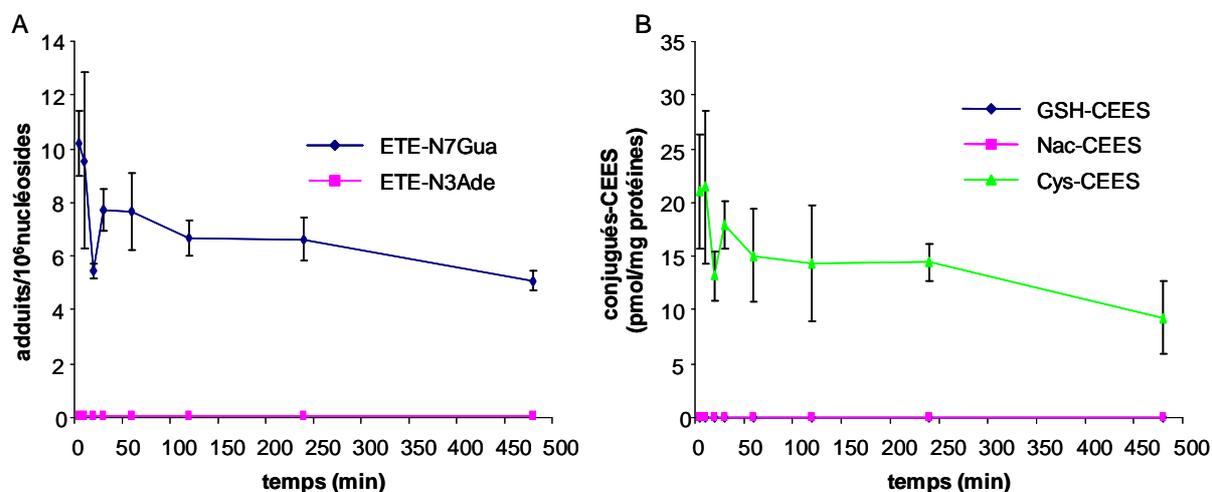


Figure 44 : Cinétique de formation des adduits et des conjugués du CEES dans des kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires d'un seul donneur ont été exposés à 20 μM de CEES dans le milieu de culture (37°C) pendant plusieurs temps (5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 et 480 min). Les cellules ont alors été lysées et l'ADN ainsi que la fraction cytosolique ont été extraits. L'ADN a ensuite été hydrolysé puis analysé, de même que la fraction cytosolique, en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits (A) normalisée à un million de nucléosides normaux ainsi que celle des conjugués (B) normalisée à la quantité de protéines extraites. Ils sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

Concernant les conjugués du CEES, seul celui formé avec la cystéine a été détecté. Comme pour l'adduit majoritaire, la quantité de Cys-CEES est maximale dès 5 min d'exposition (21 ± 5 pmol/mg de protéines). En revanche, ce taux est relativement constant jusqu'à 240 min de traitement. Il diminue après 8h d'exposition pour s'établir à près de la moitié de celui mesuré au temps 5 min (9.3 ± 3.4 pmol/mg de protéines).

2.3. Effet dose

L'effet de la dose d'exposition sur la formation des adduits et des conjugués a été étudié en exposant les kératinocytes primaires dans le milieu de culture pendant 1 h à des doses de CEES variant de 0.1 à 20 μM (Figure 45). Dès la plus faible dose de traitement, l'adduit ETE-N7Gua a été décelé avec une fréquence de $0.2 \pm 0.0/10^6$ nucléosides. Celle-ci augmente de manière dose-dépendante avec une quantité maximale obtenue (7.0 ± 1.3 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides) pour la dose d'exposition la plus élevée, *i.e.*, 20 μM .

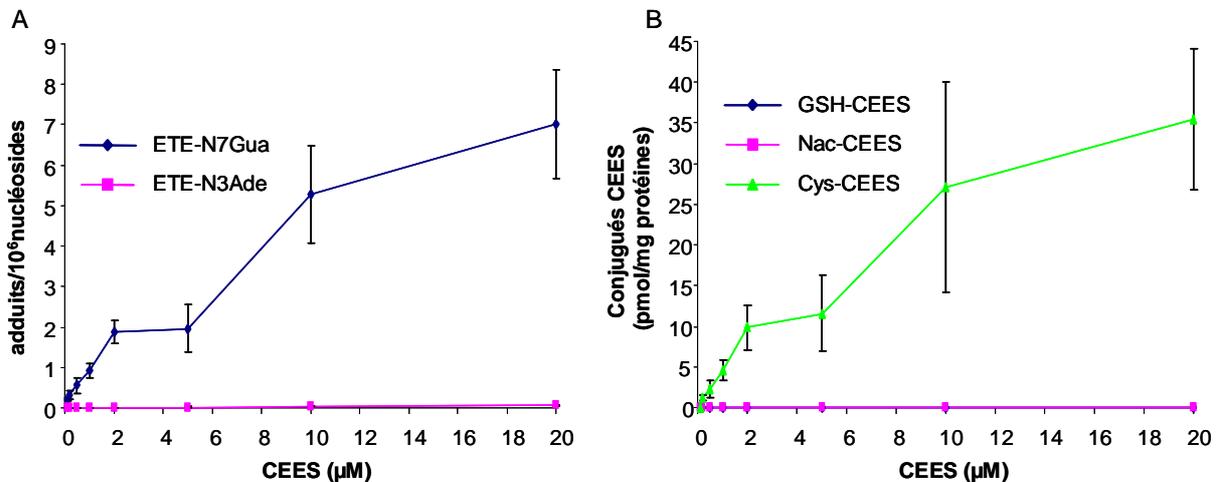


Figure 45 : Effet de la dose de traitement sur la formation des adduits et des conjugués du CEES dans des kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires d'un seul donneur ont été exposés pendant 1 h dans le milieu de culture (37°C) à différentes doses (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 et 20 μM). Les cellules ont alors été lysées et l'ADN ainsi que la fraction cytosolique ont été extraits. L'ADN a ensuite été hydrolysé puis analysé, de même que la fraction cytosolique, en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits (A) normalisée à un million de nucléosides normaux ainsi que celle des conjugués (B) normalisée à la quantité de protéines extraites. Ils sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

Pour cette dernière, la quantité de ETE-N3Ade est également la plus importante ($0.1 \pm 0.0 / 10^6$ nucléosides). ETE-N3Ade a été détecté à partir de la dose d'exposition $1 \mu\text{M}$ avec un taux de 0.01 ± 0.00 ETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides.

A l'instar des résultats obtenus pour la cinétique de formation, seul le conjugué Cys-CEES a été décelé et ce dès la dose $0.2 \mu\text{M}$ (1.3 ± 0.3 pmol/mg de protéines). Comme pour ETE-N7Gua, une dose-réponse de la quantité de Cys-CEES a été observée avec un taux maximal pour la dose $20 \mu\text{M}$ (36 ± 9 pmol/mg de protéines).

2.4. Cinétique de réparation

La cinétique de réparation de l'adduit HETE-N7Gua et du conjugué Cys-CEES a été évaluée dans les kératinocytes primaires durant 48h, les cellules ayant été exposées à 5 ou 20 μM de CEES dans le milieu de culture pendant 1 h (Figure 46).

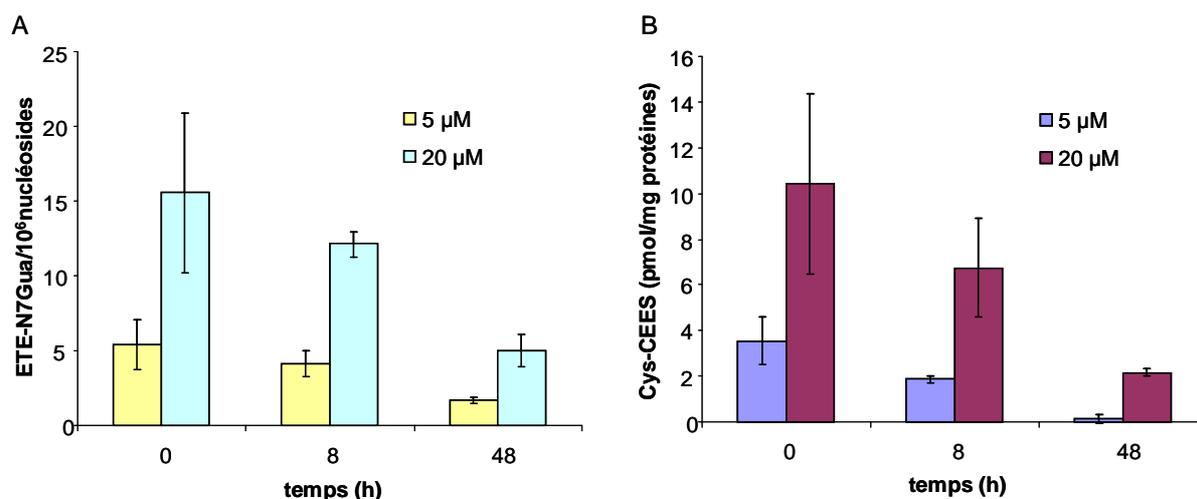


Figure 46 : Cinétique de réparation des adduits et des conjugués du CEES dans des kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires d'un seul donneur ont été exposés pendant 1 h dans le milieu de culture (37°C) à 5 et $20 \mu\text{M}$ de CEES. Immédiatement, 8 et 24 h après exposition, les cellules ont été récoltées et lysées. L'ADN ainsi que la fraction cytosolique ont été extraits. L'ADN a ensuite été hydrolysé puis analysé, de même que la fraction cytosolique, en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence de ETE-N7Gua (A) normalisée à un million de nucléosides normaux ainsi que celle de Cys-CEES (B) normalisée à la quantité de protéines extraites. Ils sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

Les résultats obtenus montrent une diminution continue de la quantité de HETE-N7Gua et de Cys-CEES en fonction du temps pour les deux doses de traitement. Pour la dose 20 μ M, HETE-N7Gua et Cys-CEES sont toujours détectables 48h post-exposition avec des fréquences respectives de $5.0 \pm 1.1/10^6$ nucléosides et de 2.1 ± 0.2 pmol/mg de protéines.

3. Quantification des adduits et des conjugués formés par le CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires

3.1. Evaluation de la cytotoxicité du CEES

Dans le but d'évaluer la cytotoxicité du CEES dans les cellules A549, nous avons effectué un test au MTT après avoir exposé ces dernières à des concentrations allant de 0.1 à 10 mM (Figure 47). Dans l'ensemble, la survie des cellules A549 est identique à celle des kératinocytes primaires. En effet, aucune différence de survie n'a été mise en évidence après à un traitement à 0.1 ou 0.2 mM de CEES. De plus, le nombre de cellules A549 vivantes baisse de 20% par rapport aux cellules non traitées à partir de l'exposition à 0.5 mM. Lorsque la concentration de traitement est décuplée (5 mM), la survie (25%) est 3.1 fois moindre. Toutefois, le pourcentage de survie dans les cellules A549 est moins élevé que dans les kératinocytes primaires suite à la dose d'exposition la plus forte (10 mM), il est de 4 ± 3 contre $19 \pm 5\%$.

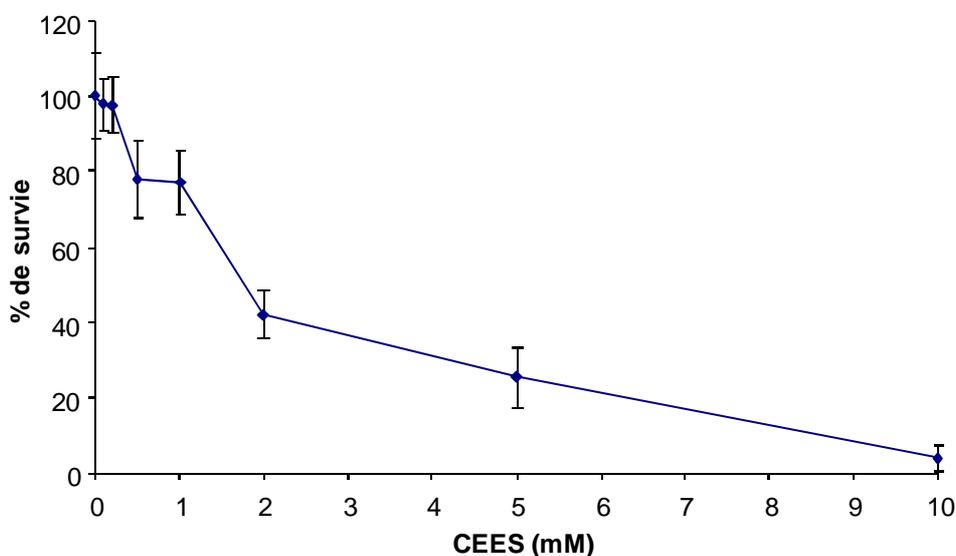


Figure 47 : Evaluation de la survie des cellules A549 après une exposition au CEES

Comme pour les études réalisées avec les kératinocytes primaires, nous avons exposé les cellules A549 dans le milieu de culture à des concentrations de CEES non cytotoxiques pour apprécier la cinétique de formation des adduits et des conjugués ainsi que l'effet dose sur cette formation. En plus d'analyser les conjugués dans la fraction cytosolique, nous les avons également dosés dans le milieu de culture. En effet, il a été décrit que les métabolites issus de la conjugaison du GSH avec l'ypérite étaient en majeure partie excrétés dans les urines dans les 24 heures suivant l'exposition (Black *et al.*, 1992a).

3.2. Cinétique de formation

La cinétique de formation des adduits et des conjugués du CEES a été évaluée après un traitement à 20 μ M pendant 5 à 480 min (Figure 48).

Comme pour les kératinocytes primaires, la fréquence maximale de l'adduit ETE-N7Gua est obtenue pour le temps d'exposition 5 min. Elle s'élève à 3.9 ± 0.1 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Elle diminue dès le temps de traitement suivant, 10 min, à 2.9 ± 0.2 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides et reste stable jusqu'au temps 30min. Entre ce dernier et le temps 60 min, la quantité de ETE-N7Gua mesurée augmente et atteint celle obtenue pour le temps le plus court (5 min). Elle baisse à nouveau à partir de 2h d'exposition et au temps de traitement le plus long (480 min), elle est de 1.9 ± 0.3 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides. Le taux de ETE-N3Ade est lui aussi maximal dès 5 min de traitement à 20 μ M de CEES ($0.03 \pm 0.00/10^6$ nucléosides). Il reste constant jusqu'au temps 60 min puis diminue pour s'établir à 0.01 ± 0.00 ETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides au temps 480 min.

Contrairement aux résultats obtenus dans les kératinocytes, le conjugué Nac-CEES est décelé dans les fractions cytosoliques des cellules A549 dès 5 min d'exposition avec une quantité de 0.04 ± 0.01 pmol/mg de protéines qui reste constante quel que soit le temps étudié. Le conjugué Cys-CEES est également détecté après 5 min de traitement, temps pour lequel son taux est maximal (2.7 ± 0.1 pmol/mg de protéines). Ce taux diminue ensuite globalement avec le temps d'exposition. Au temps 480 min, il est de 0.8 ± 0.2 pmol/mg de protéines.

Par opposition, le dosage de Cys-CEES dans le milieu de culture montre que sa quantité augmente avec le temps de traitement. Celle-ci est d'ailleurs plus importante que dans la fraction cytosolique. Deux gammes de temps d'exposition peuvent être différenciées. La première concerne les temps 5 à 30 min où la fréquence de Cys-CEES est en moyenne de 13 ± 2 pmol/mg de protéines. Cette dernière augmente entre les temps 30 et 60 min et reste

constante jusqu'au temps de traitement le plus élevé (42 ± 11 pmol/mg de protéines). Concernant le conjugué Nac-CEES, il est détecté à partir de 60 min (0.05 ± 0.01 pmol/mg de protéines) d'exposition et sa quantité croît continuellement avec le temps. Elle s'élève à 0.25 ± 0.04 pmol/mg de protéines après 480 min de traitement.

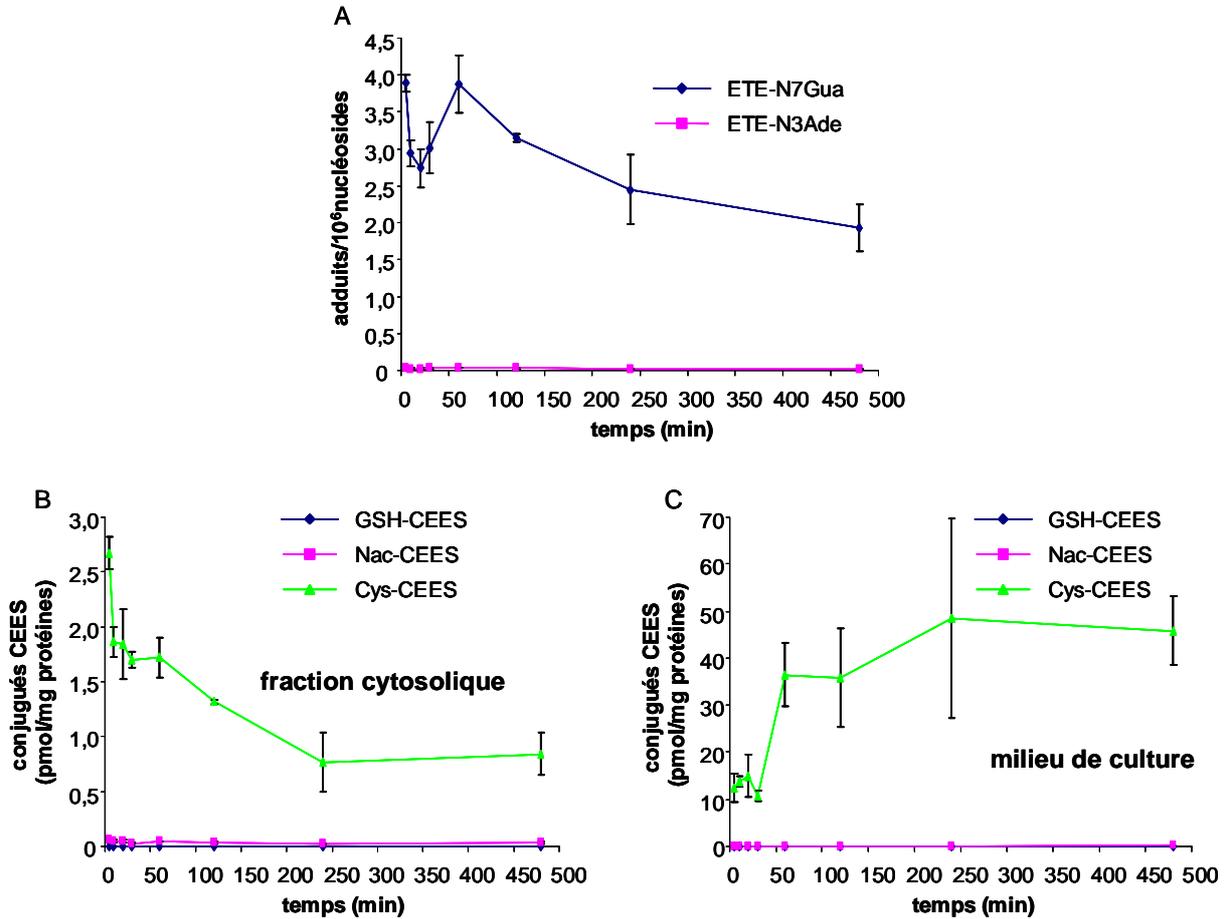


Figure 48 : Cinétique de formation des adduits et des conjugués du CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules A549 ont été exposées à $20 \mu\text{M}$ de CEES dans le milieu de culture (37°C) pendant plusieurs temps (5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 et 480 min). Le milieu de culture a été récupéré. Les cellules ont alors été lysées et l'ADN ainsi que la fraction cytosolique ont été extraits. L'ADN a ensuite été hydrolysé puis analysé, de même que la fraction cytosolique et le milieu de culture, en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits (A) normalisée à un million de nucléosides normaux ainsi que celles des conjugués dans la fraction cytosolique (B) et dans le milieu de culture (C) normalisées à la quantité de protéines extraites. Ils sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

3.3. Effet dose

Les cellules A549 ont été exposées pendant 1 h dans le milieu de culture à des concentrations de CEES variant de 0.1 à 20 μM pour étudier l'effet de la dose de traitement sur la formation de ses adduits et de ses conjugués (Figure 49).

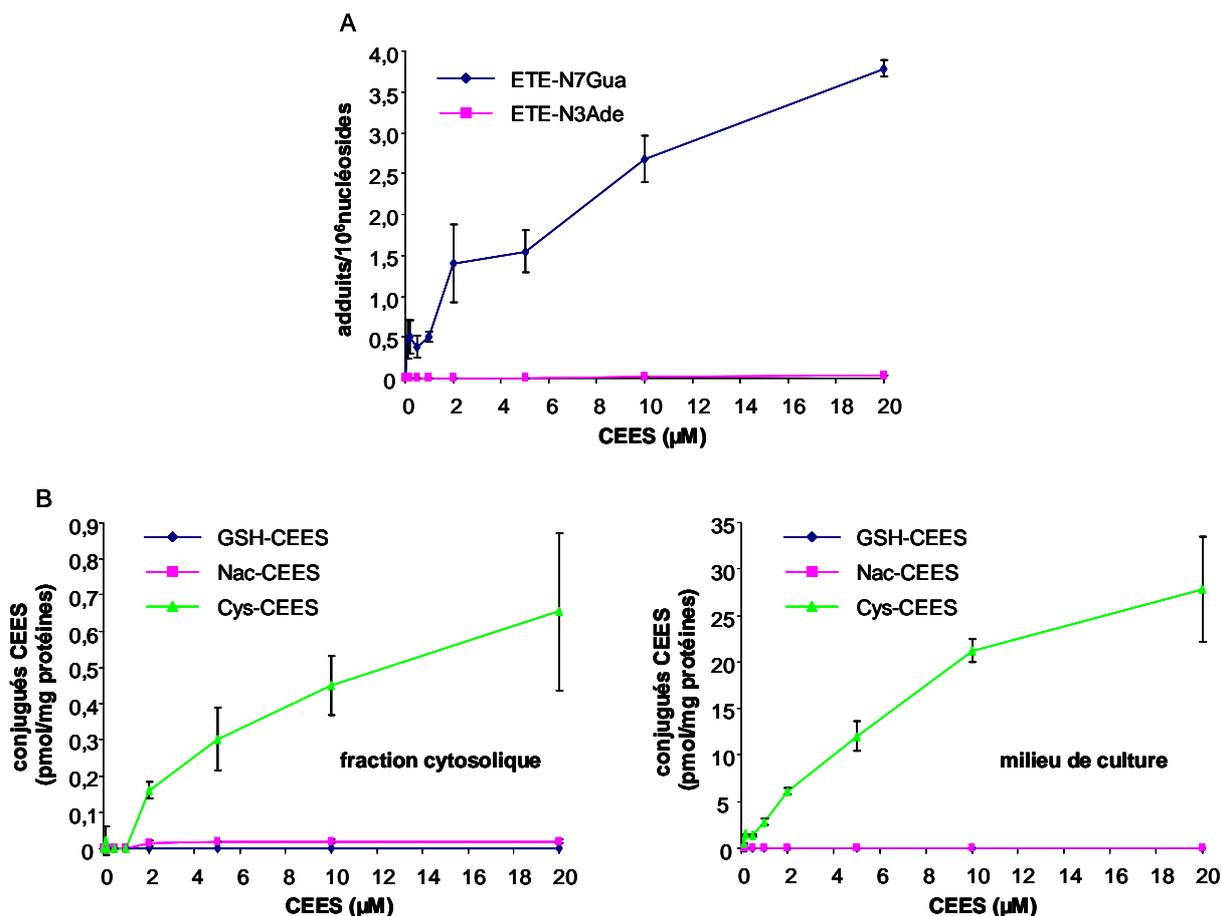


Figure 49 : Effet de la dose de traitement sur la formation des adduits et des conjugués du CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules A549 ont été exposées pendant 1 h dans le milieu de culture (37°C) à différentes doses (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 et 20 μM). Le milieu de culture a été récupéré. Les cellules ont alors été lysées et l'ADN ainsi que la fraction cytosolique ont été extraits. L'ADN a ensuite été hydrolysé puis analysé, de même que la fraction cytosolique et le milieu de culture, en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits (A) normalisée à un million de nucléosides normaux ainsi que celles des conjugués dans la fraction cytosolique (B) et dans le milieu de culture (C) normalisées à la quantité de protéines extraite. Ils sont exprimés en moyenne ($n = 3$) \pm l'écart-type.

A l'instar des données obtenues avec les kératinocytes primaires, ETE-N7Gua a été détecté dès la plus faible dose de traitement ($0.5 \pm 0.2 / 10^6$ nucléosides). En revanche, sa

fréquence reste constante jusqu'à la dose 1 μM . Elle augmente ensuite de façon dose-dépendante pour atteindre 3.8 ± 0.1 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides à la dose d'exposition la plus élevée.

Concernant l'adduit ETE-N3Ade, il n'a été décelé qu'à partir de la concentration 10 μM , soit une concentration 10 fois plus élevée que dans les kératinocytes primaires. A 20 μM , son taux est maximal, il est de 0.03 ± 0.00 ETE-N3Ade/ 10^6 nucléosides.

Comme lors de l'étude de la cinétique de formation des conjugués, la quantité de Cys-CEES est plus importante dans le milieu de culture que dans la fraction cytosolique. De plus, dans cette dernière il n'est décelé qu'à partir de la dose 2 μM avec une quantité de 0.2 ± 0.0 pmol/mg de protéines alors que dans le milieu de culture, dès la dose la plus faible (0.1 μM) elle est de 0.6 ± 0.1 pmol/mg de protéines. Ces quantités augmentent avec la dose pour s'établir respectivement à 0.7 ± 0.2 et à 28 ± 6 pmol/mg de protéines pour la concentration 20 μM .

Pour ce qui est du conjugué Nac-CEES, des résultats opposés ont été observés. En effet, il a été détecté dès la dose 5 μM dans la fraction cytosolique alors qu'il n'a été décelé que pour la concentration de traitement la plus élevée dans le milieu de culture. A chaque fois, la fréquence de Nac-CEES est de 0.02 ± 0.01 pmol/mg de protéines.

A la recherche d'hypothèses expliquant la quantité de Cys-CEES plus importante dans le milieu de culture que dans la fraction cytosolique dès 5 min d'exposition mais également aux plus faibles doses de traitement, nous nous sommes intéressés à la composition du milieu de culture. Celui-ci contient de la cystéine présente à une concentration d'environ 100 μM . Le conjugué Cys-CEES dosé dans le milieu de culture est donc, pour une partie au moins, du à l'alkylation de la cystéine présente dans celui-ci. Nous avons par conséquent cherché à quantifier le conjugué Cys-CEES dans un milieu sans cystéine. Pour cela, nous avons exposés les cellules A549 dans du tampon PBS pendant 10 ou 60 min (Figure 50). Les traitements ont été effectués sur la glace dans le but d'inhiber les activités de réparation de l'ADN.

Les résultats obtenus montrent que la fréquence de l'adduit ETE-N7Gua augmente de manière dose-dépendante pour les deux temps d'exposition. Elle est plus importante après 60 min de traitement et ce quel que soit la dose d'exposition considérée. Ainsi, pour la dose 10 μM , elle est de 6.4 ± 1.0 contre 1.6 ± 0.4 ETE-N7Gua/ 10^6 nucléosides pour le temps 10 min.

La quantité de ETE-N3Ade est également plus élevée au temps de traitement 60 min qu'au temps 10 min pour les concentrations de traitement où il est détecté (10, 25 et 50 μM). Par exemple, pour la dose 50 μM , ETE-N3Ade est dosé à hauteur de 0.30 ± 0.04 et $0.17 \pm 0.01/10^6$ nucléosides, respectivement.

Dans la fraction cytosolique, le taux de Cys-CEES croît de manière dose-dépendante pour les deux temps étudiés. Comme pour les adduits, la quantité de Cys-CEES est plus importante après une exposition de 60 min. Elle est en moyenne 6.4 fois plus élevée. En outre, ce conjugué y est décelé dès la plus faible dose d'exposition, 0.5 μ M, ce qui n'est pas le cas après un traitement de 10 min (détection à partir de la dose 5 μ M).

Le conjugué Nac-CEES, est quant à lui détecté à partir de la concentration 10 μ M pour les deux temps d'exposition étudiés. Sa fréquence augmente avec la dose. Là encore, elle est plus importante après 60 min de traitement. Par exemple, pour la dose 50 μ M, elle est de 0.8 \pm 0.3 contre 0.3 \pm 0.1 pmol/mg de protéines après 10 min d'exposition.

Par opposition à ces derniers résultats, Nac-CEES n'a pas été détecté dans le milieu de traitement (PBS). Le taux de Cys-CEES mesuré dans ce dernier pour le temps d'exposition 10 min est relativement similaire à celui déterminé dans la fraction cytosolique, excepté pour la concentration 25 μ M. En revanche, pour le temps d'exposition 60 min et la concentration la plus élevée (50 μ M), la quantité de Cys-CEES dosée dans la fraction cytosolique est plus importante que celle mesurée dans le PBS. Elle est en effet de 178 \pm 7 contre 86 \pm 17 pmol/mg de protéines. Ce résultat contraste avec celui obtenu après le traitement dans le milieu de culture où c'est dans ce dernier que le conjugué Cys-CEES a été dosé en plus grande quantité. Pour les autres concentrations, ce taux est relativement identique. L'effet temps d'exposition observé dans la fraction cytosolique, est également observé dans le PBS où la fréquence de Cys-CEES est plus élevée après 60 min de traitement. Par exemple, pour la concentration 10 μ M, elle est de 25 \pm 3 contre 11 \pm 2 pmol/mg de protéines après une exposition de 10 min.

Vers de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite

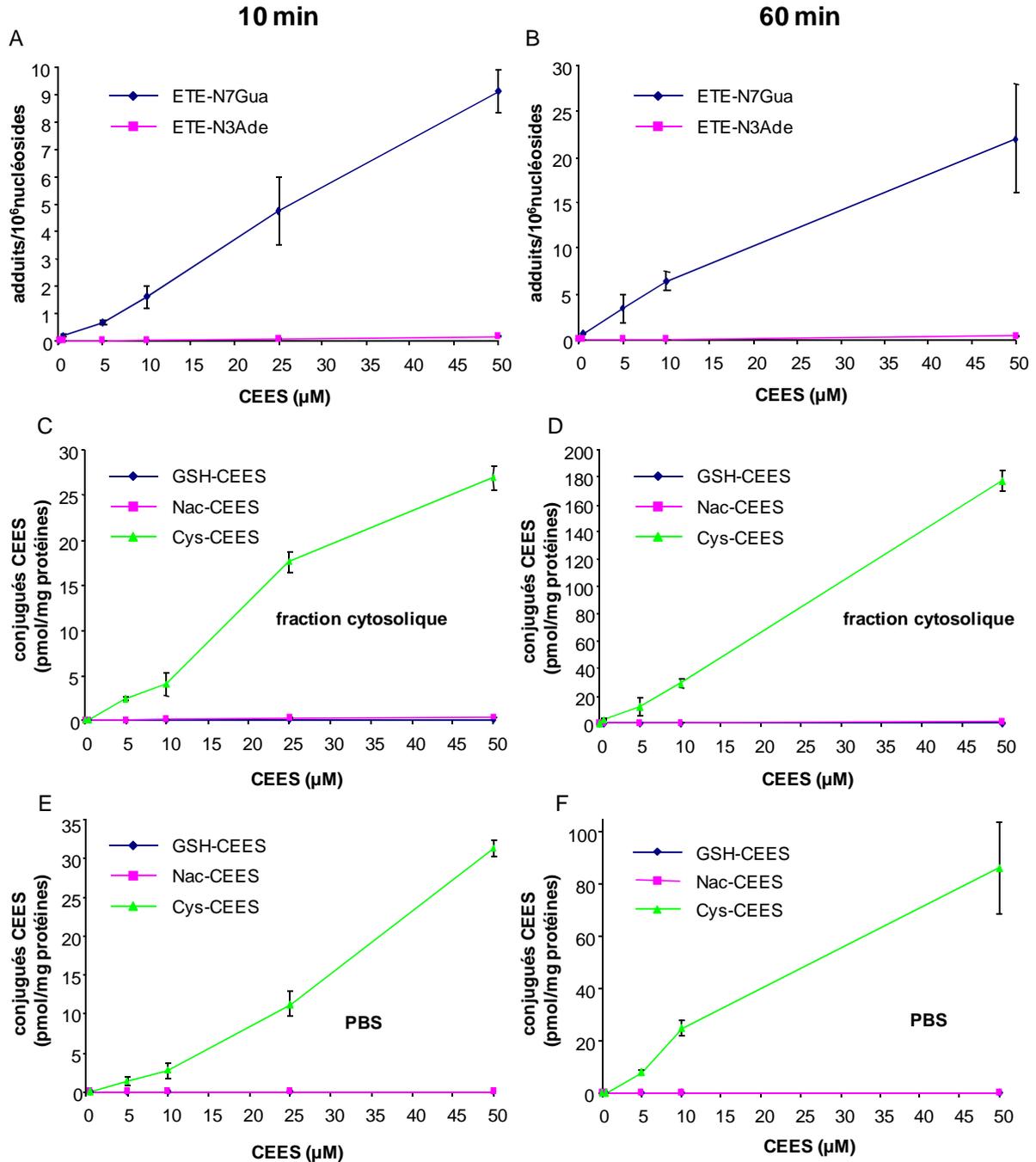


Figure 50 : Effet de la dose de traitement sur la formation des adduits et des conjugués du CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules A549 ont été exposées pendant 10 ou 60 min dans du PBS (sur la glace) à différentes doses (5, 10, 25 et 50 μM). Le PBS a été récupéré. Les cellules ont alors été lysées et l'ADN ainsi que la fraction cytosolique ont été extraits. L'ADN a ensuite été hydrolysé puis analysé, de même que la fraction cytosolique et le milieu de culture, en HPLC-MS/MS. Les résultats représentent la fréquence des adduits (A et B) normalisée à un million de nucléosides normaux ainsi que celles des conjugués dans la fraction cytosolique (C et D) et dans le milieu de culture (E et F) normalisées à la quantité de protéines extraites. Ils sont exprimés en moyenne (n = 3) ± l'écart-type.

IV. Conclusion

Dans l'optique de trouver de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite, nous avons caractérisé un nouvel adduit qui se forme au niveau de la guanine suite à sa conjugaison avec l'ypérite. La forme 2'-désoxyribonucléoside modifiée n'a pas été détectée après une digestion enzymatique illustrant son instabilité. A l'inverse la forme base modifiée a été décelée après cette hydrolyse. Ce résultat suggère que la position avec laquelle interagit le conjugué-ypérite est l'atome N7 de guanine pour former l'adduit GSH-HETE-N7Gua.

Cet adduit a été détecté *in vitro* après traitement à des concentrations croissantes de monocytes THP1 et *in vivo* dans plusieurs organes prélevés pour la caractérisation de la génotoxicité de l'ypérite (dose 60 mg/kg). Dans les monocytes THP1, le taux de GSH-HETE-N7Gua est globalement identique à celui du biadduit excepté à la plus forte concentration pour laquelle la quantité de GSH-HETE-N7Gua est plus élevée. La saturation observée pour N7Gua-ETE-N7Gua à cette dose (100 μ M) n'a, en effet, pas été visualisée pour GSH-HETE-N7Gua.

Dans la peau traitée et dans les reins, la formation de ce dernier est plus importante que celle du biadduit. En revanche, du fait d'un temps de demi-vie plus faible, la fréquence du biadduit devient supérieure à celle de GSH-HETE-N7Gua au court du temps. Dans le cerveau et les poumons, les quantités de ces deux adduits sont similaires quel que soit le temps post-exposition considéré.

Nous avons, de plus, développé une méthode de détection quantitative du conjugué formé par le CEES avec le GSH ainsi que ses métabolites, Nac-CEES et Cys-CEES. Des études préliminaires dans des modèles cellulaires humains, kératinocytes primaires et cellules épithéliales alvéolaires, ont été réalisées pour doser ces conjugués dans la fraction cytosolique. Les traitements ont été effectués à des concentrations de CEES non cytotoxiques. Seul le conjugué Cys-CEES a été détecté dans la fraction cytosolique des kératinocytes primaires. Sa fréquence, de même que celle des adduits générés par le CEES, est maximale dès 5 min d'exposition. De plus, il a été décelé à partir de concentrations de traitement aussi faibles que 0.2 μ M et sa quantité ainsi que celle des adduits étaient dose-dépendantes. En outre, Cys-CEES et ETE-N7Gua étaient toujours détectables 48h post-exposition à 20 μ M de CEES.

Vers de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite

Dans les cellules A549, les taux de Cys-CEES et Nac-CEES sont également maximaux après 5 min de traitement. Le dosage de ces derniers dans le milieu de culture montre qu'ils y sont présents en plus grande quantité que dans la fraction cytosolique des cellules pour tous les temps et toutes les doses étudiées. Dans la mesure où le milieu de culture, dans lequel les traitements ont été effectués, contient de la cystéine, nous ne pouvions conclure sur la validité de ce résultat. C'est pourquoi, nous avons exposé les cellules A549 dans du PBS qui ne contient pas de cystéine. Contrairement au résultat précédent, le taux de Cys-CEES est relativement identique dans la fraction cytosolique et dans le milieu de culture. A la dose d'exposition la plus élevée (50 μM), il est même deux fois plus important dans le cytoplasme. La détection dans le PBS de métabolites issus de Cys-CEES est en accord avec les résultats illustrant une excrétion rapide dans les urines des métabolites de la conjugaison du GSH avec l'ypérite (Black *et al.*, 1992a).

Pour résumé, nous avons identifié un nouvel adduit majeur généré par l'ypérite suite à sa conjugaison avec le GSH pour lequel nous avons développé une méthode de quantification par HPLC-MS/MS. Sa quantité est voisine, voire supérieure dans certains cas à celle du biadduit. La recherche de biomarqueurs d'exposition autres que ceux formés au niveau de l'ADN nous a conduit à mettre au point une méthode de détection quantitative de conjugués formés par le CEES avec le GSH, la N-acétylcystéine et la cystéine dont nous avons pu estimer la quantité formée dans des modèles cellulaires humains.

Chapitre 7: Discussion générale

I. L'ypérite : une arme chimique toujours d'actualité

L'ypérite est une arme chimique de guerre dont la première synthèse remonte à près de 200 ans. Sa première utilisation date de la première guerre mondiale, et plus précisément dans la nuit du 12 au 13 juillet 1917 lors de la bataille d'Ypres, ville qui lui a donné son nom. Parmi les blessés par armes chimiques pendant la « guerre des apothicaires », plus de 70% d'entre eux l'ont été par l'ypérite (Hilmas *et al.*, 2008). Bien qu'utilisée tardivement au cours de ce conflit, c'est l'arme chimique qui a été la plus employée. Son « succès » n'est pas du à la mortalité engendrée (de 2 à 3%) mais plutôt à son effet fortement incapacitant. En effet, les soins prodigués aux soldats blessés s'évaluaient sur plusieurs semaines mobilisant lits et personnel médical. L'ypérite a été largement synthétisée entre les deux guerres et c'est probablement l'arme chimique la plus stockée de par le monde (Szinicz, 2005). Dans les années 80, le gaz moutarde a été également massivement employé durant la guerre Iran-Irak. Au cours de ce conflit, plus de 100000 blessés ont été dénombrés côté iranien dont 30000 en souffrent encore de nos jours (Aghanouri *et al.*, 2004; Balali-Mood and Hefazi, 2006; Kehe and Szinicz, 2005; Khateri *et al.*, 2003). Elle a de plus été utilisée avec le sarin pour mater la rébellion Kurde faisant 5000 morts lors du massacre de Halabja en 1988.

Malgré sa longue histoire, l'ypérite reste une menace d'actualité et ce à la fois pour les populations civiles et militaires (Smith *et al.*, 1995b; Wattana and Bey, 2009). Différentes raisons expliquent cette menace. Tout d'abord, la synthèse de l'ypérite est relativement aisée, elle ne nécessite pas d'infrastructures particulières. Il y a donc un risque qu'elle soit utilisée lors d'attaques terroristes comme cela a été le cas pour le sarin. Ce puissant neurotoxique a en effet été employé par la secte Aum Shinrikyo qui en a dispersé dans le métro de Tokyo en 1995 faisant 12 morts et plus de 5500 blessés (Hoffman *et al.*, 2007). La menace posée par l'ypérite est due également à la destruction des stocks existants prévue par la convention sur les armes chimiques de Paris en 1993 (<http://www.un.org>) mais aussi à l'existence de munitions datant de la première guerre mondiale n'ayant pas explosées et qui ont déjà été à l'origine de plusieurs expositions accidentelles (Aasted *et al.*, 1987; Hobbs, 1944; Ruhl *et al.*, 1994). Cette menace est renforcée par le fait qu'aucun antidote efficace contre ce toxique de guerre n'a été mis au point. Le traitement des blessés est en effet symptomatique et a pour but notamment d'éviter l'apparition d'infections secondaires au niveau des organes cibles de l'ypérite (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Kehe and Szinicz, 2005; Smith *et al.*, 1995b).

II. Toxicité de l'ypérite

Les organes cibles du gaz moutarde correspondent aux organes en contact direct avec l'environnement extérieur, à savoir la peau, les yeux et l'appareil respiratoire. Après une exposition à l'ypérite, liquide ou vapeur, un délai de plusieurs heures précède l'apparition des premiers symptômes. Cette période de latence dépend de plusieurs facteurs comme la dose d'exposition. En effet, la période asymptomatique est inversement proportionnelle à cette dernière (Kehe and Szinicz, 2005). Parmi les autres facteurs, on trouve le temps d'exposition, l'état de l'ypérite (liquide, gaz), le mode d'exposition, l'humidité ou encore la température (Firooz *et al.*, 2011). De plus, la période de latence est également fonction de la personne exposée et de son état immunitaire. Tous ces facteurs influent aussi sur la sévérité des symptômes (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Kehe and Szinicz, 2005). La nature de ces derniers ainsi que le caractère séquentiel de leur apparition sont relativement bien connus (Balali-Mood and Hefazi, 2006; Cullumbine, 1947; Etezzad-Razavi *et al.*, 2006; Ghanei *et al.*, 2010; Kehe and Szinicz, 2005; Momeni *et al.*, 1992; Nagy *et al.*, 1946; Naraghi *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1995b; Smith and Dunn, 1991). Ainsi, au niveau de la peau, le premier symptôme observé est un érythème accompagné d'un prurit intense qui est suivi par l'apparition d'un œdème consécutivement à l'afflux de cellules immunitaires. Des microvésications, dus à la perte de fonctionnalité de la jonction dermo-épidermique, se forment ensuite et coalescent pour former des phlyctènes, lésions caractéristiques des vésicants en général et de l'ypérite en particulier (Ghanei *et al.*, 2010; Momeni *et al.*, 1992; Naraghi *et al.*, 2005; Smith and Dunn, 1991). Avec le temps, ces derniers se rompent pour laisser place à des ulcérations. Outre ces symptômes, des plages d'hyper- et/ou d'hypopigmentation sont également observées (Emadi *et al.*, 2008a; Ghanei *et al.*, 2010; Naraghi *et al.*, 2005). En plus des symptômes à court terme, l'ypérite provoque également des symptômes à long terme au niveau de la peau, des poumons et de l'appareil respiratoire (Aghanouri *et al.*, 2004; Davoudi *et al.*, 2009; Emad and Rezaian, 1997; Emadi *et al.*, 2008b; Etezzad-Razavi *et al.*, 2006; Ghanei *et al.*, 2004; Ghanei and Harandi, 2011; Ghasemi *et al.*, 2012; Hefazi *et al.*, 2005; Kehe *et al.*, 2009; Khateri *et al.*, 2003; Moin *et al.*, 2009; Shohrati *et al.*, 2007; Solberg *et al.*, 1997). En raison de ses propriétés lipophiles qui lui permettent de traverser la barrière cutanée et de rejoindre la circulation générale, elle est en outre capable d'atteindre d'autres organes (Chilcott *et al.*, 2000; Cullumbine, 1947).

III. Alkylation de l'ADN

Au niveau moléculaire, les mécanismes par lesquels l'ypérite provoque ces symptômes ne sont, quant à eux, pas totalement élucidés à ce jour. Plusieurs décennies de recherche ont cependant permis de mettre en évidence de multiples cibles clés ainsi que différentes voies de signalisation cellulaire impliquées dans sa toxicité. Le gaz moutarde est un puissant agent électrophile. En effet, en présence d'eau, il se cyclise sous la forme d'un ion épisulfonium qui est alors capable d'alkyler les groupements nucléophiles de plusieurs biomolécules dont les protéines, le GSH ou encore les acides nucléiques (ADN et ARN). C'est cette capacité à alkyler plusieurs composants cellulaires qui constitue l'hypothèse la plus communément admise pour expliquer, à l'heure actuelle, la toxicité de l'ypérite (Kehe and Szinicz, 2005). Ce processus d'alkylation multi-cibles aboutit notamment à la déplétion du GSH, à la perturbation de l'homéostasie calcique, à la genèse d'un stress oxydant et à l'altération du métabolisme cellulaire (Balali-Mood and Hefazi, 2005b; Ghanei and Harandi, 2011; Kehe *et al.*, 2009; Papirmeister *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1995b). Tous ces événements sont plus ou moins liés entre eux. Ils concourent tous à la mort cellulaire et par suite à l'endommagement des tissus.

Parmi ces différentes cibles moléculaires, l'ADN est l'une des plus importantes et aussi la plus étudiée (Kehe and Szinicz, 2005; Lodhi *et al.*, 2001; Shakarjian *et al.*, 2010). Elle est impliquée à la fois dans la toxicité aiguë de l'ypérite et dans sa toxicité chronique. Papirmeister *et al.* furent les premiers à mettre en avant l'importance de l'alkylation de l'ADN dans la toxicité aiguë de l'ypérite (Papirmeister *et al.*, 1985). L'hypothèse de ces chercheurs fait de l'alkylation de l'ADN l'étape initiale d'un mécanisme en cascade aboutissant à la libération de protéases qui seraient à l'origine de la séparation de la jonction dermo-épidermique et par suite à la formation des phlyctènes (Papirmeister *et al.*, 1985). Certaines étapes de cette hypothèse, dont la déplétion du NAD⁺ consécutive à la suractivation de PARP et le shunt des hexoses monophosphate, ont été validées par ces mêmes chercheurs et/ou par d'autres équipes dans différents modèles aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Cowan *et al.*, 1991, 1992; Hinshaw *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 1987; Mol *et al.*, 1989; Papirmeister *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1990; Yourick *et al.*, 1991). Toutefois cette hypothèse et les étapes qui la sous-tendent ne suffisent pas à expliquer totalement la toxicité du gaz moutarde. En effet, il a

Discussion générale

été démontré que la restauration du taux de NAD⁺ et l'inhibition de PARP n'avaient pas d'influence sur la survie cellulaire (Kehe *et al.*, 2008a; Mol *et al.*, 1991; Steinritz *et al.*, 2009).

L'alkylation de l'ADN est également impliquée dans la toxicité à long terme de l'ypérite via son rôle dans le développement de cancers. Le gaz moutarde est à ce titre classé comme cancérigène par le CIRC (IARC, 2012).

L'alkylation de l'ADN aboutit à la formation de monoadduits (HETE-N7Gua et HETE-N3Ade) et d'un biadduit (N7Gua-ETE-N7Gua). Ce dernier se forme aussi bien sur le même brin d'ADN que sur les brins opposés. Brookes et Lawley sont les premiers à avoir mis en évidence la formation de ces adduits (Brookes and Lawley, 1960, 1961b, 1963). Leur structure a par la suite été confirmée de façon inéquivoque par Fidler *et al.* qui les ont synthétisés et caractérisés (Fidler *et al.*, 1994).

Du fait de la position des atomes d'azote avec lesquels interagit l'ypérite, les adduits formés sont instables. En effet, l'alkylation au niveau de ces atomes déstabilise la liaison N-glycosidique et conduit à la dépurination de la base alkylée ainsi qu'à la formation d'un site abasique. L'alkylation au niveau d'autres positions induit également la dépurination des bases réactives, ce sont les positions N7 d'adénine, N3 de guanine, O2 de cytosine et de thymine ainsi que N6 d'adénine (Lawley and Warren, 1976; Lindahl and Nyberg, 1972; Singer *et al.*, 1978). Dans les conditions physiologiques (pH 7.4, 37°C), la dépurination des bases puriques et pyrimidiques non alkylées est très faible. Leur temps de demi-vie est respectivement de 730 et 14700 ans (Lindahl, 1979; Lindahl and Karlstrom, 1973; Lindahl and Nyberg, 1972). Le mécanisme d'action de la dépurination induite par alkylation est similaire à celui initié en conditions acide (Loeb and Preston, 1986). Suite à l'alkylation des positions N7 et N3 de guanine ou d'adénine, il y a apparition d'une charge positive sur l'atome d'azote réactif et formation d'une amine quaternaire qui est stabilisée par résonance et clivage de la liaison N-glycosidique (Loeb and Preston, 1986). De façon similaire, les adduits formés en position O2 de cytosine aboutissent à la formation d'une amine quaternaire instable en position N1. Toutefois, la dépurination induite par des agents alkylants n'est pas seulement le résultat de la formation d'un ion ammonium instable. En effet, les adduits en position O2 de thymine et N6 d'adénine ne forment pas d'ion ammonium instable (Loeb and Preston, 1986).

L'instabilité des adduits de l'ypérite a été mise en évidence pour la première fois par Brookes et Lawley qui ont constaté la présence de radioactivité alors qu'ils précipitaient de l'ADN traité avec de l'ypérite marqué au ³⁵S (Brookes and Lawley, 1960). Ces chercheurs ont déterminé, dans des conditions physiologiques (pH 7, 37°C), le temps de demi-vie de l'adduit

Discussion générale

majoritaire formé par l'ypérite, HETE-N7Gua, à la fois en tant que nucléoside isolé et dans la double hélice d'ADN. Il est respectivement de 8 et 52h.

De façon générale, les adduits en position N7 de guanine sont plus stables dans l'ADN double brin que le 2'-désoxyribonucléoside modifié, ce qui indique que la persistance de ces adduits dans la double hélice n'est pas seulement la résultante de la stabilité chimique de la liaison N-glycosidique du nucléoside modifié mais qu'elle dépend aussi grandement de la structure tri-dimensionnelle de la portion d'ADN à proximité de la lésion (Gates *et al.*, 2004). Cela a été également montré pour la N7-méthylguanine (pH 7.4, 37°C) dont le temps de demi-vie passe de 69h dans la double hélice à 23h pour le 2'-désoxyribonucléoside modifié (Kriek and Emmelot, 1964). D'autres facteurs influencent également la vitesse de dépurination des adduits en N7 de guanine (Gates *et al.*, 2004). Celle-ci est augmentée avec la densité des substituants en N7. Par exemple, le temps de demi-vie de l'adduit formé par l'aflatoxine B1 est plus court (48h) lorsque sa fréquence est de 1 pour 60 paires de bases que lorsqu'elle est de 1 pour 1500 paires de bases (100h) (Groopman *et al.*, 1981). L'électronégativité du substituant en N7 augmente également la vitesse de dépurination (Muller and Eisenbrand, 1985).

IV. Positionnement du travail de thèse

Bien que l'alkylation de l'ADN par l'ypérite soit reconnue comme une étape cruciale dans sa toxicité, peu d'études quantitatives ont été menées afin d'évaluer la formation et la persistance des adduits qu'elle génère. Cela s'explique notamment par le fait que les méthodes mises au point pour caractériser la génotoxicité du gaz moutarde ne concernent que l'adduit HETE-N7Gua, adduit majoritairement formé par l'ypérite (Fidder *et al.*, 1996; Ludlum *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2002; van der Schans *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 1994). De plus, pour les méthodes qui permettent la quantification simultanée des trois adduits de l'ypérite, celles-ci emploient pour ce faire du gaz moutarde marqué au ³⁵S, limitant de fait le nombre d'échantillons pouvant être traités et analysés (Brookes and Lawley, 1963; Fidder *et al.*, 1994).

Le but de ce travail de thèse étant de mieux caractériser la génotoxicité de l'ypérite *in vivo*, il nous fallait au préalable mettre au point une méthode qui nous permette d'une part de

quantifier les trois adduits qu'elle induit et d'autre part qui permette d'analyser de grandes séries d'échantillons.

V. Les adduits de l'ypérite

La détection quantitative des trois adduits était primordiale dans la mesure où leurs effets biologiques (mutagénicité, cytotoxicité) peuvent être totalement différents. En effet, la multiplicité des positions dans l'ADN avec lesquelles agents alkylants directs ou indirects peuvent réagir pose la question de savoir si certaines modifications structurales de la double hélice sont biologiquement plus significatives que d'autres (Phillips, 2007). Ainsi, les adduits formés en plus grande quantité ne sont pas forcément les plus biologiquement significatifs. Par exemple, le B[a]P, une fois métabolisé en BPDE, forme majoritairement des adduits en position N2 de guanine et en plus faible proportion en position N6 d'adénine (Marie *et al.*, 2008). Il a été suggéré que l'effet biologique de ce dernier était plus conséquent que celui de l'adduit en position N2 de guanine (Phillips, 2007). Par ailleurs, il a été décrit qu'il y avait peu de données suggérant que les adduits en position N7 de guanine, du fait de leur instabilité, étaient mutagènes (Boysen *et al.*, 2009). Une autre raison avancée pour expliquer l'absence de mutagénicité des adduits en position N7 de guanine est que cette position n'est pas impliquée dans la structure secondaire de la double hélice via la formation de liaisons hydrogène avec la cytosine du brin opposé (Watson and Crick, 1953). Les propriétés mutagènes des composés formant des adduits en position N7 de guanine seraient par conséquent imputables aux adduits générés concomitamment au niveau d'autres positions (Boysen *et al.*, 2009). Les adduits en N7 de guanine ne pourraient donc pas être utilisés seuls comme biomarqueurs d'effet mutagène (Boysen *et al.*, 2009). D'un autre côté, l'aflatoxine B1, après métabolisation, forme essentiellement des adduits en position N7 de guanine et est un cancérigène puissant (Croy *et al.*, 1978; Croy and Wogan, 1981a, b; Groopman *et al.*, 1981; Martin and Garner, 1977). Une hypothèse avancée serait que la taille de l'adduit généré causerait une distorsion de la double hélice qui en elle-même pourrait conduire à des erreurs de réplication par les ADN polymérase (Phillips, 2007). De plus, des années auparavant, l'hypothèse avait été émise selon laquelle le changement d'ionisation de la guanine une fois alkylée pouvait affecter son appariement (Lawley and Brookes, 1961).

Discussion générale

Les pontages formés par les agents alkylants bifonctionnels entre deux bases sont eux connus pour être cytotoxiques (Dronkert and Kanaar, 2001; Lohman, 1999). Cet effet est surtout du aux pontages formés entre les deux brins de la double hélice (pontages inter-brins) qui préviennent la séparation des brins d'ADN et bloquent de la sorte les processus de réplication et de transcription (Noll *et al.*, 2006). Il a été estimé pour des génomes bactériens et de mammifères que seulement une vingtaine de pontages interbrins pouvaient induire la mort de cellules incapables de les prendre en charge (Lawley and Phillips, 1996). C'est d'ailleurs sur ce mode d'action (blocage des processus de réplication et de transcription par les pontages inter-brins) que repose l'utilisation des agents chimiothérapeutiques (Lawley and Phillips, 1996; McHugh *et al.*, 2001; Noll *et al.*, 2006). Le premier agent chimiothérapeutique qui a été utilisé est le gaz moutarde mais son action vésicante s'est avérée évidemment être une limite majeure et ce même si des patients (n = 13) atteints de cancer ont pu être soignés par application topique (n = 12) ou par injection (n = 1) de solutions alcooliques d'ypérite (Adair and Bagg, 1931; Lawley and Phillips, 1996). Le développement, durant la seconde guerre mondiale, de dérivés moins toxiques des moutardes azotées a permis de jeter les bases des traitements anticancéreux (Szinicz, 2005). Parmi ces agents chimiothérapeutiques, on trouve notamment le chlorambucile ou le melphalan qui sont toujours utilisés en clinique (Lawley and Phillips, 1996).

L'alkylation de la position N3 d'adénine est également connue pour ses effets cytotoxiques (Shrivastav *et al.*, 2010). Du fait de la localisation de la position N3 d'adénine dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN (Denny, 2001; Guddneppanavar and Bierbach, 2007), il semblerait qu'une fois alkylée, la base interférerait avec la machinerie de réplication en prévenant le contact requis entre la polymérase et l'ADN (Fronza and Gold, 2004; Varadarajan *et al.*, 2003).

VI. Mise au point d'une méthode de quantification des adduits de l'ypérite sensible et haut débit

Dans la mesure où nous voulions doser les adduits induits par l'ypérite dans plusieurs tissus, nous avons mis au point une méthode de quantification de ces adduits par HPLC-MS/MS, technique permettant d'effectuer, du fait de l'automatisation des injections, des analyses à haut débit. L'HPLC-MS/MS constitue de plus la technique de choix pour le dosage

Discussion générale

des dommages à l'ADN, elle est d'ailleurs la plus utilisée à l'heure actuelle (Cadet and Poulsen, 2010; Singh and Farmer, 2006; Swenberg *et al.*, 2008; Tretyakova *et al.*, 2012). Elle allie en effet facilité de mise en œuvre et une très bonne spécificité par l'apport de données structurales. Bien qu'elle le soit moins que les techniques employant des composés radioactifs, l'HPLC-MS/MS est également sensible.

La première étape de la mise au point de notre méthode a consisté à synthétiser les adduits de l'ypérite. Les synthèses décrites précédemment ont été effectués à partir des nucléosides isolés (Brookes and Lawley, 1963; Fidler *et al.*, 1994; Ludlum *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2002; van der Schans *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 1994). Dans le but d'obtenir plus de N7Gua-ETE-N7Gua, dont la formation est tributaire de la proximité de deux résidus guanine, nous avons choisi de traiter directement de l'ADN. Cette synthèse présente de plus l'avantage d'obtenir les trois adduits en une seule réaction.

Après leur caractérisation en HPLC-MS/MS, une partie importante du développement de la méthode a concerné l'aspect quantitatif du dosage en relation avec l'instabilité des adduits. Comme cela a été souligné précédemment, la dépurination des adduits pendant la phase de préparation des échantillons constitue une limitation pour la détection quantitative de nombreux agents alkylants (Boysen *et al.*, 2009). En effet, la dépurination des adduits pourrait être une cause majeure de sous-estimation et ce quelle que soit la technique utilisée. Ayant constatés que la dépurination de HETE-N7dGuo était effective dans les conditions de la digestion enzymatique classiquement effectuée au laboratoire, il nous fallait trouver d'autres conditions permettant de la prévenir. Différents protocoles ont ainsi été testés en faisant varier la nature des enzymes de digestion ou le temps d'hydrolyse. Aucun de ces essais n'a permis de prévenir la dépurination observée précédemment. Nous avons également testé un autre protocole d'hydrolyse en nous basant sur les travaux de Yu *et al.* (Yu *et al.*, 1994). Ces derniers ont mis au point une méthode de quantification de l'adduit majoritaire de l'ypérite par post-marquage au ^{32}P . Avec cette technique, l'hydrolyse aboutit obligatoirement à l'obtention d'un adduit sous forme 2'-désoxyribonucléoside-3'-monophosphate modifiée. En effet, le marquage par la T4 polynucléotide kinase est effectué en position 5' de cette dernière. Afin de limiter la dépurination, ils ont optimisé leurs conditions d'hydrolyse en abaissant la température de la digestion enzymatique à 10°C. En procédant de la même manière, nous avons effectivement constaté que la dépurination de HETE-N7dGuo était moindre comparée aux résultats obtenus avec la digestion réalisée au laboratoire à 37°C. Toutefois, ce protocole

Discussion générale

d'hydrolyse ne prévenait pas totalement la dépurination puisque l'adduit sous forme base modifiée, HETE-N7Gua, était toujours détectable. Yu *et al.* ont estimé qu'en diminuant la température d'hydrolyse à 10°C, la dépurination était environ 50% moins importante qu'à 37°C (Yu *et al.*, 1994).

Dans ces conditions, la détection des adduits de l'ypérite sous leur forme 2'-désoxyribonucléoside modifiée n'était pas possible car leur quantification aurait été sous-estimée. Le choix a donc été fait de les quantifier sous leur forme base modifiée. La détection des adduits sous forme de base modifiée ne permet plus de faire la distinction entre les adduits générés dans l'ADN ou l'ARN. En effet, l'ypérite forme des adduits à l'ARN (HETE-N7Guo et HETE-N3Ado) aux mêmes positions que dans l'ADN et seul la présence du sucre (2'-désoxyribose ou ribose) permettrait de les différencier (Brookes and Lawley, 1960, 1961b). Il a de plus été décrit que lors de l'étape d'extraction d'ADN, il pouvait subsister des traces d'ARN et ce malgré un traitement avec des RNases (Ravanat *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Ces traces d'ARN constituent donc une source de surestimation potentielle. Bien que les ribonucléosides modifiés soient généralement considérés comme plus stables que leurs analogues 2'-désoxyribonucléosides (Franz and Neumann, 1987; Kriek and Emmelot, 1964; Lawley and Brookes, 1963), il fallait vérifier dans quelle mesure c'était le cas pour l'ypérite. A l'exception de Brookes et Lawley qui ont montré l'absence de dépurination des adduits dans l'ARN (Brookes and Lawley, 1960), la question de la stabilité des adduits à l'ARN de l'ypérite n'a jamais été abordée. Les méthodes de quantification décrites précédemment isolent en effet l'adduit majoritaire (Ludlum *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2002; van der Schans *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2011) ou les trois adduits (Brookes and Lawley, 1963; Fidler *et al.*, 1994) sous forme base modifiée par hydrolyse thermique neutre ou acide et ce sans tenir compte de la stabilité des adduits à l'ARN dans de telles conditions. Nous avons donc par conséquent optimisé les conditions d'hydrolyse afin d'une part de dépuriner complètement les adduits et d'autre part d'éviter la dépurination des adduits à l'ARN. Les conditions finalement retenues après plusieurs essais sont une digestion enzymatique suivie d'une hydrolyse thermique neutre de 90°C pendant 20 min. La caractérisation HPLC-MS/MS des adduits effectuée et les conditions d'hydrolyses optimisées, des solutions calibrées de chacun des adduits ont été préparées.

Le même procédé a été appliqué pour mettre au point une méthode de quantification des adduits du CEES pour lesquels aucune méthode de quantification par HPLC-MS/MS n'avait

été mise au point à notre connaissance. Le CEES est un analogue monofonctionnel de l'ypérite. Ne contenant qu'un seul atome de chlore, le CEES forme uniquement des monoadduits (ETE-N7Gua et ETE-N3Ade) aux mêmes positions que celles de l'ypérite (Ludlum *et al.*, 1986; Matijasevic *et al.*, 2001). Il est à ce titre moins toxique que le gaz moutarde. Le CEES, bien qu'il ne forme pas de biadduit, possède des propriétés similaires à celles de l'ypérite (Tewari-Singh *et al.*, 2011). En effet, il alkyle en plus de l'ADN de nombreuses biomolécules une fois cyclisé en ion épisulfonium. Il induit également la formation de microvésicules au niveau de la peau (Jain *et al.*, 2011a; Jain *et al.*, 2011b). Pour toutes ces raisons et parce qu'il est disponible commercialement, le CEES est très utilisé dans la littérature afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la cytotoxicité engendrée par l'ypérite (Gould *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2004; Jowsey *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2009; Tewari-Singh *et al.*, 2010; Tewari-Singh *et al.*, 2009).

Nous avons ensuite validé analytiquement la méthode de quantification des adduits de l'ypérite et du CEES en mesurant la linéarité, la répétabilité et la reproductibilité du signal de détection en spectrométrie de masse. Les mesures se sont révélées très bonnes avec notamment des coefficients de variation pour la répétabilité (intra-jour) et la reproductibilité (inter-jour) inférieurs à 10%. En outre, nous n'avons décelé aucun effet matrice sur la détection des adduits. Ce résultat peut s'expliquer par la différence de temps de rétention entre les adduits et les désoxyribonucléosides normaux. Les temps de rétention de ces derniers sont en effet bien plus courts que ceux des adduits (Δ [temps de rétention] ≥ 5 min).

VII. Formation des adduits de l'ypérite *in vitro*

La dernière étape de la mise au point de notre méthode a consisté à quantifier la formation des adduits de l'ypérite et de son analogue *in vitro*.

Nous avons tout d'abord traité de l'ADN isolé à des concentrations croissantes de gaz moutarde.

Comme il a été décrit précédemment, l'ypérite forme majoritairement des adduits en position N7 de guanine (Brookes and Lawley, 1963; Fidler *et al.*, 1996; Ludlum *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994) et dans une moindre mesure en position N3 d'adénine (Brookes and Lawley, 1963;

Discussion générale

Fidder *et al.*, 1996; Ludlum *et al.*, 1994) ainsi qu'entre deux résidus guanine (Brookes and Lawley, 1963; Fidder *et al.*, 1996). Aux plus faibles concentrations d'ypérite, les proportions de HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua sont respectivement de 81, 6 et 13%. A la plus forte concentration, une saturation du taux des adduits HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua a été observée. Cet effet pourrait être du à une déstabilisation de la double hélice d'ADN qui modifierait la réactivité quand le taux de lésions augmente fortement. L'accroissement de la proportion de l'adduit majoritaire avec la dose de traitement a également été observée par Fidder *et al.* (Fidder *et al.*, 1996). La prépondérance du biadduit par rapport à l'adduit en N3 d'adénine semble dépendre de l'origine de l'ADN. En effet, nos résultats ainsi que ceux de Fidder *et al.* montrent que dans l'ADN de thymus de veau, il se forme plus de N7Gua-ETE-N7Gua tandis que ceux obtenus par Brooks et Lawley dans l'ADN de bactériophages T4 montrent l'inverse (Brookes and Lawley, 1963; Fidder *et al.*, 1994).

La position en N7 de guanine est en proportion plus alkylée par le CEES. En effet, ETE-N7Gua compte pour 98% du total des adduits et ETE-N3Ade pour les 2% restant. Comparée deux à deux, le taux d'adduits en N7 de guanine formé par l'ypérite est 3.6 fois plus important que celui de son analogue. Pour la position en N3 d'adénine, la réactivité de l'ypérite est encore plus élevée, le ratio étant de 9.4. La différence de distribution des bases alkylées entre le gaz moutarde et le CEES pourrait expliquer d'éventuelles différences de mutagénicité entre les deux toxiques.

De façon plus générale, la position en N7 de guanine est la position la plus attaquée par les agents alkylants du fait qu'elle possède le potentiel électrostatique négatif le plus élevé et que parmi les sites nucléophiles des bases de l'ADN, elle est la plus réactive (Pullman and Pullman, 1981; Reiner and Zamenhof, 1957). Le fait que la position en N3 d'adénine soit moins ciblée s'explique par sa localisation dans le sillon mineur de la double hélice l'ADN qui est moins accessible que la position N7 de guanine qui se situe, elle, dans le sillon majeur (Guddneppanavar and Bierbach, 2007). La formation des biadduits entre deux position N7 de guanine est, quant à elle, directement dépendante de la séquence d'ADN. Il a en effet été montré pour les moutardes azotées que ces pontages se formaient préférentiellement au niveau de la séquence 5'-GNC-3' (Cullis *et al.*, 1995; Ojwang *et al.*, 1989). Cette formation est réalisée en deux temps (Povirk and Shuker, 1994). Dans un premier temps il y a formation d'un monoadduit suite à une première cyclisation et au relargage d'un atome de chlore. Le monoadduit peut alors, si la séquence d'ADN s'y prête, former un biadduit après la seconde cyclisation et le relargage du second atome de chlore.

Discussion générale

Ludlum *et al.* ont synthétisé un autre adduit formé par le CEES en position O6 de guanine (Ludlum *et al.*, 1984). Les adduits formés au niveau de cet atome d'oxygène sont en proportion peu fréquent mais sont connus pour être très mutagènes (Loechler *et al.*, 1984). Cela s'explique par le fait que, comme les positions N1 et N2, la position O6 participe à l'appariement de la guanine avec la cytosine (Watson and Crick, 1953). Ainsi l'alkylation en position O6 est à l'origine d'un mésappariement de la guanine avec la thymine qui s'il n'est pas réparé par l'AGT donnera une transition G→A lors de la prochaine réplication (Loechler *et al.*, 1984; Phillips, 2007). Ludlum *et al.* ont décelé la modification de la guanine en O6 dans de l'ADN de thymus de veau à hauteur d'approximativement 0.1% du total des adduits formés par le CEES (Ludlum *et al.*, 1986). Ils ont de plus montré qu'après incubation d'AGT en excès avec de l'ADN préalablement traité et donc contenant des guanines alkylées en position O6, ces adduits étaient peu voire pas du tout pris en charge par l'AGT (Ludlum *et al.*, 1986).

Plusieurs mécanismes d'alkylation des bases de l'ADN ont été décrits parmi lesquels la substitution nucléophile monomoléculaire (substitution nucléophile d'ordre 1 ou SN₁) et la substitution nucléophile bimoléculaire (substitution nucléophile d'ordre 2 ou SN₂) (Swenson, 1983). Pour la SN₁, il y a génération d'un carbocation électrophile qui constitue l'espèce réactive. La formation du carbocation représente l'étape limitante de l'alkylation. Il a été décrit que les agents alkylants réagissant selon un mécanisme de type SN₁ formaient plus d'adduits avec les groupements exocycliques des bases et notamment la position O6 de guanine (Phillips, 2007). C'est là la différence principale entre les agents alkylants réagissant selon un mécanisme de type SN₁ et ceux réagissant selon un mécanisme de type SN₂ (Boysen *et al.*, 2009). Ainsi, la méthyl-nitrosourée (MNU) forme, en proportion, plus d'adduits en O6 de guanine par rapport au méthanesulfonate de méthyle (MMS) (Beranek, 1990). En outre, plus la chaîne carbonée du substituant est importante et plus l'alkylation de la position O6 de guanine est importante. Par exemple, l'éthyl-nitrosourée (ENU) cible plus cette dernière que le MNU (Beranek, 1990). Le mécanisme de type SN₂ implique, quant à lui, la formation d'un état transitoire complexe via l'attaque du centre nucléophile par l'espèce électrophile, le groupement partant étant par la suite relargué. Pour les agents alkylants réagissant selon un mécanisme de type SN₂, ce sont les atomes d'azotes hétérocycliques qui sont le plus ciblés (Phillips, 2007).

L'ypérite et son analogue réagissent par l'intermédiaire d'un ion épisulfonium (carbocation). L'alkylation de la guanine et de l'adénine par ces deux toxiques se ferait donc par un mécanisme de type SN₁. Ces toxiques devraient donc former des adduits en O6 de guanine de

Discussion générale

manière significative. Toutefois Ludlum *et al.* ont observé que cette position représentait seulement 0.1% du total des adduits formés par le CEES alors qu'il a été montré pour l'ENU que la proportion de l'adduit en O6 de guanine s'élevait à près de 10 % (Beranek, 1990; Ludlum *et al.*, 1986). Un autre mécanisme d'alkylation des bases de l'ADN reflété par l'équation de Swain-Scott conforte en revanche les résultats trouvés par Ludlum *et al.*. L'équation de Swain-Scott est définie comme suit : $\log(k_y/k_z) = s(n_y - n_z)$ où s correspond à l'électrophilie de l'agent, $n_y - n_z$ à la différence de nucléophilie des sites y et z , et k_y/k_z au ratio des constantes de vitesse pour une réaction avec les sites y et z (Swain and Scott, 1953). Par convention, n_z , la nucléophilie pour l'eau, est nulle. L'électrophilie de l'agent s est déterminée expérimentalement et elle est exprimée de façon relative par rapport à celle du bromure de méthyle ($s = 1$). Il a été décrit qu'une valeur faible de s était associé avec un mécanisme réactionnel de type SN_1 alors qu'une valeur proche de 1 indiquait un mécanisme de type SN_2 (Beranek, 1990; Ludlum *et al.*, 1986). Or, la valeur de s pour l'ypérite est de 1.15 (Spears *et al.*, 1997), ce qui signifie qu'elle alkylerait les bases de l'ADN selon un mécanisme de type SN_2 et donc très peu la position O6 de guanine.

Fidder *et al.*, qui ont synthétisé l'adduit en O6 de guanine pour l'ypérite ne l'ont détecté ni dans l'ADN isolé ni dans du sang humain traité *ex vivo* (Fidder *et al.*, 1994). De plus, les moutardes azotées comme la méchloréthamine, le chlorambucile, le melphalan ou le cyclophosphamide qui réagissent également par l'intermédiaire d'un carbocation ne forment pas d'adduit en position O6 de guanine (Povirk and Shuker, 1994).

Lors de la caractérisation HPLC-MS/MS des adduits de l'ypérite et du CEES, nous avons recherché un signal correspondant à l'adduit formé en position O6 de guanine mais nous n'en avons détecté aucun.

Nous avons également recherché si le monoadduit en N7 de guanine de l'ypérite et du CEES se convertissaient respectivement en 5N-(hydroxyéthylthioéthyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-formamidopyrimidine (HETE-FAPy) et en 5N-(éthylthioéthyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-formamidopyrimidine (ETE-FAPy). En effet, les adduits en N7 de guanine sont susceptibles à l'attaque par un ion hydroxyde en position C8 qui a pour conséquence l'ouverture du noyau imidazole alkylé (Brookes and Lawley, 1961a; Chetsanga *et al.*, 1982a; Chetsanga and Makaroff, 1982; Chetsanga *et al.*, 1982b; Townsend and Robins, 1963). A l'inverse de l'adduit correspondant, la forme FAPy n'est pas sujette à la dépurination en raison de la stabilisation de la liaison N-glycosidique pendant l'ouverture du noyau imidazole (Boysen *et al.*, 2009; Gates *et al.*, 2004). Comme pour l'adduit en position O6 de guanine, nous n'avons détecté aucun signal correspondant aux adduits HETE-FAPy et ETE-FAPy.

Discussion générale

Nous avons ensuite traité des monocytes humains (THP1) aux mêmes concentrations d'ypérite et de CEES que celles utilisées pour l'ADN isolé.

La différence majeure entre la quantification des adduits formés dans l'ADN isolé et dans l'ADN de cellules concerne l'étape d'extraction. Dans le but de prévenir la dépurination pendant cette dernière, nous avons diminué la température, de 50 à 37°C, de l'élimination des ARN dans le protocole d'extraction classiquement utilisé au laboratoire (Ravanat *et al.*, 2002).

Les résultats ont confirmé la prédominance de l'alkylation en position N7 de guanine par l'ypérite. De plus dans les monocytes THP1, il se forme, à l'instar de l'ADN de thymus de veau, plus de biadduits que de monoadduits en position N3 d'adénine. Les proportions de chacun des adduits sont, en outre, sensiblement identiques à celles mesurées dans l'ADN isolé (81% HETE-N7Gua, 7% HETE-N3Ade et 12% N7Gua-ETE-N7Gua). Cependant, les fréquences de chacun des adduits sont approximativement dix fois plus faibles dans l'ADN des cellules THP1 par rapport à l'ADN isolé, illustrant ainsi de façon indirecte l'alkylation d'autres groupements nucléophiles (ARN, protéines, GSH) par l'ypérite.

La position N7 de guanine est toujours plus ciblée par le CEES que l'ypérite mais de manière moins marquée que dans l'ADN isolé. En effet, la proportion de ETE-N7Gua ne s'élève plus qu'à 89%, celle de ETE-N3Ade étant de 11%. Comparée à autre un agent monofonctionnel, le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), le CEES forme en proportion plus d'adduit en N7 de guanine (89% dans des monocytes THP1 contre 64 à 76% dans des CHO) (Heflich *et al.*, 1982; Natarajan *et al.*, 1984). En revanche, cette proportion est relativement similaire à celle du MMS dans l'ADN de CHO (89% contre 86%) (Beranek *et al.*, 1983). En considérant tous les monoadduits formés, l'ypérite est dix fois plus réactive que le CEES. Ce résultat pourrait expliquer en partie pourquoi, même en l'absence de formation de biadduits, le CEES est moins toxique que le gaz moutarde. De manière intéressante, Matijasevic *et al.* ont de plus montré que pour un pourcentage donné de conversion d'un ADN plasmidique d'une forme superenroulée à une forme circulaire, celui-ci nécessitait une concentration environ dix fois plus élevée de CEES que d'ypérite (Matijasevic *et al.*, 2001).

VIII. Le modèle animal choisi

Fort de la mise au point de la première méthode HPLC-MS/MS permettant la quantification individuelle des trois adduits de l'ypérite ainsi que l'analyse de grandes séries d'échantillons avec une détection du signal sensible, spécifique et reproductible, nous l'avons appliquée à l'étude de leur formation et de leur persistance chez l'animal.

De nombreux modèles animaux ont été utilisés pour étudier les mécanismes à l'origine de la toxicité de l'ypérite parmi lesquels le porc, le cochon d'Inde, le lapin et la souris (Chauhan *et al.*, 1996; Chilcott *et al.*, 2007; Dachir *et al.*, 2012; Isidore *et al.*, 2007; Mershon *et al.*, 1990; Monteiro-riviere and Inman, 1995; Ricketts *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995a; Tanaka *et al.*, 1997; Taysse *et al.*, 2007; Tsuruta *et al.*, 1996; Zlotogorski *et al.*, 1997). La toxicité du gaz moutarde a également été étudiée dans des peaux humaines greffées sur le dos de souris (Papirmeister *et al.*, 1984a) ou *ex vivo* dans l'oreille de souris (Babin *et al.*, 2000; Casillas *et al.*, 2000; Dachir *et al.*, 2002; Powers *et al.*, 2000).

Le modèle retenu pour notre étude est la souris sans poils SKH-1 qui, en plus de développer les symptômes caractéristiques d'une exposition cutanée à l'ypérite (érythème, œdème, microvésications, ulcération), présente l'avantage d'être peu onéreux et facilement manipulable. A l'IRBA, ce modèle est bien maîtrisé pour l'exposition cutanée à l'ypérite aussi bien liquide que vapeur (Clery-Barraud *et al.*, 2013; Dorandeu *et al.*, 2011; Taysse *et al.*, 2011; Vallet *et al.*, 2012). Il est en outre de plus en plus utilisé pour étudier différents mécanismes impliqués dans la toxicité de l'ypérite comme l'inflammation (Jain *et al.*, 2011a; Jain *et al.*, 2011b; Joseph *et al.*, 2011), le stress oxydant (Jain *et al.*, 2011a; Pal *et al.*, 2009), la signalisation des dommages à l'ADN (Jain *et al.*, 2011a; Joseph *et al.*, 2011) ou pour évaluer l'efficacité de thérapeutiques (Tewari-Singh *et al.*, 2011; Tewari-Singh *et al.*, 2012). Toutefois, ce modèle présente un inconvénient lié à ses propriétés cutanées. En effet, sa couche cornée est plus fine que celle de l'homme (5 μm contre 10 à 17 μm) (Dorandeu *et al.*, 2011; Reifenrath *et al.*, 1991). Il en est de même pour l'épaisseur de son épiderme (20 μm contre 70 à 120 μm) (Dorandeu *et al.*, 2011). Ainsi l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus avec ce modèle est difficile. Cependant, cela concerne également les autres modèles. Seuls les résultats obtenus chez le porc peuvent être extrapolés à l'homme du fait de propriétés cutanées similaires (Reifenrath *et al.*, 1994). En revanche, pour des raisons évidentes, le nombre de conditions pouvant être testé avec ce dernier modèle reste limité.

L'étude réalisée a porté sur 132 souris dont la peau du dos a été exposée à différentes doses d'ypérite en solution (2, 6 et 60 mg/kg). Dans le but de faire le lien entre doses d'exposition, développement du processus lésionnel et dommages à l'ADN, ces doses ont été choisies en fonction de la sévérité de la brûlure occasionnée (1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} degré respectivement). De plus, la dose 2 mg/kg correspond à environ 100 µg/cm², dose à laquelle des phlyctènes sont formées sur la peau humaine (Ghanei *et al.*, 2010; Momeni *et al.*, 1992; Naraghi *et al.*, 2005). Les animaux ont été séquentiellement sacrifiés à 6 h, J1, J3, J7, J14 et J21 post-exposition.

IX. Les adduits de l'ypérite dans la peau

Outre la peau exposée, nous avons également prélevé deux échantillons de peaux supplémentaires, l'un adjacent à la peau exposée et l'autre éloigné à 2 cm de cette dernière, dans le but de mettre en évidence une éventuelle diffusion radiale de l'ypérite.

Dans la peau exposée, nous avons montré que la formation des trois adduits générés par l'ypérite était maximale dès 6 h post-exposition. La prédominance de l'adduit en N7 de guanine a été ici confirmée. De plus, le biadduit a également été dosé en plus grande quantité que l'adduit en N3 d'adénine, confirmant les résultats obtenus *in vitro* dans l'ADN isolé et celui des monocytes THP1. C'est la première fois, au meilleur de notre connaissance, que ces deux derniers sont dosés *in vivo*. Les proportions de chacun des trois adduits diffèrent toutefois de celles obtenues *in vitro* et particulièrement celle de HETE-N3Ade qui est moins d'un pourcent contre 6 à 7% dans l'ADN isolé. Cette différence de proportion pour l'adduit HETE-N3Ade peut être expliquée par une différence d'accessibilité de la position N3 d'adénine. En effet, il a été décrit que l'accessibilité à cette position, située dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN, était dépendante de plusieurs paramètres tels que la dimension du sillon mineur ou son état d'hydratation (Guddneppanavar and Bierbach, 2007).

Une dose-réponse de la fréquence des adduits a également été observée. Celle-ci est linéaire uniquement entre les doses 2 et 6 mg/kg. Entre les doses 6 et 60 mg/kg, l'augmentation de la quantité des adduits est seulement d'un facteur 3. Cet accroissement non linéaire de la dose-réponse pourrait être expliqué soit par une pénétration percutanée plus

Discussion générale

importante de l'ypérite en lien avec la brûlure du 3^{ème} degré induite par l'exposition à 60 mg/kg soit par une évaporation du toxique plus conséquente qu'aux faibles doses (Chilcott *et al.*, 2000; Cullumbine, 1947).

L'apoptose et la nécrose sont toutes deux induites par l'ypérite et associées à la séparation de la jonction dermo-épidermique à l'origine de la formation des microvésications (Dorandeu *et al.*, 2011; Hayden *et al.*, 2009; Heinrich *et al.*, 2009; Kehe *et al.*, 2008b; Rosenthal *et al.*, 2001). En accord avec des résultats précédents, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre le taux d'adduits mesuré à 6 h post-exposition (doses 6 et 60 mg/kg) et le nombre de cellules apoptotiques déterminé 24 h post-exposition (Greenberg *et al.*, 2006; Kehe and Szinicz, 2005).

A partir de 6 h, une diminution importante de la quantité de chacun des adduits a été constatée entre les différents temps étudiés. Ce résultat contraste avec l'observation selon laquelle la phosphorylation de l'histone H2AX, utilisée par certains comme un marqueur de génotoxicité, est maximale au bout de 24 h dans la peau exposée aussi bien à l'ypérite qu'à son analogue monofonctionnel (Black *et al.*, 2010a; Joseph *et al.*, 2011). De façon similaire, Inturi *et al.* ont montré dans des kératinocytes de souris en culture que la phosphorylation de H2AX est également maximale 24 h après traitement au CEES (Inturi *et al.*, 2011). La phosphorylation de H2AX ne peut être considérée comme un marqueur de la formation des adduits dans la mesure où elle est connue pour se produire en réponse à la formation de cassures doubles brins (Garcia-Canton *et al.*, 2012). Il a également été montré qu'elle était induite lors de la réparation de certaines lésions comme les photoproduits induits par les UV (Cleaver, 2011). La phosphorylation de H2AX observée par ces différentes équipes après exposition à l'ypérite ou au CEES s'apparenterait donc plus comme le marqueur de la mise en place d'une réparation des adduits ou tout du moins à leur signalisation plutôt qu'à leur formation.

De manière générale, l'importance des dommages à l'ADN générés par le gaz moutarde dans la peau a été essentiellement mise en évidence à travers leur signalisation et non leur quantification (Jowsey *et al.*, 2009, 2012; Tewari-Singh *et al.*, 2010). Seul van der Schans *et al.* ont quantifié l'adduit majoritaire de l'ypérite (immunomarquage) dans la peau humaine mais uniquement pour une seule dose d'exposition et des temps très courts, inférieurs à une min (van der Schans *et al.*, 2004).

La diminution du taux d'adduits observée à partir de 6 h post-exposition et entre les différents temps étudiés est la résultante à la fois de la prise en charge des dommages à l'ADN par les systèmes de réparation (processus biologique) et de leur dépurination

Discussion générale

(processus chimique). En effet, bien que moins importante par rapport aux nucléosides isolés, la dépurination des adduits du gaz moutarde se produit dans l'ADN double brin comme cela a été montré pour HETE-N7dGuo (Brookes and Lawley, 1960). Cela est également le cas pour les adduits de nombreux agents alkylants tels que l'aflatoxine B1 ou le 1,2-dibromoéthane (Croy and Wogan, 1981a; Inskeep *et al.*, 1986). Une fois dépurinés, les adduits ne se trouvent plus dans l'ADN et ne sont par conséquent plus détectables. Les adduits instables peuvent d'ailleurs être détectés dans les urines et servir de biomarqueurs d'exposition (Bransfield *et al.*, 2008). Ainsi, Fidler *et al.* ont mis au point une méthode de détection de l'adduit HETE-N7Gua dans l'urine de cochons d'Inde après une exposition cutanée liquide (Fidler *et al.*, 1996).

Bien que leur quantité diminue en fonction du temps post-exposition, les adduits formés par l'ypérite persistent relativement longtemps. En effet, l'adduit majoritaire et le biadduit sont détectés 3 semaines après exposition à chacune des doses étudiées. Le calcul des temps de demi-vie des trois adduits pour la dose d'exposition la plus élevée (60 mg/kg) n'a montré aucune différence entre les trois adduits. Il est en moyenne de 3.9 jours. Pour comparaison, le temps de demi-vie des dimères de pyrimidine est d'environ 8h dans le même modèle (Yarosh and Yee, 1990). En revanche pour la dose la plus faible (2 mg/kg), le temps de demi-vie du biadduit (5.1 jours) est le plus important. Ce résultat suggère une cinétique de réparation plus lente de ce dernier par rapport aux monoadduits. De plus, ce temps de demi-vie est plus élevé que ceux obtenus pour les doses 6 et 60 mg/kg. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats serait que la densité du biadduit influencerait sur sa vitesse de dépurination comme cela a été montré pour l'adduit formé en N7 de guanine par l'aflatoxine B1 (Groopman *et al.*, 1981). En effet, le taux de biadduit mesuré est plus important aux doses 6 et 60 mg/kg qu'à la dose 2 mg/kg. Cependant ce taux est également plus élevé à la dose 60 mg/kg qu'à la dose 6 mg/kg et pourtant les temps de demi-vie pour ces deux doses ne sont pas différents. A l'évidence des facteurs autres que la vitesse de dépurination et la réparation sont impliquées dans la cinétique d'élimination des adduits. L'un d'entre eux pourrait être la dilution des adduits dans la peau comme cela a été suggéré par Shugart (Shugart, 1985). Ce dernier a mis en évidence que 9 jours après application topique de BPDE sur le dos de souris C3H, le temps de demi-vie des adduits était de 5 jours. Pour expliquer cette demi-vie, il a suggéré que les adduits n'étaient pas réparés mais que la cinétique d'élimination était due à leur diminution relative dans la peau à une vitesse équivalente à celle du turnover de l'ADN (réplication vs dégradation) (Shugart, 1985).

Discussion générale

Parallèlement à la caractérisation de la génotoxicité de l'ypérite dans la peau exposée, nous avons suivi l'évolution de la brûlure pendant 3 semaines à l'aide d'une méthode non invasive, la mesure de la perte insensible en eau ou perte d'eau trans-épidermique. Celle-ci est le reflet de la fonction barrière de la peau, fonction assurée par la couche cornée de l'épiderme. En effet, la couche cornée renferme les cornéocytes, cellules anucléées correspondant au stade ultime de différenciation des kératinocytes et qui ont pour rôle de prévenir la diffusion de l'eau (Crickx, 2005). Toutefois, cette barrière n'est pas absolue et il existe une perte insensible en eau minimale qui peut augmenter lorsque la fonction barrière est altérée ou immature comme cela a été décrit chez les prématurés (Crickx, 2005). La perte insensible en eau a été récemment décrite comme étant adaptée au suivi de la brûlure cutanée générée par une exposition à des vapeurs saturantes d'ypérite chez le même modèle (Clery-Barraud *et al.*, 2013).

Quelle que soit la dose considérée, les résultats obtenus ont montré une augmentation importante de la perte d'eau trans-épidermique à J1. Cette observation peut être mise en lien avec la fréquence maximale des adduits à 6 h qui a été corrélée positivement avec le nombre de cellules apoptotiques déterminé à J1. Ainsi, les adduits formés par l'ypérite seraient en partie responsables, via le déclenchement de l'apoptose et la dégradation du tissu, d'une augmentation de la perte insensible en eau dans les premières heures suivant l'exposition. Cette observation rappelle l'hypothèse émise par Papirmeister *et al.* faisant des dommages à l'ADN l'évènement déclencheur de la formation des phlyctènes induites par l'ypérite (Papirmeister *et al.*, 1985). La valeur de la perte insensible en eau continue d'augmenter pour les trois doses étudiées et atteint un maximum à J4 post-exposition. Ces résultats sont corrélés avec les observations macroscopiques montrant que la sévérité de la brûlure était maximale entre J3 et J7 post-exposition. Trois semaines après exposition, la perte d'eau trans-épidermique des peaux exposées reste supérieure à celle des peaux non exposées. Chilcott *et al.* ont également montré que chez le porc exposé à de l'ypérite sous forme vapeur, la valeur de la perte insensible en eau restait supérieure à celle de la peau témoin 3 semaines post-exposition (Chilcott *et al.*, 2007). Mis à part la diminution observée entre J14 et J21 pour la dose 2 mg/kg, la perte d'eau trans-épidermique stagne à sa valeur maximale pour tous les temps étudiés, ce qui contraste avec la fréquence des adduits qui diminue continuellement au cours du temps. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'à J1 post-exposition les cellules apoptotiques ont surtout été marquées au niveau de la couche basale de l'épiderme. Or ce sont ces cellules qui se différencient par la suite pour remplacer dans les couches supérieures les cornéocytes qui se désquament. Ainsi, la perte insensible resterait élevée 3

Discussion générale

semaines post-exposition du fait que la couche cornée ne serait pas correctement et /ou complètement renouvelée.

La détection des adduits de l'ypérite dans des échantillons de peau non directement exposés illustre pour la première fois à notre connaissance la capacité de l'ypérite à diffuser radialement dans la peau. Toutefois cette diffusion est limitée dans l'espace puisque les adduits ont été quantifiés dans la peau éloignée, soit à 2 cm de la peau exposée, uniquement après exposition à la plus forte dose d'exposition. Les échantillons ont été prélevés dans le même axe. La diffusion radiale limitée dans l'espace a également été observée chez la rat sans poils pour le laureth sulfate de sodium qui est un détergent dont l'application topique provoque une augmentation de la perte insensible en eau (Patil *et al.*, 1995; Vandervalk *et al.*, 1984). Contrairement à la peau exposée pour laquelle les trois adduits ont été détectés jusque J21 à la dose d'exposition la plus élevée, ceux-ci n'ont plus été décelés à partir de J14 dans la peau adjacente et J3 pour la peau éloignée. Les temps de demi-vie sont cependant équivalents quel que soit l'échantillon de peau considéré. Les adduits ont été détectés moins longtemps après exposition car leur quantité est faible et atteint plus vite la limite de détection de la méthode.

La quantité des adduits formés après une exposition cutanée liquide étant maximale à 6 h post-exposition, nous avons choisi ce temps pour évaluer l'effet de la voie d'exposition sur la formation des adduits. Dix-huit souris SKH-1 ont ainsi été exposées à des vapeurs saturantes d'ypérite en conditions occlusives pendant 8 ou 16 min. Les résultats obtenus ont, comme pour l'exposition cutanée liquide, mis en évidence une dose-réponse du taux d'adduits. De manière intéressante, les fréquences des monoadduits mesurées pour l'exposition à des vapeurs saturantes pendant 16 min sont similaires à celles obtenues après une exposition à 2 mg/kg d'ypérite en solution. En revanche, la quantité de biadduits mesurée est deux fois plus importante. Les pontages étant plus cytotoxiques que les monoadduits (Lohman, 1999), ce résultat pourrait expliquer en partie pourquoi la quantité d'ypérite liquide suffisante pour provoquer la formation d'une phlyctène est supérieure à celle d'ypérite vapeur (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contre 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Nagy *et al.*, 1946; Papirmeister *et al.*, 1984b).

X. Les adduits de l'ypérite dans les organes internes

Contrairement à la diffusion radiale, la diffusion interne de l'ypérite est bien connue (Chilcott *et al.*, 2000; Cullumbine, 1947). En effet, grâce à ses propriétés lipophiles, l'ypérite est capable de traverser la barrière cutanée. Après une exposition cutanée liquide, il a été estimé que 80% de la dose appliquée était évaporée. Parmi les 20% restant, 85 à 90% traversent la peau et rejoignent la circulation générale expliquant ainsi la toxicité systémique de l'ypérite (Chilcott *et al.*, 2000; Cullumbine, 1947).

Afin de caractériser la génotoxicité de l'ypérite, nous avons donc, en plus des échantillons de peau, prélevé plusieurs organes internes : poumons, foie, cerveau, reins et rate. Les résultats obtenus ont montré comme dans les échantillons de peau, une prépondérance de l'adduit HETE-N7Gua devant le biadduit et HETE-N3Ade. Les proportions de chacun de ces adduits diffèrent entre les organes, ce qui a également été montré pour l'adduit majoritaire formé par l'oxyde d'éthylène (HE-N7Gua) après inhalation chez le rat (Rusyn *et al.*, 2005). Ceci pourrait être la résultante de capacités de prise en charge des adduits par les systèmes de réparation différentes entre organes.

De manière surprenante, l'analyse de l'ADN extrait de ces différents prélèvements a montré que le cerveau était l'organe qui contenait le plus d'adduits aux temps les plus courts. Pourtant, il n'est usuellement pas décrit comme un organe cible de l'ypérite. Il est toutefois connu que le gaz moutarde est capable, une fois dans le sang, de traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le cerveau. En effet Drash *et al.*, qui ont dosé l'ypérite dans différents tissus d'un soldat iranien mort 7 jours après une exposition à l'ypérite, ont montré que le cerveau était un des organes qui en contenait le plus (10.7 mg/kg) (Drasch *et al.*, 1987). Cette accumulation du gaz moutarde dans le cerveau peut s'expliquer par la teneur en acides gras, le cerveau étant après le tissu adipeux, l'organe le plus riche en lipides. D'ailleurs Drash *et al.* ont dosé plus d'ypérite dans le tissu adipeux (15.1 mg/kg) et dans la peau avec la graisse sous-cutanée (11.8 mg/kg) (Drasch *et al.*, 1987). Il a également été montré que d'autres agents alkylants, direct comme l'oxyde d'éthylène ou indirect comme le chlorure de vinyle, étaient capables de former des adduits dans le cerveau (Mutlu *et al.*, 2012; Rusyn *et al.*, 2005). Les résultats obtenus dans le cerveau pourraient être associés avec les atteintes du système nerveux central constatées chez les victimes d'une exposition sévère à l'ypérite (Balali-Mood

Discussion générale

and Hefazi, 2005a; Dacre and Goldman, 1996). En outre, il a été décrit qu'une exposition percutanée chronique à l'ypérite engendrait une perturbation des fonctions cognitives chez la souris (Sharma *et al.*, 2009).

Après le cerveau, ce sont les poumons qui contiennent le plus d'adduits, suivis par les reins, la rate et le foie. Le fait que le foie soit l'organe où la formation des adduits soit la plus faible (aucun adduit n'y a été détecté pour les doses 2 et 6 mg/kg) pourrait s'expliquer par la quantité de GSH qu'il renferme. Celle-ci, qui est d'environ 8 $\mu\text{mol/mg}$ de tissus, est en effet plus élevée que dans les autres organes (McConnell *et al.*, 1979). Or il est bien connu que le GSH est capable de former des conjugués avec l'ypérite et de la sorte participe à son élimination (Abel *et al.*, 2011; Black *et al.*, 1992a; Black *et al.*, 1992b; Davison *et al.*, 1961; Kinsey and Grant, 1947). Rusyn *et al.* qui ont dosé l'adduit majoritaire formé par l'oxyde d'éthylène (alkylant direct) ont également montré chez le rat que le foie comptait moins d'adduits que le cerveau ou la rate (Rusyn *et al.*, 2005).

Nos résultats concordent avec ceux obtenus précédemment par Langenberg *et al.* (Langenberg *et al.*, 1998). Ces derniers ont dosé par immunomarquage l'adduit majoritaire de l'ypérite dans les poumons, la rate, le foie, le sang, la moelle osseuse et l'intestin grêle de cochon d'Inde après une injection par voie intraveineuse de 8.2 mg/kg d'ypérite (Langenberg *et al.*, 1998). Ils ont mis en évidence que, parmi ces organes, les poumons étaient les plus touchés en termes de fréquence d'adduits à 6 h post-exposition devant la rate et le foie. De manière intéressante, ils ont également dosé l'ypérite dans ces différents prélèvements. Ils ont constaté qu'à 6 h post-exposition, la quantité d'ypérite dans les poumons était identique à celle mesurée dans le sang tandis que celle dosée dans la rate et le foie était supérieure d'un voire deux ordres de magnitude. Ainsi, la formation de HETE-N7Gua ne serait pas directement proportionnelle à la dose d'ypérite mais serait modulée par le contexte physiologique. Cela appuie notre hypothèse expliquant que le foie compte moins d'adduits en raison de la quantité de GSH qu'il renferme et qui piège le gaz moutarde avant son arrivée dans le noyau. Un autre fait remarquable observé par Langenberg *et al.* est que le taux d'adduit en N7 de guanine est 50 fois plus élevé dans les poumons que dans le sang dès 3 min post-exposition (Langenberg *et al.*, 1998).

Une cinétique d'élimination des adduits a été observée dans chacun des organes internes à partir de 6 h ou J1 post-exposition. Les temps de demi-vie de chacun des adduits (dose 60

Discussion générale

mg/kg) sont plus importants dans les poumons que dans le cerveau, ce qui suggère une cinétique de réparation plus lente des dommages dans les poumons que dans le cerveau. De plus, ces résultats expliquent le basculement de la prépondérance des adduits au cours du temps qui sont détectés en plus grande quantité dans les poumons à partir de J7 post-exposition. Si ces résultats étaient confirmés après une exposition par inhalation, ils laisseraient suggérer que, plus que la formation des adduits, c'est leur réparation qui expliquerait que les poumons constituent une cible de l'ypérite.

Comme pour la peau exposée, le temps de demi-vie de HETE-N3Ade est le plus court, ce qui pourrait être la résultante d'une cinétique de dépurination plus rapide comme cela a été montré pour le MMS dans l'ADN de phage T2 (Lawley and Brookes, 1963). De plus, les temps de demi-vie d'adduits en N3 d'adénine formés par des agents alkylants monofonctionnels dans le foie de souris sont également plus courts que ceux en N7 de guanine (Beranek, 1990).

Contrairement à la peau exposée, aucun adduit n'a été détecté dans les organes internes après une exposition cutanée vapeur à l'ypérite et ce quel que soit le temps d'exposition (8 ou 16 min).

La combinaison de tous ces résultats permet de faire ressortir deux autres faits marquants. Tout d'abord, le ratio entre les taux de HETE-N7Gua et de biadduits varie dans l'ordre suivant : peau exposée à de l'ypérite vapeur > peau exposée à de l'ypérite en solution > organes internes \approx monocytes THP1 \approx ADN de thymus de veau. Pour expliquer ces différences, on peut proposer un effet de l'environnement de l'ypérite sur sa forme chimique et notamment la formation de l'ion épisulfonium. La phase vapeur la défavoriserait alors que sa réaction en milieu aqueux ou sa diffusion dans le sang la favoriserait. Une autre possibilité est que l'ypérite réagisse dans certains cas sous forme de dérivés de petites molécules.

La seconde observation concerne la fonction barrière de la peau. En effet, nous n'avons observé que peu de diffusion radiale ou de passage dans les organes internes à 2 et 6 mg/kg. A l'inverse, la formation d'adduits au site exposé est proportionnelle à la dose entre 2 et 6 mg/kg mais saturée à 60 mg/kg. Ceci suggère que la peau peut circonscrire localement les effets d'une brûlure du 1^{er} et du 2^{ème} degré mais que pour une brûlure du 3^{ème} degré sa fonction barrière est rompue.

Comme il a été précédemment décrit, une augmentation de la quantité d'adduits entre 6 h et J1 a été observée pour les doses d'exposition les plus faibles dans certains organes internes.

Discussion générale

De plus la diminution du taux d'adduits (en pourcentage) entre 6 h et J1 est plus faible dans les organes internes que dans la peau pour la dose d'exposition 60 mg/kg. Ces observations suggèrent la constitution d'un réservoir d'ypérite à partir duquel elle serait libérée et continuerait d'alkyler l'ADN de ces organes. Certaines études ont localisé ce réservoir dans la peau, et plus précisément dans les membranes des cellules épidermiques (Chilcott *et al.*, 2001; Hattersley *et al.*, 2008). Smith *et al.* sont les premiers à avoir mis en évidence la constitution d'un tel réservoir et que celui-ci était extractible (Smith *et al.*, 1919). En effet, ils ont montré que le contact direct entre un volontaire exposé à de l'ypérite vapeur et un volontaire non exposé provoquait chez ce dernier une brûlure (Smith *et al.*, 1919). Ces résultats ont été confirmés par Hattersley *et al.* qui ont montré la constitution d'un réservoir de gaz moutarde jusque 24 h dans des explants de peau humaine et porcine aussi bien en conditions occlusives (peau recouverte) qu'en conditions non occlusives (peau en contact avec l'air) (Hattersley *et al.*, 2008). Ces chercheurs ont de plus constaté que la quantité d'ypérite extraite dépassait largement celle requise pour provoquer une manifestation clinique chez l'homme (Hattersley *et al.*, 2008).

Nous avons donc évalué l'effet de l'élimination de ce réservoir sur la persistance des adduits en nous appuyant, pour le choix des doses de traitement et les temps de sacrifice des animaux, sur les résultats précédemment obtenus. Dans la mesure où la fréquence des adduits était maximale au temps 6 h dans la peau, nous avons choisi d'effectuer la détersion à 4 h post-exposition. Celle-ci a été réalisée avec le système hydrochirurgical Versajet[®]. Ce système est notamment employé pour éliminer les tissus nécrotiques issus de brûlures thermiques (Duteille and Perrot, 2012). Il a de plus été employé pour la décontamination chirurgicale de peaux de porcs exposés à l'ypérite afin de faciliter leur cicatrisation (Evison *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2008). En outre, le système hydrochirurgical Versajet[®] s'est également révélé efficace pour faciliter la cicatrisation de la peau d'une victime exposée accidentellement à l'ypérite en France (Boudana *et al.*, 2010).

Sur les deux doses d'exposition testées, 6 et 60 mg/kg, la détersion de la peau exposée 4 h post-exposition avec le système hydrochirurgical Versajet[®] a eu un effet positif pour la dose d'exposition la plus élevée comme en témoigne la diminution de la fréquence de HETE-N7Gua et N7Gua-ETE-N7Gua 3 et 7 jours post-exposition. Ces résultats confirment la constitution d'un réservoir d'ypérite dans la peau à partir duquel l'ypérite continue d'être libérée et de former des adduits jusqu'au moins J3 et J7 post-exposition.

Discussion générale

Pour chacun des deux types d'exposition (liquide et vapeur), nous avons réservé une partie de l'ADN extrait des organes internes afin de doser la 8-oxo-dGuo, biomarqueur du stress oxydant au niveau de l'ADN. Nous voulions étudier si la quantité de cette dernière augmentait en réponse à la déplétion du GSH observée précédemment dans différents modèles (Jafari, 2007; Kumar *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2000; Pohanka *et al.*, 2013; Tewari-Singh *et al.*, 2011; Vijayaraghavan *et al.*, 2008) mais également chez les vétérans iraniens (Shohrati *et al.*, 2010). Par opposition à l'absence d'effets de l'exposition cutanée liquide sur le taux de 8-oxo-dGuo quel que soit le temps étudié (6 h à J21) pour la dose 60 mg/kg, une modulation de ce taux a été observée au temps 6 h (seul temps étudié) après une exposition à des vapeurs saturantes d'ypérite pendant 16 min. Ces résultats sont très surprenants en ce sens qu'aucun adduit de l'ypérite n'a été décelé après une exposition vapeur contrairement à l'exposition liquide. Des études supplémentaires sont clairement nécessaires afin de comprendre l'effet de la voie d'exposition sur le taux de 8-oxo-dGuo mesuré dans les organes internes. En accord avec ce que nous suspicions, une augmentation de la quantité de 8-oxo-dGuo a été constatée dans le foie et le cerveau par rapport aux taux basaux (foie et cerveau de souris non exposées). Cette augmentation est proportionnellement plus importante dans le foie que dans le cerveau. Les hépatocytes sont les principales cellules, avec un type particulier de macrophages, impliquées dans le stockage du fer (Andrews, 2000). Celui-ci est réalisé au niveau de la ferritine, protéine qui peut accumuler jusqu'à 4500 atomes de fer (Andrews, 2000). Une hypothèse peut être formulée pour expliquer l'augmentation de plus de 200% de la fréquence de 8-oxo-dGuo dans le foie. La ferritine serait alkylée par l'ypérite, ce qui provoquerait une augmentation du fer libre dans les hépatocytes et par suite plus de dommages oxydatifs au niveau de l'ADN via les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. De façon inattendue, nous avons observé une diminution de la quantité de 8-oxo-dGuo dans les poumons et la rate après l'exposition vapeur pendant 16 min. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat serait que les activités de réparation prenant en charge la 8-oxo-dGuo soient plus importantes dans ces organes que dans le cerveau et le foie.

XI. Impact de l'ypérite sur les activités de réparation

Dans le but d'approfondir la caractérisation de la génotoxicité du gaz moutarde, son impact sur les activités de réparation de l'ADN a été évalué à l'aide de systèmes multiplexés

Discussion générale

permettant de mesurer plusieurs activités d'excision du BER (biopuce oligonucléotidique) et les activités de réparation globale (excision-resynthèse) de différentes lésions prises en charge par le BER et le NER (biopuce plasmide). Pour ce faire, 18 souris SKH-1 ont été exposées à 0.6 et 6 mg/kg d'ypérite. Ces doses ont été choisies afin de garantir une quantité suffisante de protéines extraites dans cette même peau. Quatre et 24 h post-exposition, les animaux ont été sacrifiés et la peau exposée a été biopsiée. Nous avons également prélevé le cerveau, les poumons et les reins, organes pour lesquels nous avons mesuré le taux d'adduits le plus élevé.

Au niveau basal (souris non exposées), les activités d'excision et d'excision-resynthèse mesurées diffèrent pour un même organe en fonction du type de lésions contenues dans les biopuces. Des variations d'activités basales d'excision ont également été observées entre organes pour une même lésion. Ces résultats pourraient être la conséquence d'une différence d'expression génique comme cela a entre autres été montré pour l'expression basale d'APE1 qui est plus élevée dans la rate que dans le cerveau et le foie de rats (Rusyn *et al.*, 2005).

Les activités d'excision mesurées à l'aide de la biopuce oligonucléotidique n'ont pas été affectées par une exposition à l'ypérite (0.6 et 6 mg/kg) dans les organes internes pour les deux temps étudiés (4 et 24 h). Par opposition, certaines de ces activités ont été modulées dans la peau. Parmi les activités d'excision modulées dans la peau exposée, il y notamment celle des sites abasiques (mimés par le THF). Nous avons observé que leur réparation était diminuée par une exposition à l'ypérite aux deux temps étudiés et ce de manière dose-dépendante. Les sites abasiques sont des lésions se formant suite à la dépurination de l'ADN. Ces lésions sont communes puisqu'il a été estimé qu'il s'en formait près de 10000 par jour (Nakamura *et al.*, 1998). Elles sont également formées après la dépurination de bases alkylées comme cela a été illustré pour l'ypérite et de nombreux agents alkylants (Brookes and Lawley, 1960; Loeb and Preston, 1986). En plus d'être cytotoxiques (Friedberg, 2003; Scharer, 2003), les sites abasiques sont connus pour être mutagènes (Loeb and Preston, 1986). Ainsi, la mutagénicité des adduits de l'ypérite pourrait être expliquée en partie par l'instabilité des adduits qu'elle forme. Les sites abasiques sont reconnus et excisés par l'enzyme APE1 (Hoeijmakers, 2001; Robertson *et al.*, 2009). La diminution du taux de coupure des sites abasiques serait donc la conséquence d'une diminution de l'activité APE1. Etant donné que l'ypérite est un puissant agent alkylant, plusieurs niveaux de régulation pourraient expliquer la diminution de l'activité APE1. En effet, l'ypérite pourrait alkyler directement APE1 (au niveau de son site catalytique ou non) et ainsi induire un changement de conformation de

Discussion générale

l'enzyme qui inhiberait son activité. Elle pourrait également alkyler l'ADN au niveau du gène codant pour APE1 et ainsi diminuer son expression voire son induction en réponse à l'accroissement du nombre de sites abasiques. Le gaz moutarde pourrait aussi alkyler l'ARNm d'APE1 et empêcher ainsi sa traduction en protéine par les ribosomes. En outre, ces différents niveaux de régulation pourraient aussi concerner des protéines impliquées dans la régulation de la synthèse ou l'activité d'APE1. Une autre hypothèse pourrait expliquer la diminution de l'activité APE1. Celle-ci concernerait les conséquences potentielles de la déplétion du GSH. En effet, comme celui-ci est compartimenté dans la cellule, notamment dans le noyau (Vivancos *et al.*, 2010), et qu'il est impliqué dans le maintien du statut oxydoréducteur des groupements thiols protéiques, l'activité d'APE1 pourrait être diminuée en réponse à la perte de l'homéostasie oxydoréductrice nucléaire consécutive à la déplétion du GSH. La baisse d'activités de réparation a déjà été constatée en réponse avec l'induction d'un stress oxydatif généré par le peptide amyloïde β , peptide impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Forestier *et al.*, 2012). A l'inverse, les effets antioxydants du sélénium ont été associés avec une augmentation des activités de réparation de l'ADN (de Rosa *et al.*, 2012).

Une modulation des activités d'excision-resynthèse a été observée dans la peau mais également dans les reins dès 4 h post-exposition. Ce résultat infirme l'hypothèse, qui aurait pu être émise suite à l'absence de modulation des activités glycosylase dans les organes internes, selon laquelle la quantité d'ypérite ayant traversé la barrière cutanée 4 et 24 h post-exposition ne serait pas suffisante pour affecter les activités de réparation dans les organes internes. Cette modulation de certaines activités d'excision-resynthèse va globalement dans le sens d'une diminution. Par opposition, un retour au taux basal entre les doses 0.6 et 6 mg/kg des activités de réparation après leur diminution entre l'absence d'exposition et la dose 0.6 mg/kg a été observée dans les reins. Ces résultats suggèrent l'existence d'un effet seuil dans cet organe à partir duquel certaines activités de réparation seraient spécifiquement induites.

A 24 h post-exposition, les activités d'excision-resynthèse sont globalement plus nombreuses à être modulées qu'après le temps 4 h. C'est également le cas pour les activités glycosylases dans la peau. De plus, une modulation de certaines activités globales de réparation est observée dans le cerveau, ce qui n'était pas le cas à 4 h post-exposition. En outre les activités modulées à 4 h dans la peau exposée et les reins le sont également à 24 h. Ces modulations sont généralement toutes des baisses d'activités de réparation. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. La première, que nous avons précédemment constatée en évaluant la persistance des adduits après détertion de la peau

Discussion générale

exposée, serait que l'ypérite continue d'être relarguée à partir de son réservoir cutané et potentiellement aussi à partir des tissus adipeux pour continuer d'impacter négativement les enzymes de réparation. La seconde serait que la réponse cellulaire vis-à-vis de certains types de dommages serait plus longue pour être effective. En effet la réponse cellulaire face à l'endommagement de l'ADN comprend plusieurs étapes parmi lesquelles la reconnaissance du dommage, sa signalisation et l'activation de protéines effectrices comme p53 qui vont alors réguler l'expression génique et l'activité de nombreuses protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (Li *et al.*, 2013; Vogelstein *et al.*, 2000; Zhou and Elledge, 2000). Il a été récemment décrit que ces différentes étapes étaient influencées par l'horloge circadienne. Les rythmes circadiens, comme par exemple le cycle éveil/sommeil, sont les manifestations extérieures d'un système chronobiologique interne dont le contrôle est situé dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (Reppert and Weaver, 2002). Actuellement, seules des données pour les activités du NER indiquent que ce système de réparation est contrôlé par l'horloge circadienne (Sancar *et al.*, 2010). En effet, l'analyse des activités de réparation du NER pendant 24 h dans plusieurs tissus de souris a révélé que ces activités de réparation avaient une forte rythmicité circadienne notamment dans le cerveau et le foie, ce qui n'est pas le cas dans les testicules (Kang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2009).

Il a été montré *in vitro* que le NER était impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN induits par l'ypérite et ce notamment à travers des études de survie cellulaire en présence de cellules proficientes ou déficientes pour le NER (Jowsey *et al.*, 2012; Matijasevic *et al.*, 2001; Matijasevic and Volkert, 2007). Nous avons évalué si cela était également le cas *in vivo*. Pour cela, une corrélation associant la fréquence des adduits déterminée par HPLC-MS/MS et les activités de réparation du NER mesurées avec la biopuce plasmide a été recherchée. Une corrélation négative reliant le taux de HETE-N7Gua et celui de N7Gua-ETE-N7Gua aux activités d'excision-resynthèse des lésions générées par le cisplatine et le psoralène a été obtenue pour les temps courts (6 et 4 h). Autrement dit, plus le taux d'adduits est élevé et plus les activités de réparation du cisplatine et du psoralène sont faibles. Ces résultats confirmeraient de manière indirecte l'importance du NER dans la prise en charge des adduits formés par l'ypérite. Ces données pourraient aussi montrer que les organes ayant été exposés à la plus forte quantité d'ypérite sont ceux où la réparation est la plus affectée.

Plus généralement, il a été décrit que le NER était impliqué dans la réparation des monoadduits générés par différents types d'agents alkylants et également dans celle des pontages intra et inter-brins (Dronkert and Kanaar, 2001; Jung and Lippard, 2007; Noll *et al.*, 2006; Sancar, 1996).

Chapitre 8: Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le travail effectué a permis de mieux caractériser la génotoxicité de l'ypérite via la quantification des dommages à l'ADN (HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua) qu'elle forme.

Pour cela, dans un premier temps, nous avons mis au point la première méthode de détection quantitative de ces trois adduits par HPLC-MS/MS que nous avons ensuite étendue à celle des adduits formés par le CEES, analogue monofonctionnel de l'ypérite largement utilisé dans la littérature. Une partie importante de la mise au point a été consacrée à l'aspect quantitatif du dosage en relation avec l'instabilité des adduits. Ces derniers ont été détectés sous leur forme base modifiée. Nous avons procédé à la validation analytique de notre méthode et avons évalué la distribution des adduits *in vitro* dans de l'ADN isolé et dans celui de monocytes THP1 après traitement aux mêmes concentrations d'ypérite et de CEES. Nous avons ainsi caractérisé la distribution des adduits de l'ypérite qui est la suivante : HETE-N7Gua > N7Gua-ETE-N7Gua > HETE-N3Ade. Nous avons également constaté que le CEES formait en proportion plus d'adduit en N7 de guanine que l'ypérite. En outre, les résultats obtenus dans l'ADN cellulaire ont montré que l'ypérite formait dix fois plus de monoadduits que son analogue.

Nous avons ensuite, dans un deuxième temps, appliqué notre méthode à l'étude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris SKH-1 après une exposition cutanée.

Après une exposition cutanée liquide, la fréquence maximale des adduits (lorsqu'ils étaient détectables) a été obtenue à 6 h ou J1 post-exposition pour l'ensemble des échantillons récoltés (peau exposée, poumons, foie, cerveau, reins et rate) et toutes les doses étudiées (2, 6 et 60 mg/kg). Les fréquences des trois adduits étaient dose-dépendantes et la même distribution que celle observée *in vitro* a été obtenue (HETE-N7Gua > N7Gua-ETE-N7Gua > HETE-N3Ade). Une diminution de la fréquence des adduits a été ensuite constatée. Cependant, leur persistance est relativement importante dans la mesure où l'adduit majoritaire et le biadduit ont été détectés dans la peau exposée 3 semaines après exposition. Dans les organes internes, HETE-N7Gua a également été détecté J21 post-exposition à la dose 60 mg/kg.

En quantifiant les adduits de l'ypérite dans des échantillons de peau non directement exposés, nous avons également mis en évidence pour la première fois sa capacité à diffuser

Conclusion et perspectives

radialement dans la peau. Toutefois, cette diffusion est limitée dans l'espace. Dans le but d'évaluer l'effet de la diffusion de l'ypérite et des adduits générés dans ces échantillons de peaux, il serait intéressant de quantifier les cellules apoptotiques et de comparer les résultats à ceux obtenus dans la peau exposée. Nous avons en effet observé dans cette dernière une corrélation positive entre la fréquence des adduits mesurée à 6 h et le nombre de cellules apoptotiques déterminé à 24 h pour les doses 6 et 60 mg/kg. Il serait également intéressant d'observer si la diffusion radiale de l'ypérite induit une augmentation de la perte insensible en eau comme cela a été visualisé dans la peau exposée. La mesure de la perte insensible en eau dans la peau exposée s'est de plus révélée étroitement corrélée aux observations macroscopiques concernant la sévérité maximale de la brûlure, celle-ci ayant été déterminée à J4 post-exposition.

Dans les organes internes, nous avons observé que les adduits étaient essentiellement détectés pour la dose 60 mg/kg, dose provoquant une brûlure du 3^{ème} degré. Les résultats obtenus ont montré qu'il se formait plus d'adduit dans le cerveau, devant les poumons, les reins, la rate et le foie. Plusieurs études complémentaires pourraient être entreprises afin de mieux comprendre la disparité de la formation des adduits de l'ypérite entre organes. Il serait particulièrement intéressant de doser l'ypérite dans ces différents tissus comme cela a été effectué par Langenberg *et al.* afin de confirmer ou non l'absence de corrélation positive entre quantité de gaz moutarde reçue dans un organe et formation des adduits (Langenberg *et al.*, 1998). Il serait également intéressant de doser l'ypérite dans les lymphocytes sanguins. Il en est de même pour les adduits qu'elle génère à savoir HETE-N7Gua, HETE-N3Ade et N7Gua-ETE-N7Gua mais aussi le nouvel adduit que nous avons identifié et qui se forme après sa conjugaison avec le GSH, vraisemblablement au niveau du groupement thiol de la cystéine. Les données préliminaires pour cet adduit indiquent qu'il se formerait en position N7 de guanine. Cela reste à confirmer par l'obtention de données en résonance magnétique nucléaire. En le détectant *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu constater qu'il s'en formait globalement autant que le biadduit. Le dosage de l'ypérite et des adduits qu'elle génère dans le sang pourraient confirmer la constitution du réservoir d'ypérite que nous avons mis en évidence via son élimination par détersion et la diminution subséquente de la persistance des adduits dans le cerveau et les poumons à J3 et J7 post-exposition. L'accès aux adduits dans le sang serait aussi un biomarqueur surtout s'ils sont aussi persistants que dans la peau et les organes. Le dosage du GSH dans les organes permettrait de vérifier l'hypothèse émise pour expliquer que le foie soit l'organe qui compte le moins d'adduits, à savoir la détoxification du gaz moutarde via sa conjugaison au GSH. Pour cela, il faudrait également doser ce conjugué

Conclusion et perspectives

(GSH-ypérite) ainsi que ses dérivés (Nac-ypérite et Cys-ypérite). Nous avons commencé à mettre au point une méthode de quantification de ces conjugués qui pourraient également servir de biomarqueurs d'exposition via leur dosage dans le sang (lymphocytes et plasma).

Après une exposition cutanée vapeur, nous avons mis en évidence comme pour l'exposition cutanée liquide une dose réponse de la fréquence des adduits. Nous avons montré que la quantité de monoadduits déterminée après une exposition vapeur pendant 16 min était identique à celle obtenue après une exposition pendant 4 h à 2 mg/kg. La quantité de biadduits mesurée était toutefois deux fois plus élevée suite à l'exposition vapeur. Pour cette dernière, contrairement à l'exposition cutanée liquide, aucun adduit n'a été décelé dans les organes internes de même que dans les peaux adjacente et éloignée. Il y a clairement là un effet de l'état de l'ypérite (vapeur/en solution) sur la formation des adduits. Cet effet, nous l'avons également visualisé en dosant la 8-oxo-dGuo dans les organes internes après les deux types d'exposition (cutanée liquide et cutanée vapeur). Aucun effet de l'exposition cutanée liquide à 60 mg/kg n'a été observé sur le taux basal de 8-oxo-dGuo. En revanche, après une exposition cutanée vapeur, celui-ci a été augmenté dans le cerveau et le foie tandis qu'il a été diminué dans les poumons et la rate. N'ayant pas dosés la 8-oxo-dGuo dans la peau du fait qu'elle contient moins d'ADN, il serait intéressant de le faire après ces deux types d'exposition. Cela permettrait de mettre en évidence une éventuelle différence de diffusion percutanée en fonction de l'état de l'ypérite (paracellulaire vs intracellulaire) qui expliquerait les résultats obtenus dans les organes internes.

Il serait également extrêmement intéressant d'évaluer une autre voie d'exposition plausible dans le cas d'une attaque terroriste ou d'une exposition accidentelle, à savoir l'effet de l'inhalation, sur toutes les molécules citées précédemment (adduits, conjugués et 8-oxo-dGuo). Celles-ci pourraient à moyen terme être suivies dans le cadre de l'évaluation d'essais thérapeutiques (Schéma 53).

La quasi-totalité des activités de réparation étudiées (excision et excision-resynthèse) qui ont été modulées suite à l'exposition à l'ypérite, l'ont été négativement. Autrement dit, l'exposition au gaz moutarde diminue ces activités de réparation. Ces résultats illustrent son effet doublement génotoxique avec la formation des adduits et l'inhibition d'activités de réparation.

Conclusion et perspectives

La diminution du taux de coupure des sites abasiques par APE1 a été observée dans la peau à 4 et 24 h post-exposition et ce de manière dose-dépendante. Or, les adduits formés par l'ypérite sont connus pour être instables, se dépuriner et former des sites abasiques. Ces derniers sont cytotoxiques et mutagènes (Friedberg, 2003; Loeb and Preston, 1986; Scharer, 2003). Il serait par conséquent intéressant de connaître plus précisément les mécanismes par lesquels le gaz moutarde diminue l'activité APE1.

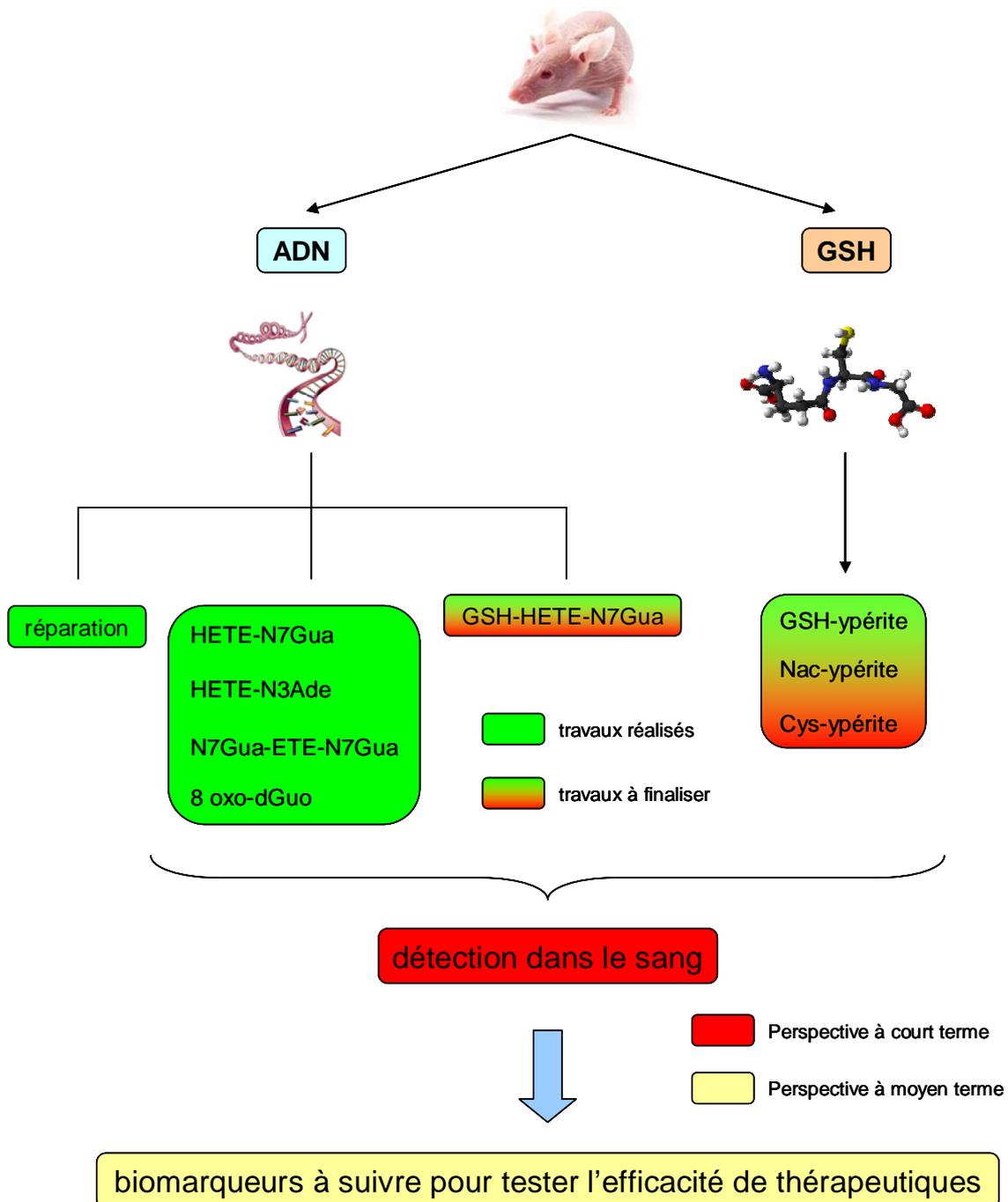


Schéma 53 : *Perspectives à court et à moyen terme des travaux effectués avec l'ypérite*

Conclusion et perspectives

Des résultats préliminaires dans des modèles cellulaires humains (kératinocytes primaires et cellules épithéliales alvéolaires) ont été obtenus avec le CEES. Nous avons pu mesurer les adduits à l'ADN qu'il forme dans ces deux modèles pour des concentrations non cytotoxiques. De plus, nous avons dosé les conjugués formés par le GSH avec le CEES (GSH-CEES) ainsi que ses dérivés (Nac-CEES et Cys-CEES) pour lesquels nous avons mis au point une méthode de détection quantitative par HPLC-MS/MS. Parmi ces conjugués, nous avons essentiellement détecté Cys-CEES. Celui-ci peut soit être formé par conjugaison du CEES avec la cystéine libre dans les cellules ou soit résulter de la métabolisation du glutathion par des enzymes spécifiques, les transpeptidases. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir ces résultats préliminaires en dosant le GSH et la cystéine libre dans les cellules, en mesurant l'activité des transpeptidases à la fois dans les cellules et dans le milieu de traitement (elles sont sécrétées) ou encore d'évaluer l'effet d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration en GSH sur la formation de Cys-CEES mais aussi sur celle des adduits.

Chapitre 9: Conditions expérimentales

I. Culture cellulaire

1. Produits et matériel

Les milieux de culture (« Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 » ou DMEM-F12, « RPMI 1640 Medium, GlutaMaxTM, HEPES » ou RPMI 1640 et « Keratinocyte-SFM L-glutamine » ou KSFM), le sérum de veau fœtal (SVF), les acides aminés non essentiels (MEM/NEAA), la trypsine/EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique), la pénicilline-streptomycine, les extraits pituitaires de bovins (BPE), le facteur de croissance endothélial (EGF), le PBS sans calcium et sans magnésium (DPBS), la L-glutamine ont été fournis par Invitrogen (Cergy Pontoise, France). La primocine a été achetée chez Invivogen (Toulouse, France). Le MTT et le PBS avec calcium et magnésium (PBS) ont été obtenus chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

En fonction des expériences, les cellules ont été cultivées dans des flasques (75 ou 175 cm²) ou dans des plaques 24 puits qui ont été fournies par Beckton Dickinson (Pont-de-Claix, France) de même que les tubes utilisés pour la récolte des cellules et les cryotubes pour leur congélation.

Pour les kératinocytes primaires et les cellules épithéliales alvéolaires A549, le comptage a été effectué à l'aide du compteur automatique CountessTM de chez Invitrogen. Pour les monocytes THP1, il a été réalisé à l'aide de lames à usage unique (Kovas Slide[®], Hycor, Garden Grove, Californie, USA). Dans les deux cas, un volume de 10 µL de cellules en suspension est mélangé à 10 µL de bleu de trypan. Le principe du comptage des cellules, automatique ou manuelle, repose sur la capacité des cellules vivantes à ne pas internaliser le bleu de trypan (colorant d'exclusion) contrairement aux cellules mortes.

Pour l'extraction d'ADN, tous les produits utilisés ont été obtenus chez Sigma, excepté l'éthanol (Carlo Erba, Milan, Italie) et l'EDTA (Amresco, Solon, Ohio, USA).

2. Monocytes THP1

La lignée tumorale THP1 a été originellement isolée à partir du sang d'un jeune donneur atteint de leucémie (ATCC, Rockville, Maryland, USA). Les cellules, qui croissent en suspension, ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² (volume final 50 mL) à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de dioxyde de carbone (CO₂). Le milieu de culture RPMI 1640

Conditions expérimentales

supplémenté par 10% de SVF décomplémenté (chauffé à 50°C pendant 30 min), 1% (v/v) de MEM/NEAA et 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine (5000 U/mL et 5000 µg/mL, respectivement) a été utilisé. Les cellules ont été divisées 2 fois par semaine à raison d'une division au 1/5^{ème} pour chaque passage. Pour cela, les cellules en suspension sont homogénéisées et 10 mL de cette suspension sont réparties dans une nouvelle flasque de culture. Les cellules ont été comptées avant chaque expérience et 10 à 20 millions de cellules ont été traitées pour chaque point expérimental (dosage des adduits de l'ypérite et du CEES).

3. Kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires qui ont été cultivées ont été isolées à partir d'explants de biopsies mammaires.

3.1. Isolement des kératinocytes primaires

Les biopsies ont été transportées dans un tube de 50 mL et pouvaient être conservées 48h au maximum à 4°C dans du milieu DMEM-F12 supplémenté par 5% (v/v) de pénicilline-streptomycine.

Les échantillons de peau ont été placés du PBS contenant 0.4% (v/v) de bétadine pendant 15 min à température ambiante (TA). Ils ont ensuite été transvasés dans des boîtes de Pétri contenant 10 mL de PBS auquel a été ajouté 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine. Puis ils ont été traités un par un en les plaçant dans le couvercle de la boîte de Pétri où ils ont été étalés du côté épiderme. Le tissu adipeux a alors été retiré à l'aide d'un scalpel et les échantillons de peau ont été incubés à 4°C sur la nuit dans une solution de trypsine (0.5% v/v) à laquelle a été ajoutée 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine.

Les échantillons de peau ont été incubés le lendemain à 37°C pendant 1 h et ont été ensuite transvasés dans des boîtes de Pétri contenant 10 mL de PBS auquel a été ajouté 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine et 10% (v/v) de SVF. Ils ont de nouveau été traités isolément en les plaçant dans le couvercle de la boîte de Pétri où ils ont été étalés du côté épiderme. Les cellules mortes ont été éliminées par un grattage délicat effectué à l'aide d'un scalpel. Puis, les échantillons ont été placés dans une autre boîte de Pétri contenant 10 mL de PBS auquel a été ajouté 10% (v/v) de pénicilline-streptomycine et 10% (v/v) de SVF. Là, les kératinocytes ont été isolés par un grattage énergique (toujours avec un scalpel) jusqu'à ce que la peau soit

Conditions expérimentales

transparente. Ils ont alors été récupérés avec le PBS, le SVF et la pénicilline-streptomycine dans un tube de 50 mL. Une première filtration des cellules a été réalisée avec une compresse stérile suivie d'une seconde filtration effectuée avec un tamis cellulaire. Les kératinocytes ont alors été centrifugés (10 min, 8000 x g) après comptage (Countess™). Les cellules ont été resuspendues dans du KFSM supplémenté par 25 µg/mL de BPE et 0.9 ng/mL de EGF. Vingt mille à 40000 cellules/cm² ont été réparties dans des flasques de 175 cm² avec un volume final de milieu KFSM de 30 mL. De la primocine a été ajoutée (50 µg/mL final) et les kératinocytes ont été cultivés pendant 15 jours à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été congelées. Pour cela elles ont tout d'abord été rincées avec 15 mL de PBS, puis ont été trypsinées avec 4 mL de trypsine/EDTA pendant 2 min à 37°C (0.5g/L trypsine, 0.2 g/L EDTA). Les cellules, qui croissent en adhérant aux flasques, ont alors été décollées et centrifugées (5 min, 800 x g) après comptage. Les kératinocytes ont été repris dans du SVF contenant 10% (v/v) de DMSO (milieu de congélation). Des cryotubes contenant 2 millions de kératinocytes ont été congelés à -80°C avant d'être conservés dans de l'azote liquide.

3.2. Culture des kératinocytes primaires

Pour nos études préliminaires sur les nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite (voir p.213) des kératinocytes primaires ont été utilisés. Leur isolement avait été effectué par d'autres. Ces derniers ont été cultivés dans des flasques de 75 cm² (volume final de 15 mL) dans les mêmes conditions que citées précédemment. Les kératinocytes primaires ont été divisés une fois par semaine, une division au 1/10^{ème} étant nécessaire à chaque passage. Pour cela, ils ont été rincés avec 10 mL de PBS puis trypsinés comme indiqué plus haut avec 2 mL de trypsine. L'action de cette dernière a été arrêtée avec du PBS contenant 10% (v/v) de SVF. Les cellules ont été ensuite centrifugées (5 min, 800 x g). Elles ont été resuspendues dans du milieu de culture et réparties dans de nouvelles flasques. Avant chaque expérimentation, les cellules ont été comptées et près de 3 millions de cellules ont été utilisées pour chacun des traitements effectués, 80% d'entre elles ont été utilisées pour doser les adduits du CEES et les 20% restant ont été réservées au dosage des conjugués.

4. Cellules A549

La lignée tumorale A549 a été initialement isolée à partir d'une biopsie d'un cancer du poumon d'un patient de 58 ans (Cell Lines Service, Eppelheim, Allemagne). Les cellules, qui sont adhérentes, ont été cultivées dans des flaques 75 cm² (volume final de 15 mL) à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Le milieu DMEM-F12 supplémenté par 10% de SVF, 1% (v/v) de MEM/NEAA, 1% (v/v) de L-glutamine à 200 mM et 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine a été utilisé. Les cellules ont été divisées deux fois par semaine à raison d'une division au 1/8^{ème} par passage. Pour cela, les cellules ont été rincées avec du PBS puis trypsinées dans les mêmes conditions que les kératinocytes primaires. L'action de la trypsine a été interrompue par l'ajout de milieu de culture. Les cellules ont été ensuite centrifugées (5 min, 1200 x g). Elles ont été resuspendues dans du milieu de culture et réparties dans de nouvelles flasques. Avant chaque expérimentation, les cellules ont été comptées et près de 10 millions de cellules ont été utilisées pour chacun des traitements effectués, 80% d'entre elles ont été utilisées pour doser les adduits du CEES et les 20% restantes ont été réservées au dosage des conjugués.

A l'issue des différentes expérimentations réalisées avec les kératinocytes primaires et les cellules A549, une fraction des milieux de traitement (milieu de culture ou PBS) a été récupérée. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS et trypsinées. L'action de la trypsine a été stoppée par l'ajout de PBS contenant 10% (v/v) de SVF. Puis, elles ont été centrifugées et congelées sous forme de culot sec à -80°C avant l'extraction d'ADN et des fractions cytosoliques. Pour les monocytes THP1, une fois les traitements effectués, ils ont été centrifugés et congelés dans les mêmes conditions mais seul l'ADN en été extrait.

5. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des différentes cellules cultivées a été effectuée selon un protocole qui a été optimisé au laboratoire (Ravanat *et al.*, 2002). Les membranes plasmiques ont tout d'abord été lysées en ajoutant au culot de cellules un premier tampon (tampon A : sucrose 320 mM, dichlorure de magnésium (MgCl₂) 5 mM, hydrochlorure de trishydroxyméthylaminoéthane (Tris-HCl) 10 mM, déferoxamine 0.1 mM, pH 7.5) contenant 1 % (v/v) de triton X-100. Les noyaux ont été récupérés après centrifugation (5 min, 1500 x g). Puis les membranes

Conditions expérimentales

nucléaires ont été lysées et l'ADN extrait en ajoutant un second tampon (tampon B : EDTA- Na_2 5 mM, Tris-HCl 10 mM, déferoxamine 0.15 mM, pH 8) contenant 0.5% (v/v) de dodécylsulfate de sodium. L'ARN a été hydrolysé en utilisant les RNases A (100 mg/mL) et T1 (1 U/ μL) à 37°C pendant 15 min. Les échantillons ont été incubés pendant 1 h à 37°C après l'ajout de 15 μL protéase de K (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ADN a été précipité par ajout de 2 volumes de solution tamponnée d'iodure de sodium (EDTA- Na_2 20 mM, iodure de sodium 7.6 M, Tris-HCl 40 mM, déferoxamine 0.3 mM, pH 8) et 3.3 volumes de propan-2-ol absolu. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation (5 min, 5000 x g) a ensuite lavé successivement par du propan-2-ol (40%, v/v) et de l'éthanol (70%, v/v), chaque lavage étant accompagné d'une centrifugation (5 min, 5000 x g). Le culot d'ADN a finalement été resuspendu dans 100 μL de déferoxamine 0.1 mM et congelé (-20°C) avant sa digestion.

6. Extraction de la fraction cytosolique et dosage des protéines

Vingt pourcent des cellules traitées ont été réservées pour le dosage des conjugués dans la fraction cytosolique des kératinocytes primaires et des cellules A549. Les membranes plasmiques ont été lysées par l'ajout de 200 μL d'un tampon (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine (HEPES) 10 mM, MgCl_2 1.5 mM, chlorure de potassium (KCl) 10 mM, dithiothréitol (DTT) 1 mM, pH 7.9) contenant 0.01% (v/v) de triton X-100 et par 3 cycles de congélation/décongélation (azote liquide/TA). La lyse a été vérifiée dans 3 échantillons après coloration au bleu de trypan. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (5 min, 10000 x g) et la fraction cytosolique (surnageant) a été récupérée.

Une partie de cette dernière a été utilisée pour le dosage des protéines. Celui-ci a été effectué à l'aide d'un « kit » utilisant l'acide bicinchoninique (MicroBCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, Illinois, USA). Cette méthode repose sur un dosage colorimétrique de la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines en milieu alcalin. Les ions Cu^+ interagissent avec l'acide bicinchoninique pour former un complexe violet.

Une dilution au 1/250^{ème}, 1/500^{ème} et au 1/1000^{ème} de chacune des fractions cytosoliques extraites a été préparée. Cent μL de chacune de ces dilutions a été déposée dans une plaque 96 puits. Cent μL de réactif (acide bicinchoninique 50%, carbonate et bicarbonate de sodium 48% ainsi que tartrate de sodium 2% dans de la soude 0.1 M) ont été préparés extemporanément et ensuite ajoutés aux différentes dilutions. La plaque 96 puits a alors été incubée pendant 1 h à 60 °C afin d'activer les processus réactionnels. La lecture de la

Conditions expérimentales

coloration a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 560 nm (SpectraMax[®] M2, Molecular Devices, Sunnyvale, Californie, USA). La quantification a été réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage obtenue avec l'albumine sérique bovine (BSA).

7. Test de cytotoxicité

Les kératinocytes primaires et les cellules A549 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 150000 cellules/mL. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 48h à l'issue desquelles elles ont été exposées à une gamme de 7 concentrations de CEES (de 0.1 à 10 mM). Pour ce faire, le milieu de culture a été aspiré et a été remplacé par du PBS. C'est dans ce dernier que les cellules ont été exposées aux différentes concentrations de CEES pendant 1 h sur la glace. A l'issue de l'exposition, le PBS a été aspiré et remplacé par 200 µL de milieu de culture. Les cellules ont alors été incubées pendant 24 h à 37°C. Ensuite, 20 µL d'une solution de MTT (5 mg/mL) (Sigma) ont été ajoutés à chacun des puits et les cellules ont été à nouveau incubées à 37°C pendant 2h. La formation des cristaux de formazan par la succinate déshydrogénase a alors été dosée à 560 nm. Le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé par rapport aux cellules qui n'ont pas été traitées au CEES.

II. Animaux et exposition à l'ypérite

Les expérimentations effectuées sur les souris SKH-1 ont toutes été soumises et approuvées par le comité d'éthique de l'IRBA et ce en accord avec la législation européenne (décret 86/609/CEE) et française (87/848) régissant l'expérimentation animale. Tous les moyens possibles ont été employés afin de diminuer la souffrance des animaux et réduire le nombre de sujets au cours des expériences.

1. Animaux

Les souris SKH-1 mâles âgés de 4 à 6 semaines et pesant environ 30 g ont été obtenues des laboratoires Charles River (L'Abresle, France). Une fois réceptionnés, les animaux ont été acclimatés pendant 7 jours dans un environnement contrôlé où une période de jour (lumière

Conditions expérimentales

artificielle de 7 à 19h) était alternée avec une période de nuit (obscurité de 19h à 7h). La température ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) et l'hygrométrie ($45\pm 10\%$) ont été régulièrement contrôlées. La stabulation a été effectuée dans des cages transparentes adaptées aux souris (cages de type III 820 cm², Charles River) qui y ont été placées par groupe de 4 à 6. Les souris ont eu un accès illimité à la nourriture (M20, Dietex, Saint Gratien, France) et à l'eau (eau de robinet).

2. Ypérite et sécurité

L'ypérite ou bis(2-chloroethyl) sulfide (densité : 1.26, mass moléculaire : 159.08g/mol, pureté > 95% par analyse en GC-MS) a été fournie par la direction générale de l'armement (Vert-Le-Petit, France). Elle a été stockée à -20°C dans un laboratoire à accès restreint. Pour les expositions, elle a été décongelée extemporanément à TA sous une hotte chimique (Filtair XL 9156 HEPA/Carbone, Captair[®], Val de Reuil, France) équipée d'un filtre à charbon actif (volume : 0.8m³, vitesse d'aspiration : 0.5 m/s).

Deux types d'exposition cutanée ont été effectués, une exposition à de l'ypérite diluée dans du dichlorométhane et une exposition à des vapeurs saturantes de gaz moutarde. Pour ces deux types d'exposition, des précautions maximales ont été adoptées afin de prévenir une exposition accidentelle pouvant survenir par inhalation ou par projection de liquide. Ces précautions comprenaient le port d'un masque de protection à vision panoramique (ANPVP) munie d'une cartouche filtrante A2B2P3, d'une triple paire de gants (nitrile/butyle/nitrile) et d'une combinaison étanche Tychem[®] (Dupont, Personal Protection, Puteaux, France) couvrant la tête, le corps et les membres jusqu'aux poignets et chevilles.

Pour chacune des expérimentations effectuées, deux membres habilités de l'IRBA étaient présents : l'expérimentateur qui manipulait l'ypérite sous la hotte chimique et l'aide technique qui renseignait des fiches de suivi établies pour chacune des souris exposées.

3. Anesthésie et analgésie des animaux

Un mélange de chlorhydrate de kétamine (Imalgène 1000[®], 100 mg/mL, Merial, Lyon, France) et de diazépam (Valium[®], 5 mg/mL, Roche, Neuilly-sur-Seine, France) a été utilisé pour l'anesthésie des souris. Chaque anesthésique a été dilué dans une solution de NaCl stérile et a été filtré à l'aide d'un filtre PVDF (polyfluorure de vinyldène) de porosité 0.22 µM. Le mélange anesthésique a été constitué extemporanément à raison de 60% (v/v) de

Conditions expérimentales

diazépam (33.3 mg/kg final) et de 40% (v/v) de chlorhydrate de kétamine (37.5 mg/kg final) et a été administré par injection intra-péritonéale.

Une solution de 100 µL de buprénorphine (Temgesic[®], 0.3 mg/mL, Merck & Co, Levallois-Péret, France) diluée dans du NaCl stérile (0.5 mg/kg final) a été utilisée pour l'analgésie des souris. Elle a été administrée par une injection sous-cutanée dans le cou pendant 3 jours consécutifs (une après l'anesthésie et avant l'intoxication et les deux autres à J1 et J2 post-exposition).

Le mélange d'anesthésique et l'analgésique ont également été administrés aux animaux témoins. Ces souris ont été hébergées dans la salle de stabulation durant les expérimentations.

4. Exposition cutanée à l'ypérite

4.1. Exposition liquide

Le plan de travail de la hotte chimique a été recouvert de champs opératoires et de papiers absorbants sur lesquels les souris ont été placées en décubitus ventral. La zone d'exposition, située au niveau de la région dorso-lombaire, a été délimitée à l'aide d'un marquage d'une zone circulaire de 0.28 cm² (Dorandeu *et al.*, 2011). Deux microlitres d'ypérite en solution dans du dichlorométhane (doses 2, 6 et 60 mg/kg) ont été déposés au niveau de cette zone à l'aide d'une pipette à déplacement positif (Microman[®] M10, Gilson, Middleton, Michigan, USA). Les souris ont été exposées pendant 4 h. Elles ont été placées par groupe de 4 dans des cages à compartiments cloisonnés avec de la nourriture à disposition jusqu'à l'étape de décontamination.

4.2. Exposition vapeur

Pour les expositions des souris à des vapeurs saturantes d'ypérite, un système occlusif réalisé à l'IRBA (Schéma 54), aucune version commerciale n'étant disponible, a été employé. Ce système est composé d'un bouchon à vis en propylène (8 mm de diamètre, FisherBrand[®], Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) utilisé pour l'HPLC. Afin d'assurer son étanchéité, il dispose d'un septum UltraClean en silicone/téflon. Un disque de 8 mm de diamètre en papier filtre Whatman[®] (Brandel Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) a été inséré

Conditions expérimentales

dans le fond du bouchon. Du ruban adhésif double face découpé en anneau circulaire a été apposé sur le pourtour de la base du bouchon afin de pouvoir fixer le dispositif sur la peau des souris. Dix μL d'ypérite ont été déposées sur le papier filtre et le système occlusif a été immédiatement placé sur la zone à exposer à l'aide d'une pince métallique. Avec ce système, les vapeurs sont générées à partir de l'ypérite liquide qui est volatile. La saturation de la chambre d'exposition survient lorsque les phases gazeuse et liquide sont en équilibre dans des conditions environnementales données. La surface de ce système occlusif est d'environ 50 mm^2 pour un volume d'approximativement 50 mm^3 . Les souris ont été exposées pendant 8 ou 16 min. A l'issue de l'exposition, le système occlusif a été retiré et placé dans un conteneur à Javel sous la hotte. Les souris ont alors été placées par groupe de 4 dans des cages à compartiments cloisonnés avec de la nourriture à disposition jusqu'à l'étape de décontamination.

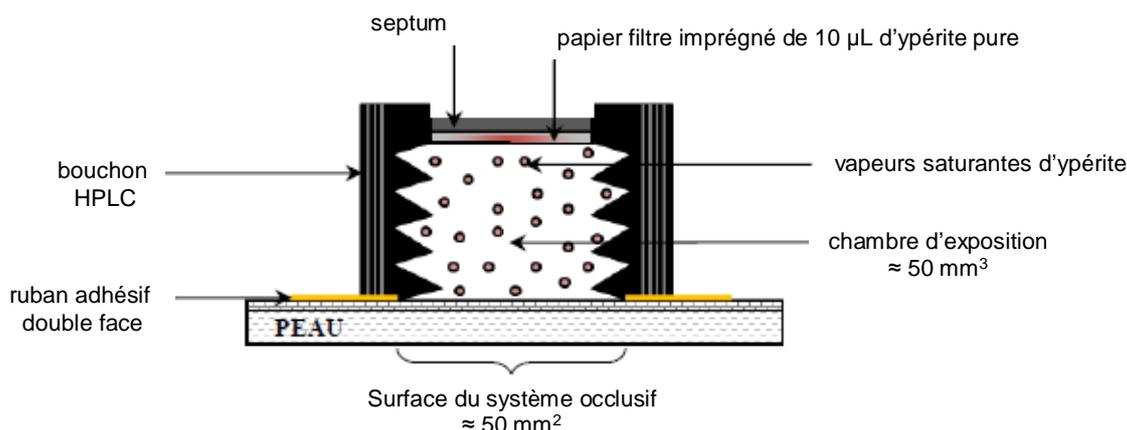


Schéma 54 : Système occlusif utilisé pour exposer les souris SKH-1 à des vapeurs saturantes d'ypérite

(d'après IRBA/département de toxicologie)

5. Décontamination

Une décontamination des peaux exposées a été réalisée 4 h post-exposition à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 0.8% (v/v) de chlore actif dans le but de minimiser le transfert de contaminations des souris vers les expérimentateurs. Pour cela, des éponges naturelles (environ $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}$) imbibées de solution d'hypochlorite de sodium ont été utilisées pour essuyer délicatement la peau exposée. Au total, 30 passages ont été effectués.

Conditions expérimentales

Les souris décontaminées ont alors été placées dans des cages propres et laissées sous la hotte chimique pendant 24 h post-exposition (celles sacrifiées aux temps 4 et 6 h post-exposition l'ont été sous la hotte) pour favoriser l'élimination des vapeurs de toxique. Elles ont été ensuite transférées dans la salle de stabulation jusqu'à la fin des expérimentations.

Les éléments de protection (masque, gants butyles) ainsi que le matériel placé sous la hotte chimique et devant être récupéré ont été décontaminés par essuyage avec une compresse imprégnée de solution d'hypochlorite de sodium (0.8 % v/v de chlore actif) puis désinfectés à l'alcool 70% (v/v).

6. Mesure de la perte insensible en eau

La perte insensible en eau correspond à un flux de vapeur d'eau diffusant de manière passive à travers la peau. Sa mesure permet d'évaluer l'intégrité de la fonction barrière de la peau. Sa valeur (exprimée en $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) est en effet inversement proportionnelle à cette dernière.

La perte insensible en eau a été mesurée à l'aide d'un évaporimètre (AquaFlux[®] AF200, Biox Ltd, Londres, Royaume-Uni). Celui-ci est composé d'une sonde dont le diamètre de l'orifice (6 mm) est adapté à la taille des lésions générées lors de nos expositions. La sonde comporte une chambre de mesure qui est dite « fermée » du fait de la création d'un microclimat indépendant des conditions ambiantes, ce qui rend la mesure plus précise (Elkeeb *et al.*, 2010). Le principe de la mesure repose sur la création d'un gradient d'humidité par diffusion passive entre la peau (zone de forte humidité) et le condensateur (zone de faible humidité) qui se trouve dans la chambre de mesure. Avant chaque utilisation, une ligne de base a été obtenue par calibration de la sonde. Pour cela, la chambre de mesure a été refroidie à -7.65°C pendant 20 min, permettant ainsi à la mesure de se stabiliser.

La mesure de la perte insensible en eau a été effectuée après anesthésie des animaux. Celle-ci permet de faciliter la prise de la mesure et de réduire le stress des animaux qui peut affecter les paramètres physiologiques (Hildebrandt *et al.*, 2008). Pour cela un dispositif d'anesthésie gazeuse à induction rapide (Minerve, Esternay, France) et adapté au petit animal a été employé. L'induction de l'anesthésie a été réalisée en réglant le débitmètre à 2L/min et l'évaporateur à 3% d'isoflurane (Nicholas Piramal India Ltd, Londres, Royaume-Uni) dans 100% d'oxygène. La souris respirait le gaz anesthésiant dans un masque. Une fois anesthésiée, la concentration d'isoflurane a été abaissée à 2%.

Conditions expérimentales

Pour mesurer la perte insensible en eau, la sonde a été appliquée perpendiculairement à la surface de la peau exposée. Les données ont été enregistrées à l'aide d'un logiciel fourni par le fabricant.

7. Détersion

Pour effectuer la détersion des peaux exposées, le système hydrochirurgical Versajet[®] (Smith & Nephew, Le Mans, France) a été employé (voir p.174). Les souris ont été anesthésiées (isoflurane 2%) et de la buprénorphine a été administrée par injection sous-cutanée dans le cou (100 µL à 0.05 mg/kg) avant la détersion et les deux jours suivants. Les souris ont été placées en décubitus ventral sur le plan de travail (champs opératoires, papiers absorbants) d'une hotte hors fonctionnement. En raison de l'épaisseur fine de la peau des souris SKH-1, la détersion a été effectuée par des mouvements latéraux durant 1 à 2 min. Elle a été arrêtée lorsque la plaie présentait des microhémorragies (atteinte du derme). La puissance du débit de sérum physiologique stérile (NaCl 0.9% v/v, Freelex[®], Fresenius Kabi, Sèvres, France) a été réglée à 109-138 mL/min (pression de 192-332 bars). Les zones lésées ont été détergées totalement en débordant légèrement sur les zones périphériques saines.

8. Prélèvements des tissus

Les souris ont toutes été sacrifiées par une injection intra-péritonéale de 100 mg/kg de pentobarbital sodique (Doléthal[®], Vétoquinol, Lure, France). La peau exposée ainsi que deux autres échantillons de peau (adjacente et éloignée) ont été prélevés. Pour ce faire, la peau du dos des souris a entièrement été prélevée aux ciseaux et fixée par des aiguilles au niveau de ses quatre extrémités sur une plaque de dissection.

Pour la mesure des adduits à l'ADN, les échantillons de peau (trois couches cutanées : épiderme, derme et hypoderme) ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce (« punch ») comportant une lame cylindrique de 8 mm de diamètre standardisée (Stiefel Laboratories, GSK, Reuil-Malmaison, France).

Pour la quantification des cellules apoptotiques, une zone délimitée de 1.5 cm x 1.5 cm comportant la zone lésée a été prélevée au scalpel et disposée sur un socle en polystyrène à l'aide d'aiguilles. Le tout (peau + socle) a alors été déposé dans une solution neutre tamponnée contenant 10 % (v/v) de formol (Sigma) pendant 48h à TA.

Conditions expérimentales

Pour prélever les organes internes (poumons, foie, reins et rate), les souris ont été placées sur le dos et une boutonnière a été effectuée en avant de l'orifice urinaire à l'aide d'une pince fine et de ciseaux. La peau a alors été incisée le long de la ligne médiane puis rabattue vers l'extérieur. Une deuxième boutonnière a alors été effectuée au niveau de la paroi musculaire abdominale. La paroi a ensuite été incisée le long de la ligne médiane jusqu'à la pointe du sternum. Le plastron thoracique a été découpé et détaché en incisant le diaphragme.

Le cerveau a été prélevé en pratiquant une incision au niveau de la nuque de l'animal. La peau a ensuite été retirée jusqu'au niveau du museau. La paroi musculaire au niveau du cou a été incisée. Les ciseaux ont alors été placés à l'intérieur de la colonne vertébrale juste en arrière du cervelet et deux incisions latérales en direction des oreilles ont permis l'ouverture de la boîte crânienne.

9. Quantification des cellules apoptotiques

Une fois fixée dans la solution neutre tamponnée contenant 10% de formol, les peaux exposées ont été incluses dans la paraffine (Histomed[®], Labo-Moderne, Pais, France). Pour cela, elles ont été rincées pendant une nuit dans de l'eau courante avant d'être déshydratées dans des bains d'éthanol et de butanol de concentration croissante. Trois bains successifs de 2, 3 puis 5h à 56-58°C ont été effectués pour l'inclusion en paraffine. Les blocs de paraffine ont été coupés en tranches transversales de 7 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Leica RM2145, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Pour favoriser l'adhérence des coupes, les tranches de peau ont été étalées sur des lames à surface silanisée (Lame Starfrost[®], Microm Microtech, Francheville, France).

Le marquage des cellules apoptotiques a été réalisé avec la méthode TUNEL en utilisant le « kit » DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System (PromegaBiosystems Inc., Sunnyvale, Californie, USA). Le principe de cette méthode repose, comme son nom l'indique, sur le transfert de 2'-désoxyuridine triphosphate (dUTP) marquée. Ce transfert est réalisé par la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) au niveau des groupements 3'OH libres des fragments d'ADN caractéristiques de la mort cellulaire apoptotique (voir p.93).

Le marquage a été réalisé selon le protocole du fournisseur. La paraffine a tout d'abord été retirée en immergeant les coupes de peau dans un bain de xylène pendant 5 min à TA. Elles ont ensuite été rincées dans de l'éthanol 100 % pendant 5 min. Les coupes de peau ont été réhydratées par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations décroissantes (100%,

Conditions expérimentales

95%, 85%, 70%, 50%) pendant 3 min à TA. Une immersion des coupes de peau dans une solution de NaCl (0.85% v/v) a été effectuée pendant 5 min à TA suivie d'une autre dans du PBS dans les mêmes conditions. Les coupes de peau ont ensuite été fixées par immersion dans un bain de PBS contenant 4% (v/v) de formol pendant 25 min à 4°C, puis lavées dans du PBS seul (2 x 5 min). Les coupes de peau ont été perméabilisées par immersion dans du PBS contenant 0.2% (v/v) de triton X-100 (5 min). Elles ont été ensuite lavées (immersion dans un bain de PBS à TA, 2 x 5 min). Les coupes de peau ont été égouttées. Puis, 100 µL du tampon d'équilibration ont été ajoutés et les coupes de peau ont été laissées à TA pendant 5 à 10 min supplémentaires. Le tampon d'équilibration a été complètement retiré à l'aide de papier absorbant. Le marquage à proprement dit a été réalisé en ajoutant 50 µL de mélange réactionnel (pour chaque coupe) contenant la TdT et en incubant les coupes de peau 1 h à 37°C. La réaction a été stoppée en immergeant les coupes de peau dans la solution SSC pendant 15 min. Puis elles ont lavées dans du PBS (3 x 5 min) et séchées avec du papier absorbant. Les coupes de peau marquées ont été examinées sous microscope (AxioCam Mrc5, Carl Zeiss, Allemagne) et les cellules apoptotiques ont été comptées dans au moins 5 champs sélectionnés au hasard (grossissement x 200) en utilisant le logiciel Axivision Rel version 4.6 (Carl Zeiss).

10. Broyage des tissus et extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des biopsies de peaux a été effectuée en utilisant le « kit » «DNEasy[®] Blood & Tissue (Qiagen). La première étape a été de réaliser un broyage à froid en utilisant un pilon refroidi dans de l'azote liquide (Mouret *et al.*, 2006). Trois cent soixante µL de tampon ATL ont été ajoutés à chaque échantillon de peau broyé. Une première lyse des tissus a été réalisée en ajoutant la protéinase K pendant la nuit à 55°C. Après un traitement à la RNase A (100 µg/mL), une seconde étape de lyse a été effectuée en ajoutant 400 µL de tampon AL (70°C, 10 min). Les échantillons ont alors été introduits dans des colonnes après avoir ajouté 400 µL d'éthanol absolu. Les débris cellulaires ont été éliminés par l'ajout successif des tampons AW1 et AW2, précédé à chaque fois d'une centrifugation (1 min, 6000 x g). Finalement, l'ADN a été élué des colonnes après ajout de 200 µL d'eau ultrapure et centrifugation (1 min, 6000 x g). Il a été congelé (-20°C) avant sa digestion.

La totalité des organes internes prélevés a été broyés excepté le foie (1/3 à 1/4 en a été broyé). Le broyage a été effectué à l'aide d'un broyeur de tissus constitué d'un tube

Conditions expérimentales

cylindrique en verre borosilicaté et d'un piston en métal à embout rond en téflon (Dutscher, Brumath, France). Le piston a été fixé au niveau d'un agitateur RZR 2020 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Allemagne). Chaque organe a été placé dans le tube en verre avec 1.5 mL de tampon A. Le broyage a été réalisé en plaçant le tube en verre contenant l'organe et le tampon autour du piston sous agitation pendant 30 s à 2 min en fonction des organes. L'extraction d'ADN a ensuite été réalisée comme cela a décrit précédemment (voir p.274). Le culot d'ADN a finalement été resuspendu dans 100 µL de déferoxamine 0.1 mM et congelé (-20°C) avant sa digestion.

III. Digestion de l'ADN

Toutes les enzymes et les réactifs utilisés pour la digestion ont été achetés chez Sigma. Seule la phosphodiesterase I a été fournie par Worthington (Lakewood, New Jersey, USA).

Les échantillons d'ADN extraits des cellules ou des organes (volume de 100 µL), ont été digérés (Douki *et al.*, 2004; Frelon *et al.*, 2000) en ajoutant 11 µL d'un premier tampon (acide succinique 50 mM, CaCl₂ 25 mM, acétate d'ammonium 75 mM, pH 6), 1 U de nucléase P1, 5 U de désoxyribonucléase II et 0.05 U de phosphodiesterase II. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 2h à 37°C. Puis, pour chaque échantillon, 13 µL d'un second tampon (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8), 2 U de phosphatase alcaline et 0.03 U de phosphodiesterase I. Les échantillons ont alors été incubés à 37°C pendant 2h.

Contrairement aux échantillons d'ADN réservés à l'analyse de la 8-oxo-dGuo, l'hydrolyse des échantillons destinés à celle des adduits de l'ypérite et du CEES a été poursuivie en les chauffant à 90°C pendant 20 min. Cela permet de dépuriner complètement les adduits instables formés par ces deux toxiques (voir p.135).

IV. Analyses HPLC-MS/MS

1. Analyse des dommages à l'ADN

Une fois l'ADN des cellules et des organes digéré, il a été analysé en utilisant un système HPLC Agilent LC 1100 series (Agilent Technologies, Massy, France) couplé à un spectromètre de masse en mode tandem Api 3000 (PerkinElmer/SCIEX, Thornhill, Canada). Toutes les analyses ont été effectuées en mode positif. Le système HPLC est composé d'une pompe binaire, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV-visible placé en sortie de colonne. Une colonne de silice greffée en phase réverse C₁₈ Nucleodur HTec (2 x 125 mm, 3 µM, système HPLC 1) de chez Macherey-Nagel (Düren, Allemagne) a été utilisé pour certaines analyses (voir p.130). D'autres analyses (voir p.135) ont été effectuées avec une colonne de silice greffée en phase réverse C₁₈ Uptipshere ODB (2 x 150 mm, 5 µM, système HPLC 2) de chez Interchim (Montluçon, France).

L'élution a été réalisée à un débit de 200 µL/min avec un gradient d'acétonitrile (ACN) (VWR, Fontenay-Sous-Bois, qualité HPLC) dans une solution aqueuse de formiate d'ammonium 2 mM (0-15 min : 0-7% ACN, 15-30 min : 7-15% ACN, 30-35 min : 30% ACN). Pour la 8 oxodGuo, l'élution a également été effectué à un débit de 200 µL/min avec un gradient de méthanol (MeOH) (Carlo Erba, qualité HPLC) dans une solution aqueuse de formiate d'ammonium 2 mM (0-25 min : 2-10% MeOH, 25-35 min : 10-25% MeOH, 35-40 min : 25% MeOH).

La solution aqueuse de formiate d'ammonium 2 mM a été préparée en mélangeant de l'acide formique (pureté > 96%) et une solution d'ammoniaque (pureté >99.9%) qui ont tous deux été obtenus chez Sigma.

2. Analyse des conjugués du CEES

Les conjugués du CEES ont été analysés dans les fractions cytosoliques et les milieux de traitement (milieu de culture et/ou PBS) des kératinocytes primaires (voir p.217) et des cellules A549 (voir p.221). Pour cela, les fractions cytosoliques ont été extraites (voir p.275) et elles ont été filtrées, de même que les milieux de traitement, à l'aide de tubes de centrifugation avec filtre (Whatman, Maidstone, Royaume-Uni). Après centrifugation (5 min,

Conditions expérimentales

5000 x g) Ils ont alors analysés dans le même système que précédemment décrit avec un gradient linéaire d'ACN (0-33 min : 0-35% ACN) dans une solution aqueuse de formiate d'ammonium 2 mM.

V. Mesure des activités de réparation

Contrairement à l'extraction d'ADN qui a pu être réalisée après la congélation à -80°C des différents tissus prélevés, l'extraction des protéines a été réalisée le jour même du sacrifice des animaux afin de préserver les activités de réparation. De plus, les différentes étapes des modes opératoires décrits ci-dessus ont été effectuées à 4°C.

Les protéines des organes prélevés (peau exposée, poumons, reins, cerveau) ont été extraites par broyage à l'aide du TissueRuptor[®] (Qiagen) après les avoir finement découpés. Le broyage a été réalisé pendant 20 à 30 s dans 2 mL de tampon (HEPES/hydroxyde de potassium (KOH) 90 mM, KCl 0.8M, EDTA 2 mM, glycérol 20% v/v, DTT 1 mM, pH 7.8) contenant 0.25 % (v/v) de triton X-100. Une lyse par congélation/décongélation (azote liquide/4°C) a alors été effectuée puis 150 µL d'un autre tampon ont été ajoutés (HEPES/KOH 45 mM, EDTA 0.25 mM, glycérol 2% v/v, fluorure de phénylméthane sulfonyle 17.9 µg/mL, pH 7.8) et une nouvelle lyse par congélation/décongélation a été réalisée. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (5 min, 16000 x g, 4°C) et le surnageant a été récupéré. Une partie de ce surnageant a été prélevé afin de doser les protéines (voir p.275). Il a été congelé à -80°C avant la mesure des activités de réparation.

1. Mesure des activités d'excision (biopuce oligonucléotidique)

Trois étapes pour la mesure des activités d'excision des glycosylases peuvent être distinguées à savoir la fonctionnalisation de la biopuce oligonucléotidique qui comprend les deux premières étapes (fonctionnalisation avec les oligonucélotides support puis fonctionnalisation de ces derniers avec les oligonucléotides contenant les lésions préalablement hybridés avec des oligonucléotides de séquences complémentaires) et la mesure d'activité à proprement parler (Pons *et al.*, 2010).

Conditions expérimentales

Le support de la biopuce oligonucléotidique consiste en une lame de verre recouverte de streptavidine (XanTec bioanalytics, Düsseldorf, Allemagne). La fonctionnalisation de la biopuce est réalisée par le dépôt d'oligonucléotides (ODN) support de 25 nucléotides (Eurogentec, Liège, Belgique) biotinylés en 5', ce qui permet une interaction streptavidine-biotine. Ce dépôt est effectué par un robot de dispense (sciFLEXARRAYER S5, Scienion, Berlin, Allemagne). Les biopuces oligonucléotidiques sont constituées de 24 pavés, chaque pavé comprenant lui-même 20 ODN supports. Quatre de ces biopuces peuvent être insérées dans une plaque 96 puits, délimitant ainsi des chambres réactionnelles où des extraits protéiques peuvent réagir avec les ODN d'un pavé (Photo 8).

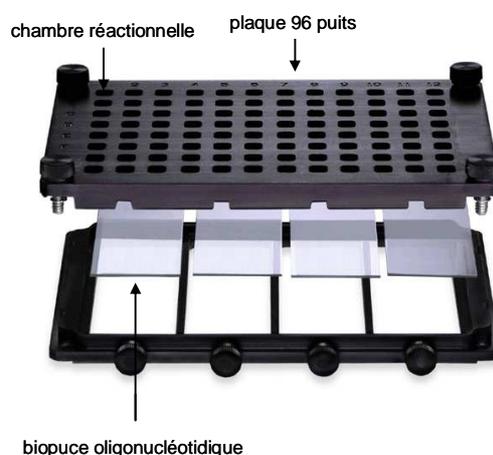


Photo 8 : *Format plaque 96 puits de la biopuce oligonucléotidique*

Des ODN de 22 nucléotides contenant des lésions spécifiques (ODN « lésion ») (voir p.190), situées entre les nucléotides 6 et 9 en 3', et marqués au Cy3 en 3' (Eurogentec) sont hybridés avec des ODN (ODN « longs de 42 nucléotides) de séquences complémentaires. L'hybridation est réalisée pendant 5 min à 80 °C en mélangeant les ODN « lésion » (0.625 μ M) et les ODN « long » (0.5 μ M) dans du PBS contenant 0.2 M de NaCl. En plus d'être complémentaires aux ODN « lésion », ces derniers sont également complémentaires aux ODN support, ce qui permet de connaître précisément le positionnement des duplexes d'ODN sur la biopuce. L'hybridation des duplexes {ODN « lésion » / ODN « long »} avec les ODN support est effectuée pendant 1 h à 37°C en ajoutant 80 μ L de ces duplexes à la biopuce fonctionnalisée après l'avoir au préalable rincée 3 fois avec du PBS contenant 0.2M de NaCl. La biopuce est alors de nouveau rincée (3 x 5 min) avec le tampon d'excision (HEPES/KOH 10 mM, acide éthylèneglycol-tétraacétique 2 mM, KCl 0.1 mM, dichlorure de zinc 0.1 mM, DTT 1 mM, pH 7.8).

Conditions expérimentales

Les extraits protéiques des différents tissus prélevés ont été dilués (10 µg/mL final) dans du tampon d'excision contenant 0.5 mg/mL de BSA et ont été déposés à raison de 80 µL par puits. Les biopuces ont alors été incubées pendant 1 h à 37°C. A l'issue de l'incubation, elles ont été lavées (3 x 5 min) dans une solution de PBS contenant 0.2 M de NaCl et 0.1% (v/v) de tween puis séchées en les centrifugeant (3 min, 100 x g) et en les plaçant 5 min à 37°C. La lecture de la fluorescence résiduelle a été effectuée à l'aide d'un scanner GenePix[®] Professional 4200A (Molecular Devices) à 532 nm. Les ODN « lésions » étant présents en 2 copies dans chaque pavé et les extraits testés dans deux pavés, les données ont été normalisées en utilisant un logiciel développé spécifiquement au laboratoire («NormalizeIt»).

2. Mesure des activités d'excision-resynthèse (biopuce plasmide)

Afin de mesurer les activités d'excision-resynthèse, les plasmides sont tout d'abord amplifiés en cultivant des bactéries *Escherichia Coli* qui avaient été préalablement transfectés (Millau *et al.*, 2008). Pour ce faire, du milieu Luria-Bertoni (LB) (peptone 10 g/L, extrait de levure Bacto 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7) stérilisé à 121°C pendant 15 min a été utilisé. Les bactéries sont cultivées dans 250 mL de milieu LB contenant 100 µL d'ampicilline pendant 1 nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, elles sont centrifugées (10 min, 4000 x g) et le surnageant est éliminé. A cette étape les bactéries peuvent être stockées à -80°C.

Les plasmides sont ensuite purifiés en utilisant le kit Plasmid Purification (Qiagen). Les culots bactériens sont repris dans 10 mL de tampon P1 puis 10 mL de tampon P2 sont ajoutés et le tout est laissé à TA pendant 5 min. Dix mL de tampon P3 sont ensuite ajoutés et le tout est incubé à 4°C pendant 15 min. Le mélange est alors centrifugé (30 min, 4000 x g, 4°C) et les flocons restant à la surface sont éliminés. Les solutions sont placées au niveau des colonnes qui sont alors rincées deux fois avec 30 mL de tampon QC. L'ADN est ensuite élué par ajout de 10 mL de tampon QF puis précipité en ajoutant 10 mL de propan-2-ol et 1 mL d'acétate de sodium 3 M (Pierce) et en centrifugeant (30 min, 4000 x g, 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN lavé avec de l'éthanol 70% (v/v) et centrifugé (10 min, 4000 x g, 4°C). Le surnageant est de nouveau éliminé et l'ADN repris dans 200 µL de PBS. Il est alors dosé à l'aide du NanoDrop[®] 3300 (Thermo Scientific, Illkirch, France) et stocké sous forme d'aliquots de 1 mg/mL à -80°C.

Les plasmides sont modifiés par différents agents physiques ou chimiques (voir p.194) et sont ensuite déposés (40 µg/mL final) par un robot de dispense (Scienion) au niveau de lames

Conditions expérimentales

recouvertes d'hydrogel (BMT Biosystems, Woodbridge, Connecticut, USA). Les biopuces sont alors stockées à 4°C.

Les extraits protéiques des différents tissus prélevés ont été dilués (0.4 mg/mL final) dans un tampon (HEPES/KOH 45 mM, MgCl₂ 7 mM, DTT 0.5 mM, glycérol 3.4% v/v, phosphocréatine 10 mM, EDTA 2 mM, créatine phosphokinase 50 µg/mL, BSA 0.1 mg/mL, ATP 1 mM, désoxyadénosine triphosphate/désoxyguanosine triphosphate/désoxythymidine triphosphate 0.4 µM, pH 7.8) contenant 6.25 pM de dCTP marquée au Cy3 (Dutcher).

Les biopuces ont été laissées à température ambiante pendant 10 min pour éviter la formation de condensation et ont été recouvertes d'un cadre d'hybridation adhésif (Schéma 55). Les extraits protéiques dilués ont été déposés à raison de 25 µL par puits et les biopuces ont ensuite été incubés pendant 2h à 37°C. A la fin de l'incubation, le cadre adhésif a été retiré et les biopuces ont été lavées dans une solution de PBS contenant 0.05 % (v/v) de tween (2 x 3 min). Elles ont alors été séchées en les centrifugeant (3 min, 100 x g) et en les plaçant à 37°C pendant 5 min. La lecture de la fluorescence et la normalisation des données ont été réalisées avec les mêmes outils précédemment décrits.

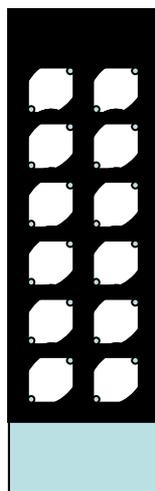


Schéma 55 : Cadre adhésif utilisé pour la biopuce plasmide

VI. Analyses statistiques

Les données ont été analysées en utilisant les logiciels Statistica 8.0 (StatSoft, Maison-Alfort, France). Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± l'erreur standard.

Conditions expérimentales

Afin de comparer l'effet de la dose et du temps sur la formation et la persistance des adduits de l'ypérite, sur la formation de la 8oxo-dGuo et sur les valeurs de perte insensible en eau, les données ont été analysées en utilisant le test U de Mann-Whitney (comparaison de paires indépendantes).

Pour la comparaison de la formation des adduits de l'ypérite entre organes, les données ont été analysées en utilisant le test des rangs signés de Wilcoxon (comparaison de paires dépendantes).

La comparaison des temps de demi-vie des adduits dans les différents tissus de même que la recherche de corrélation entre le taux d'adduits et le nombre de cellules apoptotiques ont été effectuées en utilisant le test de Student.

Pour évaluer l'impact de la concentration d'ypérite sur les activités de réparation, les données ont été analysées en utilisant le test de Tuckey.

Pour les études de corrélation entre la fréquence des adduits et les activités de réparation du NER, le test de corrélation de Pearson a été utilisé.

Liste des publications et des communications

Publications / Communications

Article publié

Mohamed Batal, Isabelle Boudry, Cécile Cléry-Barraud, Stéphane Mouret and Thierry Douki (2012) 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.

Article en révision

Mohamed batal, Isabelle Boudry, Stéphane Mouret, Julien Wartelle, Sandi Emorine, Marine Bertony, Izabel Bérard, Cécile Cléry-Barraud and Thierry Douki. Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulphur mustard-exposed skin. (en révision dans *Toxicological and Applied Pharmacology*)

Résumé

Batal, M., Mouret, S., Cléry-Barraud, C., Boudry, I., Douki, T. (2011) Skin lesions and DNA adducts in SKH-1 mice exposed to sulphur mustard. *J Invest Dermatol.* **131**: 2152

Communications orales

M.Batal (2012 et 2013). Etude de la formation et de la persistance des dommages à l'ADN causés par l'ypérite chez l'animal. Journée des thésards CEA/DGA (Paris, 28/03/12 et 18/04/13) et Journée des thésards IRBA (Paris, 28/06/12).

Communications affichées

Batal, M., Mouret, S., Cléry-Barraud, C., Boudry, I., Douki, T. Lésions cutanées et adduits de l'ADN chez la souris sans poils SKH-1 exposée à un agent chimique vésicant: l'ypérite. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Besançon, France, juin 2011.

Batal, M., Boudry, I., Mouret, S., Cléry-Barraud, C., Douki, T. Accurate quantification of mustard gas adducts to DNA by HPLC-mass spectrometry: an analytical challenge. 9th Winter Research Conference, Les Houches, France, mars 2012.

Batal, M., Boudry, I., Mouret, S., Cléry-Barraud, C., Douki, T. Lésions cutanées at adduits de l'ADN chez la souris sans poils SKH-1 exposée à un agent chimique vesicant: l'ypérite. Journée des thésards IRBA, Paris, France, juin 2012. (*prix poster*)

Mohamed Batal, Isabelle Boudry, Stéphane Mouret, Cécile Cléry-Barraud and Thierry Douki. Etude au cours du temps de la formation et de la réparation des dommages à l'ADN causés par l'ypérite dans la peau de souris sans poils SKH-1. Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie, Toulouse, France, novembre 2012.

Batal, M., Boudry, I., Mouret, S., Cléry-Barraud, C., Douki, T. Time course study of sulphur mustard induced DNA damages in the hairless SKH-1 mice. Society of Toxicology's 52nd Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, mars 2013.

Références bibliographiques

Aasted A, Darre E, Wulf HC (1987). Mustard gas: clinical, toxicological, and mutagenic aspects based on modern experience. *Ann Plast Surg* **19**: 330-333.

Abel EL, Bubel JD, Simper MS, Powell L, McClellan SA, Andreeff M, MacLeod MC, 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.

Adair FE, Bagg HJ (1931). Experimental and clinical studies on the treatment of cancer by dichloroethylsulfide (mustard gas) *Ann Surg* **93**: 190-199.

Aghanouri R, Ghanei M, Aslani J, Keivani-Amine H, Rastegar F, Karkhane A (2004). Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**: 1160-1164.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615.

Amir A, Chapman S, Gozes Y, Sahar R, Allon N (1998). Protection by extracellular glutathione against sulfur mustard induced toxicity in vitro. *Hum Exp Toxicol* **17**: 652-660.

Andrews NC (2000). Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* **1**: 208-217.

ANSM (2010) Groupe de travail Piratox/Piratome. Fiche Piratox n°6 : "ypérite et autres moutardes vésicantes". (http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/300eb56375ae294424b36f0561196ef6.pdf, consulté le 3/07/2013)

Arroyo CM, Burman DL, Kahler DW, et al. (2004). TNF-alpha expression patterns as potential molecular biomarker for human skin cells exposed to vesicant chemical warfare agents: sulfur mustard (HD) and Lewisite (L). *Cell Biol Toxicol* **20**: 345-359.

Autrup H, Wakhisi J, Vahakangas K, Wasunna A, Harris CC (1985). Detection of 8,9-dihydro-(7'-guanyl)-9-hydroxyafatoxin B1 in human urine. *Environ Health Perspect* **62**: 105-108.

Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944). Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types . Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **79**: 137-158.

Babin MC, Ricketts K, Skvorak JP, Gazaway M, Mitcheltree LW, Casillas RP (2000). Systemic administration of candidate antivesicants to protect against topically applied sulfur mustard in the mouse ear vesicant model (MEVM). *J Appl Toxicol* **21**: 141-144.

Balali-Mood M, Hefazi M (2005a). The clinical toxicology of sulfur mustard. *Archives of Iranian medicine* **8**: 162-179.

Balali-Mood M, Hefazi M (2005b). The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **19**: 297-315.

Balali-Mood M, Hefazi M (2006). Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **99**: 273-282.

Balali-Mood M, Hefazi M, Mahmoudi M, et al. (2005). Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **19**: 713-721.

Beckman KB, Ames BN (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* **272**: 19633-19636.

Bellomo G, Mirabelli F, Richelmi P, Orrenius S (1983). Critical role of sulfhydryl group(s) in ATP-dependent Ca²⁺ sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver. *FEBS Lett* **163**: 136-139.

Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, Khan MA, Shields PG, Harris CC (1999). Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol* **187**: 8-18.

Beranek DT (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* **231**: 11-30.

Beranek DT, Heflich RH, Kodell RL, Morris SM, Casciano DA (1983). Correlation between specific DNA-methylation products and mutation induction at the HGPRT locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* **110**: 171-180.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21.

Black AT, Hayden PJ, Casillas RP, Heck DE, Gerecke DR, Sinko PJ, Laskin DL, Laskin JD (2010a). Expression of proliferative and inflammatory markers in a full-thickness human skin equivalent following exposure to the model sulfur mustard vesicant, 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol* **249**: 178-187.

Black AT, Joseph LB, Casillas RP, Heck DE, Gerecke DR, Sinko PJ, Laskin DL, Laskin JD (2010b). 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.

Black RM, Brewster K, Clarke RJ, Hambrook JL, Harrison JM, Howells DJ (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 RM, Hambrook JL, Howells DJ, Read RW (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.

Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40**: 359-369.

Boudana DA, Wolber A, De Broucker V, Martinot-Duquennoy V, Pellerin P (2010). The use of Versajet hydrosurgery system in the treatment of vesicant burn caused by sulphur mustard: a propos of one case. *Burns* **36**: 44-48.

Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J, Swenberg JA (2009). The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat Res* **678**: 76-94.

Bransfield LA, Rennie A, Visvanathan K, Odwin SA, Kensler TW, Yager JD, Friesen MD, Groopman JD (2008). Formation of two novel estrogen guanine adducts and HPLC/MS detection of 4-hydroxyestradiol-N-7-guanine in human urine. *Chem Res Toxicol* **21**: 1622-1630.

Brookes P, Lawley PD (1960). The reaction of mustard gas with nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J* **77**: 478-484.

Brookes P, Lawley PD (1961a). The alkylation of guanosine and guanylic acid. *J Chem Soc* **766**: 3923-3928.

Brookes P, Lawley PD (1961b). The reaction of mono- and di-functional alkylating agents with nucleic acids. *Biochem J* **80**: 496-503.

Brookes P, Lawley PD (1963). Effects of alkylating agents on T2 and T4 bacteriophages. *Biochem J* **89**: 138-144.

Butterfield DA, Koppal T, Howard B, et al. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* **854**: 448-462.

Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131**: 1-87.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* **424**: 9-21.

Cadet J, Douki T, Ravanat JL (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med* **49**: 9-21.

Cadet J, Douki T, Ravanat JL (2011). Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutat Res* **711**: 3-12.

Cadet J, Poulsen H (2010). Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. *Free Radic Biol Med* **48**: 1457-1459.

Carell T, Burgdorf LT, Kundu LM, Cichon M (2001). The mechanism of action of DNA photolyases. *Curr Opin Chem Biol* **5**: 491-498.

- Casillas RP, Kiser RC, Truxall JA, et al.** (2000). Therapeutic approaches to dermatotoxicity by sulfur mustard I. Modulation of sulfur mustard-induced cutaneous injury in the mouse ear vesicant model. *J Appl Toxicol* **21**: 145-151.
- Chauhan RS, Murthy LVR, Arora U, Malhotra PR** (1996). Structural changes induced by sulphur mustard in rabbit skin. *J Appl Toxicol* **16**: 491-495.
- Chetsanga CJ, Bearie B, Makaroff C** (1982a). Alkaline opening of imidazole ring of 7-methylguanosine. 1. Analysis of the resulting pyrimidine derivatives. *Chem Biol Interact* **41**: 217-233.
- Chetsanga CJ, Makaroff C** (1982). Alkaline opening of imidazole ring of 7-methylguanosine. 2. Further studies on reaction mechanisms and products. *Chem Biol Interact* **41**: 235-249.
- Chetsanga CJ, Polidori G, Mainwaring M** (1982b). Analysis and excision of ring-opened phosphoramidate mustard-deoxyguanine adducts in DNA. *Cancer Res* **42**: 2616-2621.
- Chiesman WE** (1944). Lesions due to vesicants: diagnosis and treatment. *British medical journal* **2**: 109-112.
- Chilcott RP, Dalton CH, Ashley Z, et al.** (2007). Evaluation of barrier creams against sulphur mustard: (II) in vivo and in vitro studies using the domestic white pig. *Cutan Ocul Toxicol* **26**: 235-247.
- Chilcott RP, Jenner J, Carrick W, Hotchkiss SAM, Rice P** (2000). Human skin absorption of bis-2-(chloroethyl)sulphide (sulphur mustard) in vitro. *J Appl Toxicol* **20**: 349-355.
- Chilcott RP, Jenner J, Hotchkiss SA, Rice P** (2001). In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J Appl Toxicol* **21**: 279-283.
- Cillard J, Cillard P** (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **13**: 24-29.
- Clapham DE** (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
- Cleaver JE** (2011). gamma H2Ax: Biomarker of Damage or Functional Participant in DNA Repair "All that Glitters Is not Gold!" *Photochem Photobiol* **87**: 1230-1239.
- Clery-Barraud C, Nguon N, Vallet V, Sentenac C, Four E, Arlaud C, Coulon D, Boudry I** (2013). 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* **19**: 146-156.
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R** (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**: 143-151.
- Couzinet A, Hérincs Z, Hueber A** (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *Medecine/Sciences* **18**: 841-852.

Cowan FM, Broomfield CA, Smith WJ (1991). Effect of sulfur exposure on protease activity in human peripheral blood lymphocytes. *Cell Biol Toxicol* **7**: 239-248.

Cowan FM, Broomfield CA, Smith WJ (1992). Inhibition of sulfur mustard-increased protease activity by niacinamide, N-acetyl-L-cysteine or dexamethasone. *Cell Biol Toxicol* **8**: 129-138.

Crickx B (2005). Understanding the skin. *Ann Dermatol Venereol* **132**: 49-68.

Croy RG, Essigmann JM, Reinhold VN, Wogan GN (1978). Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1745-1749.

Croy RG, Wogan GN (1981a). Quantitative comparison of covalent aflatoxin-DNA adducts formed in rat and mouse livers and kidneys. *J Natl Cancer Inst* **66**: 761-768.

Croy RG, Wogan GN (1981b). Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B1. *Cancer Res* **41**: 197-203.

Cullis PM, Mersondavies L, Weaver R (1995). Conjugation of a polyamine to the bifunctional alkylating agent chlorambucil does not alter the preferred cross-linking site in duplex DNA. *J Am Chem Soc* **117**: 8033-8034.

Cullumbine H (1947). Medical aspects of mustard gas poisoning. *Nature* **159**: 151-153.

Dabrowska MI, Becks LL, Lelli JL, Jr., Levee MG, Hinshaw DB (1996). Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **141**: 568-583.

Dachir S, Cohen M, Kamus-Elimeleh D, Fishbine E, Sahar R, Gez R, Brandeis R, Horwitz V, Kadar T (2012). Characterization of acute and long-term pathologies of superficial and deep dermal sulfur mustard skin lesions in the hairless guinea pig model. *Wound Repair Regen* **20**: 852-861.

Dachir S, Fishbeine E, Meshulam Y, Sahar R, Amir A, Kadar T (2002). Potential anti-inflammatory treatments against cutaneous sulfur mustard injury using the mouse ear vesicant model. *Hum Exp Toxicol* **21**: 197-203.

Dacre JC, Goldman M (1996). Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacological Reviews* **48**: 289-326.

Dahm R (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol* **278**: 274-288.

Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 67-101.

Davison C, Rozman RS, Smith PK (1961). Metabolism of bis-beta-chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas). *Biochem Pharmacol* **7**: 65-74.

Davoudi SM, Keshavarz S, Sadr B, Shohrati M, Naghizadeh MM, Farsinejad K, Rashighi-Firouzabadi M, Zartab H, Firooz A (2009). Skin hydration and transepidermal water loss in patients with a history of sulfur mustard contact: a case-control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **23**: 940-944.

de Rosa V, Erkekoglu P, Forestier A, Favier A, Hincal F, Diamond AM, Douki T, Rachidi W (2012). Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. *Free Radic Res* **46**: 105-116.

Debiak M, Kehe K, Burkle A (2009). Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity. *Toxicology* **263**: 20-25.

Degan P, Shigenaga MK, Park EM, Alperin PE, Ames BN (1991). Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies. *Carcinogenesis* **12**: 865-871.

Denny WA (2001). DNA minor groove alkylating agents. *Curr Med Chem* **8**: 533-544.

Dizdaroglu M (1984). The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links. *J Chromatogr* **295**: 103-121.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* **151**: 1205-1213.

Dorandeu F, Taysse L, Boudry I, Foquin A, Herodin F, Mathieu J, Daulon S, Cruz C, Lallement G (2011). 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**: 470-490.

Douki T (2013). The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods. *Photochem Photobiol Sci*. [Epub ahead of print]

Douki T, Ames BN (1994). An HPLC-EC assay for 1,N²-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Chem Res Toxicol* **7**: 511-518.

Douki T, Martini R, Ravanat JL, Turesky RJ, Cadet J (1997). Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis* **18**: 2385-2391.

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.

Drasch G, Kretschmer E, Kauert G, von Meyer L (1987). Concentrations of mustard gas [bis(2-chloroethyl)sulfide] in the tissues of a victim of a vesicant exposure. *J Forensic Sci* **32**: 1788-1793.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.

Dronkert ML, Kanaar R (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* **486**: 217-247.

Duchovic RJ, Vilensky JA (2007). Mustard gas: Its pre-World War I history. *Journal of Chemical Education* **84**: 944-948.

Duteille F, Perrot P (2012). Management of 2nd-degree facial burns using the Versajet((R)) hydrosurgery system and xenograft: a prospective evaluation of 20 cases. *Burns* **38**: 724-729.

Easton DF, Peto J, Doll R (1988). Cancers of the respiratory tract in mustard gas workers. *British Journal of Industrial Medicine* **45**: 652-659.

Elkeeb R, Hui X, Chan H, Tian L, Maibach HI (2010). Correlation of transepidermal water loss with skin barrier properties in vitro: comparison of three evaporimeters. *Skin Res Technol* **16**: 9-15.

Emad A, Rezaian GR (1997). The diversity of the effects of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single, heavy exposure - Analysis of 197 gases. *Chest* **112**: 734-738.

Emadi SN, Hosseini-Khalili A, Soroush MR, Davoodi SM, Aghamiri SS (2008a). Mustard gas scarring with specific pigmentary, trophic and vascular characteristics (case report, 16-year post-exposure). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **69**: 574-576.

Emadi SN, Mortazavi M, Mortazavi H (2008b). Late cutaneous manifestations 14 to 20 years after wartime exposure to sulfur mustard gas: A long-term investigation. *Archives of Dermatology* **144**: 1059-1061.

Ernster L, Dallner G (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* **1271**: 195-204.

Etezzad-Razavi M, Mahmoudi M, Hefazi M, Balali-Mood M (2006). Delayed ocular complications of mustard gas poisoning and the relationship with respiratory and cutaneous complications. *Clinical and Experimental Ophthalmology* **34**: 342-346.

Evison D, Brown RF, Rice P (2006). The treatment of sulphur mustard burns with laser debridement. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **59**: 1087-1093.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1371-1387.

Fidder A, Moes GWH, Scheffer AG, Vanderschans GP, Baan RA, Dejong 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.

Fidder A, Noort D, de Jong LP, Benschop HP, Hulst AG (1996). N7-(2-hydroxyethylthioethyl)-guanine: a novel urinary metabolite following exposure to sulphur mustard. *Arch Toxicol* **70**: 854-855.

Firooz A, Sadr B, Davoudi SM, Nassiri-Kashani M, Panahi Y, Dowlati Y (2011). Long-term skin damage due to chemical weapon exposure. *Cutan Ocul Toxicol* **30**: 64-68.

Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun* **1**: 163-172.

Forestier A, Douki T, Sauvaigo S, Rosa VD, Demeilliers C, Rachidi W (2012). Alzheimer's disease-associated neurotoxic Peptide amyloid-beta impairs base excision repair in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci* **13**: 14766-14787.

Forman HJ, Zhang HQ, Rinna A (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* **30**: 1-12.

Franz R, Neumann HG (1987). Reaction of trans-4-N-acetoxy-N-acetylaminostilbene with guanosine, deoxyguanosine, RNA and DNA in vitro: predominant product is a cyclic N2,N3-guanine adduct. *Chem Biol Interact* **62**: 143-155.

Frederico LA, Kunkel TA, Shaw BR (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination : determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* **29**: 2532-2537.

Frelon S, Douki T, Ravanat JL, Pouget JP, Tornabene C, Cadet J (2000). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol* **13**: 1002-1010.

Friedberg EC (2003). DNA damage and repair. *Nature* **421**: 436-440.

Friedberg EC, Lehmann AR, Fuchs RPP (2005). Trading places: How do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* **18**: 499-505.

Fronza G, Gold B (2004). The biological effects of N3-methyladenine. *J Cell Biochem* **91**: 250-257.

Fujii S, Fuchs RP (2004). Defining the position of the switches between replicative and bypass DNA polymerases. *Embo J* **23**: 4342-4352.

Fujii T, Saito T, Nakasaka T (1989). Purines. 34. 3-methyladenosine and 3-methyl-2'-deoxyadenosine: their syntheses, glycosidic hydrolysis, and ring fission. *Chemical&Pharmaceutical Bulletin* **37**: 2601-2609.

- Fukui K** (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids* **2010**: 1-16.
- Garcia-Canton C, Anadon A, Meredith C** (2012). gamma H2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: Applications for the assessment of the in vitro genotoxicity of cigarette smoke. *Toxicol Vitro* **26**: 1075-1086.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D** (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Mécanismes biochimiques*: 91-96.
- Gates KS, Noonan T, Dutta S** (2004). Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chem Res Toxicol* **17**: 839-856.
- Gautam A, Vijayaraghavan R** (2007). Prophylactic effect of gossypin against percutaneously administered sulfur mustard. *Biomedical and Environmental Sciences* **20**: 250-259.
- Gautam A, Vijayaraghavan R, Pant SC, Kumar O, Singh S, Kumar HTS** (2007). Protective effect of quercetin against sulphur mustard-induced oxidative stress in mice. *Defence Science Journal* **57**: 707-720.
- Ghanei M, Fathi H, Mohammad MM, Aslani J, Nematizadeh F** (2004). Long-term respiratory disorders of claimers with subclinical exposure to chemical warfare agents. *Inhalation Toxicology* **16**: 491-495.
- Ghanei M, Harandi AA** (2010). Lung Carcinogenicity of Sulfur Mustard. *Clin Lung Cancer* **11**: 13-17.
- Ghanei M, Harandi AA** (2011). Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: a review. *Inhalation Toxicology* **23**: 363-371.
- Ghanei M, Poursaleh Z, Harandi AA, Emadi SE, Emadi SN** (2010). Acute and chronic effects of sulfur mustard on the skin: a comprehensive review. *Cutan Ocul Toxicol* **29**: 269-277.
- Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, et al.** (2012). Long-term ocular consequences of sulfur mustard in lung-injured war veterans. *Cutan Ocul Toxicol* **31**: 33-37.
- Ghasemi H, Owlia P, Jalali-Nadoushan MR, et al.** (2013). A clinicopathological approach to sulfur mustard-induced organ complications: a major review. *Cutan Ocul Toxicol*. [Epub ahead of print]
- Girotti AW** (2001). Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* **63**: 103-113.
- Goda Y, Marnett LJ** (1991). High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for determination of the major malondialdehyde-guanine adduct. *Chem Res Toxicol* **4**: 520-524.

Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**: 37-43.

Goodman MF (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**: 17-50.

Gould NS, White CW, Day BJ (2009). A role for mitochondrial oxidative stress in sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced lung cell injury and antioxidant protection. *J Pharmacol Exp Ther* **328**: 732-739.

Goumenou M, Machera K (2004). Measurement of DNA single-strand breaks by alkaline elution and fluorometric DNA quantification. *Anal Biochem* **326**: 146-152.

Graham JS, Gerlach TW, Logan TP, Bonar JP, Fugo RJ, Lee RB, Coatsworth MA (2008). Methods of advanced wound management for care of combined traumatic and chemical warfare injuries. *Eplasty* **8**: 343-363.

Gray JP, Mishin V, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD (2010). Inhibition of NADPH cytochrome P450 reductase by the model sulfur mustard vesicant 2-chloroethyl ethyl sulfide is associated with increased production of reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* **247**: 76-82.

Greenberg S, Kamath P, Petrali J, Hamilton T, Garfield J, Garlick JA (2006). Characterization of the initial response of engineered human skin to sulfur mustard. *Toxicol Sci* **90**: 549-557.

Griffith OW (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* **27**: 922-935.

Groopman JD, Croy RG, Wogan GN (1981). In vitro reactions of aflatoxin B1-adducted DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5445-5449.

Gross CL, Giles KC, Smith WJ (1997). L-oxothiazolidine 4-carboxylate pretreatment of isolated human peripheral blood lymphocytes reduces sulfur mustard cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* **13**: 167-173.

Gross CL, Innace JK, Hovatter RC, Meier HL, Smith WJ (1993). Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human-lymphocytes by sulfur mustard. *Cell Biol Toxicol* **9**: 259-267.

Guddneppanavar R, Bierbach U (2007). Adenine-N3 in the DNA minor groove - an emerging target for platinum containing anticancer pharmacophores. *Anticancer Agents Med Chem* **7**: 125-138.

Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* **44**: 1098-1124.

Hamilton MG, Dorandeu FM, McCaffery M, Lundy PM, Sawyer TW (1998). Modification of cytosolic free calcium concentrations in human keratinocytes after sulfur mustard exposure. *Toxicol Vitro* **12**: 365-372.

Han SH, Espinoza LA, Liao HL, Boulares AH, Smulson ME (2004). Protection by antioxidants against toxicity and apoptosis induced by the sulphur mustard analog 2-chloroethylethyl sulphide (CEES) in Jurkat T cells and normal human lymphocytes. *British Journal of Pharmacology* **141**: 795-802.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hattersley IJ, Jenner J, Dalton C, Chilcott RP, Graham JS (2008). The skin reservoir of sulphur mustard. *Toxicol In Vitro* **22**: 1539-1546.

Hayden PJ, Petrali JP, Stolper G, Hamilton TA, Jackson GR, Wertz PW, Ito S, Smith WJ, Klausner M (2009). Microvesicating effects of sulfur mustard on an in vitro human skin model. *Toxicol Vitro* **23**: 1396-1405.

Hefazi M, Attaran D, Mahmoudi M, Balali-Mood M (2005). Late respiratory complications of mustard gas poisoning in Iranian veterans. *Inhalation Toxicology* **17**: 587-592.

Heflich RH, Beranek DT, Kodell RL, Morris SM (1982). Induction of mutations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by ethylating agents. *Mutation Research* **106**: 147-161.

Heinrich A, Balszuweit F, Thiermann H, Kehe K (2009). Rapid simultaneous determination of apoptosis, necrosis, and viability in sulfur mustard exposed HaCaT cell cultures. *Toxicol Lett* **191**: 260-267.

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.

Hershey AD, Chase M (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* **36**: 39-56.

Hess MT, Schwitter U, Petretta M, Giese B, Naegeli H (1997). Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6664-6669.

Hildebrandt IJ, Su H, Weber WA (2008). Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. *ILAR J* **49**: 17-26.

Hilmas CJ, Smart JK, Hill BA (2008) History of chemical warfare. In: *Medical aspects of chemical warfare* (Lenhart MK, Tuorinsky SD, eds), Washington, 9-76.

Himmelstein MW, Boogaard PJ, Cadet J, Farmer PB, Kim JH, Martin EA, Persaud R, Shuker DE (2009). Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. *Crit Rev Toxicol* **39**: 679-694.

Hinshaw DB, Lodhi IJ, Hurley LL, Atkins KB, Dabrowska MI (1999). Activation of poly [ADP-ribose] polymerase in endothelial cells and keratinocytes: Role in an in vitro model of sulfur mustard-mediated vesication. *Toxicol Appl Pharmacol* **156**: 17-29.

Hobbs FB (1944). Fatal Case of Mustard Gas Poisoning. *Br Med J* **2**: 306-307.

Hoeijmakers JHJ (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.

Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Hobbs GR, Riggs JE, Warehime SS, Christie I, Ganser G, Van Dyke K (2002). Nitrosative stress, uric Acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes* **51**: 2817-2825.

Hoffman A, Eisenkraft A, Finkelstein A, Schein O, Rotman E, Dushnitsky T (2007). A decade after the Tokyo sarin attack: a review of neurological follow-up of the victims. *Mil Med* **172**: 607-610.

Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN (1974). Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *J Chromatogr Sci* **12**: 725-729.

Hosseini-khalili A, Haines DD, Modirian E, Soroush M, Khateri S, Joshi R, Zendeheel K, Ghanei M, Giardina C (2009). Mustard gas exposure and carcinogenesis of lung. *Mutat Res* **678**: 1-6.

Hua A, Daniel R, Jasseron MP, Thiriout C (1993). Early cytotoxic effects induced by bis-chloroethyl sulphide (sulphur mustard): $[Ca^{2+}]_i$ rise and time-dependent inhibition of B77 fibroblast serum response. *J Appl Toxicol* **13**: 161-168.

Hur GH, Kim YB, Choi DS, Kim JH, Shin S (1998). Apoptosis as a mechanism of 2-chloroethylethyl sulfide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact* **110**: 57-70.

Hurst CG, Petralli JP, Barillo DJ, Graham JS, Smith WJ, Urbanetti JS, Sidell FR (2008) Vesicants. In: *Medical aspects of chemical warfare* (Lenhart MK, Tuorinsky SD, eds), Washington, 259-309.

Hurst CG, Smith WJ (2007) Health effects of exposure to vesicating agents. In: *Chemical warfare agents chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics* (Romano JA, Luckey BJ, Salem H, eds), Boca Raton, 293-312.

Husain K, Dube SN, Sugendran K, Singh R, DasGupta S, Somani SM (1996). Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats. *J Appl Toxicol* **16**: 245-248.

IARC *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposure*, vol. 92. IARC: Lyon, 2010, 868pp.

IARC *Chemical agents and related occupations*, vol. 100. IARC: Lyon, 2012, 599pp.

Inada S, Hiragun K, Seo K, Yamura T (1978). Multiple Bowen's disease observed in former workers of a poison gas factory in Japan, with special reference to mustard gas exposure. *J Dermatol* **2**: 49-60.

Inskeep PB, Guengerich FP (1984). Glutathione-mediated binding of dibromoalkanes to DNA: specificity of rat glutathione-S-transferases and dibromoalkane structure. *Carcinogenesis* **5**: 805-808.

Inskeep PB, Koga N, Cmarik JL, Guengerich FP (1986). Covalent binding of 1,2-dihaloalkanes to DNA and stability of the major DNA adduct, S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione. *Cancer Res* **46**: 2839-2844.

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.

Isidore MA, Castagna MP, Steele KE, Gordon RK, Nambiar MP (2007). A dorsal model for cutaneous vesicant injury by 2-chloroethyl ethyl sulfide using C57BL/6 mice. *Cutan Ocul Toxicol* **26**: 265-276.

Jafari M (2007). Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology* **231**: 30-39.

Jafari M, Ghanei M (2010). Evaluation of plasma, erythrocytes, and bronchoalveolar lavage fluid antioxidant defense system in sulfur mustard-injured patients. *Clin Toxicol (Phila)* **48**: 184-192.

Jain AK, Tewari-Singh N, Gu M, Inturi S, White CW, Agarwal R (2011a). Sulfur mustard analog, 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced skin injury involves DNA damage and induction of inflammatory mediators, in part via oxidative stress, in SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicol Lett* **205**: 293-301.

Jain AK, Tewari-Singh N, Orlicky DJ, White CW, Agarwal R (2011b). 2-Chloroethyl ethyl sulfide causes microvesication and inflammation-related histopathological changes in male hairless mouse skin. *Toxicology* **282**: 129-138.

Jan YH, Heck DE, Gray JP, Zheng H, Casillas RP, Laskin DL, Laskin JD (2010). Selective targeting of selenocysteine in thioredoxin reductase by the half mustard 2-chloroethyl ethyl sulfide in lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* **23**: 1045-1053.

Jones DP, McConkey DJ, Nicotera P, Orrenius S (1989). Calcium activated DNA fragmentation in rat liver nuclei *J Biol Chem* **264**: 6398-6403.

Jones JW, Robins RK (1963). Purine nucleosides. 3. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides. *J Am Chem Soc* **85**: 193-201.

Joseph LB, Gerecke DR, Heck DE, et al. (2011). Structural changes in the skin of hairless mice following exposure to sulfur mustard correlate with inflammation and DNA damage. *Exp Mol Pathol* **91**: 515-527.

Jowsey PA, Williams FM, Blain PG (2009). DNA damage, signalling and repair after exposure of cells to the sulphur mustard analogue 2-chloroethyl ethyl sulphide. *Toxicology* **257**: 105-112.

Jowsey PA, Williams FM, Blain PG (2010). The role of homologous recombination in the cellular response to sulphur mustard. *Toxicol Lett* **197**: 12-18.

Jowsey PA, Williams FM, Blain PG (2012). DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard. *Toxicol Lett* **209**: 1-10.

Jung Y, Lippard SJ (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* **107**: 1387-1407.

Kan RK, Pleva CM, Hamilton TA, Anderson DR, Petrali JP (2003). Sulfur mustard-induced apoptosis in hairless guinea pig skin. *Toxicol Pathol* **31**: 185-190.

Kang TH, Lindsey-Boltz LA, Reardon JT, Sancar A (2010). Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4890-4895.

Kang TH, Reardon JT, Kemp M, Sancar A (2009). Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2864-2867.

Kankofer M (2002). 8-iso-prostaglandin F₂α as a marker of tissue oxidative damage in bovine retained placenta. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **70**: 51-59.

Kannouche P, Strydom A (2003). Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* **85**: 1123-1132.

Kannouche PL, Lehmann AR (2004). Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* **3**: 1011-1013.

Kanofsky JR (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-Biological Interactions* **70**: 1-28.

Kasai H (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* **387**: 147-163.

Kaufmann WK, Paules RS (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *Faseb J* **10**: 238-247.

Kehe K, Balszuweit F, Emmler J, Kreppel H, Jochum M, Thiermann H (2008a). Sulfur mustard research--strategies for the development of improved medical therapy. *Eplasty* **8**: 312-332.

Kehe K, Raithel K, Kreppel H, Jochum M, Worek F, Thiermann H (2008b). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) influences the mode of sulfur mustard (SM)-induced cell death in HaCaT cells. *Arch Toxicol* **82**: 461-470.

Kehe K, Szinicz L (2005). Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* **214**: 198-209.

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.

Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G (2009). Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* **14**: 364-375.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.

Keyser BM, Andres DK, Nealley E, et al. (2013). Postexposure application of Fas receptor small-interfering RNA to suppress sulfur mustard-induced apoptosis in human airway epithelial cells: implication for a therapeutic approach. *J Pharmacol Exp Ther* **344**: 308-316.

Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D (2003). Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **45**: 1136-1143.

Kinsey VE, Grant WM (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.

Koga N, Inskip PB, Harris TM, Guengerich FP (1986). S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione, the major DNA adduct formed from 1,2-dibromoethane. *Biochemistry* **25**: 2192-2198.

Kohn KW, Erickson LC, Ewig RA, Friedman CA (1976). Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* **15**: 4629-4637.

Kohn KW, Grimek-Ewig RA (1973). Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res* **33**: 1849-1853.

Kriek E, Emmelot P (1964). Methylation of deoxyribonucleic acid by diazomethane. *Biochim Biophys Acta* **91**: 59-66.

Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghavan R (2001). Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes. *Chemico-Biological Interactions* **134**: 1-12.

Kunkel TA (1992). DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **267**: 18251-18254.

Kunkel TA, Pavlov YI, Bebenek K (2003). Functions of human DNA polymerases ϵ , κ and ι suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates. *DNA Repair* **2**: 135-149.

Langenberg JP, van der Schans GP, Spruit HE, Kuijpers WC, Mars-Groenendijk RH, van Dijk-Knijenburg HC, Trap HC, van Helden HP, Benschop HP (1998). Toxicokinetics of sulfur mustard and its DNA-adducts in the hairless guinea pig. *Drug Chem Toxicol* **21**: 131-147.

Lawley PD, Brookes P (1961). Acidic dissociation of 7:9-dialkylguanines and its possible relation to mutagenic properties of alkylating agents. *Nature* **192**: 1081-1082.

Lawley PD, Brookes P (1963). Further studies on alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem J* **89**: 127-138.

Lawley PD, Phillips DH (1996). DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* **355**: 13-40.

Lawley PD, Warren W (1976). Removal of minor methylation products 7-methyladenine and 3-methylguanine from DNA of Escherichia coli treated with dimethyl sulphate. *Chem Biol Interact* **12**: 211-220.

Levene P (1919). The structure of yeast nucleic acid. *J Biol Chem* **40**: 415-424.

Li X, Xu H, Xu C, et al. (2013). The yin-yang of DNA damage response: roles in tumorigenesis and cellular senescence. *Int J Mol Sci* **14**: 2431-2448.

Lindahl T (1974). An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 3649-3653.

Lindahl T (1979). DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **22**: 135-192.

Lindahl T (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA *Nature* **362**: 709-715.

Lindahl T, Karlstrom O (1973). Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* **12**: 5151-5154.

Lindahl T, Nyberg B (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**: 3610-3618.

Lodhi IJ, Sweeney JF, Clift RE, Hinshaw DB (2001). Nuclear dependence of sulfur mustard-mediated cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* **170**: 69-77.

Loeb LA, Preston BD (1986). Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet* **20**: 201-230.

Loechler EL, Green CL, Essigmann JM (1984). In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 6271-6275.

Lohman PHM (1999). Qualitative and quantitative procedures for health risk assessment. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* **428**: 237-254.

Lomash V, Deb U, Rai R, Jadhav SE, Vijayaraghavan R, Pant SC (2011). Designing of mouse model: a new approach for studying sulphur mustard-induced skin lesions. *Burns* **37**: 851-864.

Ludlum DB, Austin-Ritchie P, Hagopian M, Niu TQ, Yu D (1994). Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. *Chem Biol Interact* **91**: 39-49.

Ludlum DB, Kent S, Mehta JR (1986). Formation of O6-ethylthioethylguanine in DNA by reaction with the sulfur mustard, chloroethyl sulfide, and its apparent lack of repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **7**: 1203-1206.

Ludlum DB, Tong WP, Mehta JR, Kirk MC, Papirmeister B (1984). Formation of O6-ethylthioethyldeoxyguanosine from the reaction of chloroethyl ethyl sulfide with deoxyguanosine. *Cancer Res* **44**: 5698-5701.

Malayappan B, Johnson L, Nie B, Panchal D, Matter B, Jacobson P, Tretyakova N (2010). Quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of bis-N7-guanine DNA-DNA cross-links in white blood cells of cancer patients receiving cyclophosphamide therapy. *Anal Chem* **82**: 3650-3658.

Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P (2004). The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *MedGenMed* **6**.

Marie C, Maitre A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, Favier A, Ravanat JL (2008). Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol* **28**: 579-590.

Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* **424**: 83-95.

Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**: 361-370.

Martin CN, Garner RC (1977). Aflatoxin B -oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B1 causes guanine substitution in nucleic acids. *Nature* **267**: 863-865.

Martin V, Sainz RM, Antolin I, Mayo JC, Herrera F, Rodriguez C (2002). Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin. *J Pineal Res* **33**: 204-212.

Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F (2000). Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *Embo J* **19**: 3100-3109.

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.

Matijasevic Z, Volkert MR (2007). Base excision repair sensitizes cells to sulfur mustard and chloroethyl ethyl sulfide. *DNA Repair* **6**: 733-741.

McCall K (2010). Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 882-888.

McClintock SD, Hoesel LM, Das SK, Till GO, Neff T, Kunkel RG, Smith MG, Ward PA (2006). Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats. *J Appl Toxicol* **26**: 126-131.

McConnell WR, Kari P, Hill DL (1979). Reduction of glutathione levels in livers of mice treated with N,N'-bis (2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Chemother Pharmacol* **2**: 221-223.

McCulloch SD, Kokoska RJ, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F, Kunkel TA (2004). Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity. *Nature* **428**: 97-100.

McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol* **2**: 483-490.

Meier HL, Gross CL, Papirmeister B (1987). 2,2'-Dichlorodiethyl sulfide (sulfur mustard) decreases NAD⁺ levels in human leukocytes. *Toxicol Lett* **39**: 109-122.

Meijer L (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* **5**: 311-326.

Merat S, Perez JP, Ruttimann M, Bordier E, Lienhard A, Lenoir B, Pats B (2003). Acute poisoning by chemical warfare agent: sulfur mustard. *Annales Francaises D Anesthesie Et De Reanimation* **22**: 108-118.

Mershon MM, Mitcheltree LW, Petrali JP, Braue EH, Wade JV (1990). Hairless guinea pig bioassay model for vesicant vapor exposures. *Fundam Appl Toxicol* **15**: 622-630.

Meselson M, Stahl FW (1958). The replication of DNA in Escherichia Coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 671-682.

Michaelson S (2000). DNA fragmentation pattern induced in thymocytes by sulphur mustard. *Chem Biol Interact* **125**: 1-15.

Millau JF, Raffin AL, Caillat S, et al. (2008). A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab Chip* **8**: 1713-1722.

Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CH, Terada M, Koeffler HP (1992). p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res* **52**: 1695-1698.

Moin A, Ghazanfari T, Davoudi SM, et al. (2009). Long-term skin findings of sulfur mustard exposure on the civilians of Sardasht, Iran. *Toxin Reviews* **28**: 24-29.

Mol MAE, Devries R, Kluivers AW (1991). Effects of nicotinamide on biochemical changes and microblistering induced by sulfur mustard in human skin organ cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* **107**: 439-449.

Mol MAE, Smith WJ (1996). Ca²⁺ homeostasis and Ca²⁺ signalling in sulphur mustard-exposed normal human epidermal keratinocytes. *Chemico-Biological Interactions* **100**: 85-93.

Mol MAE, Vanderuit A, Kluivers AW (1989). NAD⁺ levels and glucose uptake of cultured human epidermal cells exposed to sulfur mustard. *Toxicol Appl Pharmacol* **98**: 159-165.

Momeni AZ, Enshaeih S, Meghdadi M, Amindjavaheri M (1992). Skin manifestations of mustard gas. A clinical study of 535 patients exposed to mustard gas. *Archives of Dermatology* **128**: 775-780.

Monteiroriviere NA, Inman AO (1995). Indirect immunohistochemistry and immunoelectron microscopy distribution of eight epidermal-dermal junction epitopes in the pig and in isolated perfused skin treated with bis (2-chloroethyl) sulfide. *Toxicol Pathol* **23**: 313-325.

Moser J, Levine CF, Thomas-Dunmeyer DR, Smith WJ (2004). Cross-linking interferes with assessing sulfur mustard-induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Toxicol Mech Methods* **14**: 195-202.

Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13765-13770.

Mukherjee S, Stone WL, Yang H, Smith MG, Das SK (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 SK (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.

Muller N, Eisenbrand G (1985). The influence of N7 substituents on the stability of N7-alkylated guanosines. *Chem Biol Interact* **53**: 173-181.

Mutlu E, Jeong YC, Collins LB, Ham AJ, Upton PB, Hatch G, Winsett D, Evansky P, Swenberg JA (2012). A new LC-MS/MS method for the quantification of endogenous and vinyl chloride-induced 7-(2-Oxoethyl)guanine in sprague-dawley rats. *Chem Res Toxicol* **25**: 391-399.

Nagy SM, Golumbic C, Stein W, Fruton JS, Bergmann M (1946). The penetration of vesicant vapors into human skin. *The Journal of General Physiology* **29**: 441-469.

Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YW, Swenberg JA (1998). Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res* **58**: 222-225.

Naraghi ZS, Mansouri P, Mortazavi M (2005). A clinicopathological study on acute cutaneous lesions induced by sulfur mustard gas (yperite). *European Journal of Dermatology* **15**: 140-145.

- Natarajan AT, Simons J, Vogel EW, Vanzeeland AA** (1984). Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylation products in DNA. *Mutation Research* **128**: 31-40.
- Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S** (1992). Calcium-mediated mechanisms in chemically-induced cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**: 449-470.
- Niu T, Matijasevic Z, Austin-Ritchie P, Sterling A, Ludlum DB** (1996). A ³²P-postlabeling method for the detection of adducts in the DNA of human fibroblasts exposed to sulfur mustard. *Chem Biol Interact* **100**: 77-84.
- Noll DM, Mason TM, Miller PS** (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* **106**: 277-301.
- Noort D, Benschop HP, Black RM** (2002). Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**: 116-126.
- Nordberg J, Arner ES** (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**: 1287-1312.
- O'Neill HC, White CW, Veress LA, Hendry-Hofer TB, Loader JE, Min E, Huang J, Rancourt RC, Day BJ** (2010). Treatment with the catalytic metalloporphyrin AEOL 10150 reduces inflammation and oxidative stress due to inhalation of the sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Free Radic Biol Med* **48**: 1188-1196.
- Ojwang JO, Grueneberg DA, Loechler EL** (1989). Synthesis of a duplex oligonucleotide containing a nitrogen mustard interstrand DNA-DNA cross-link. *Cancer Res* **49**: 6529-6537.
- Orourke MA, Feussner JR, Feigl P, Laszlo J** (1987). Age trends of lung cancer stage at diagnosis. Implications for lung cancer screening in the elderly. *JAMA* **258**: 921-926.
- Orrenius S, Nicotera P** (1987). Biochemical mechanisms of oxidative liver cell injury. *Bull Eur Physiopathol Respir* **23**: 291-295.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P** (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 552-565.
- Ostling O, Johanson KJ** (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**: 291-298.
- Ozawa N, Guengerich FP** (1983). Evidence for formation of an S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione adduct in glutathione-mediated binding of the carcinogen 1,2-dibromoethane to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 5266-5270.
- Pal A, Tewari-Singh N, Gu M, Agarwal C, Huang J, Day BJ, White CW, Agarwal R** (2009). Sulfur mustard analog induces oxidative stress and activates signaling cascades in the skin of SKH-1 hairless mice. *Free Radic Biol Med* **47**: 1640-1651.

- Pan ZG, Radding W, Zhou T, Hunter E, Mountz J, McDonald JM** (1996). Role of calmodulin in HIV-potentiated Fas-mediated apoptosis. *American Journal of Pathology* **149**: 903-910.
- Pant SC, Vijayaraghavan R, Kannan GM, Ganesan K** (2000). Sulphur mustard induced oxidative stress and its prevention by sodium 2,3-dimercapto propane sulphonic acid (DMPS) in mice. *Biomedical and Environmental Sciences* **13**: 225-232.
- Papirmeister B, Gross CL, Meier HL, Petrali JP, Johnson JB** (1985). Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fundam Appl Toxicol* **5**: 134-149.
- Papirmeister B, Gross CL, Petrali JP, Hixson CJ** (1984a). Pathology produced by sulfur mustard in human skin grafts on athymic nude mice: I. gross and light microscopic changes. *J Toxicol-Cutan Ocul Toxicol* **3**: 371-391.
- Papirmeister B, Gross CL, Petrali JP, Meier HL** (1984b). Pathology produced by sulfur mustard in human skin grafts on athymic nude mice. II. Ultrastructural changes. *J Toxicol-Cutan Ocul Toxicol* **3**: 393-408.
- Paromov V, Kumari S, Brannon M, Kanaparthi NS, Yang H, Smith MG, Stone WL** (2011). Protective effect of liposome-encapsulated glutathione in a human epidermal model exposed to a mustard gas analog. *J Toxicol* **2011**: 1-11.
- Paromov V, Qui M, Yang H, Smith M, Stone WL** (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, Suntutres Z, Smith M, Stone WL** (2007). Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *J Burns Wounds* **7**: 60-85.
- Patil S, Singh P, Maibach H** (1995). Radial spread of sodium lauryl sulfate after topical application. *Pharm Res* **12**: 2018-2023.
- Petermann E, Ziegler M, Oei SL** (2003). ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair* **2**: 1101-1114.
- Phillips DH** (2007) The formation of DNA adducts. In: *The cancer Handbook* (Alison MR, ed) 2nd ed., 1-13.
- Phillips DH, Farmer PB, Beland FA, Nath RG, Poirier MC, Reddy MV, Turteltaub KW** (2000). Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environ Mol Mutagen* **35**: 222-233.
- Pita R, Vidal-Asensi S** (2010). Cutaneous and systemic toxicology of vesicants used in warfare. *Actas dermo-sifiliograficas* **101**: 7-18.
- 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, Ruttkay-Nedecky B, Jilkova M, Sochor J, Sobotka J, Adam V, Kizek R (2013). Sulfur mustard causes oxidative stress and depletion of antioxidants in muscles, livers, and kidneys of Wistar rats. *Drug and chemical toxicology* **36**: 270-276.

Poirier MC (1993). Antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen-modified DNA: applications for detection of xenobiotics in biological samples. *Mutation Research* **288**: 31-38.

Pons B, Belmont AS, Masson-Genteuil G, Chapuis V, Oddos T, Sauvaigo S (2010). Age-associated modifications of Base Excision Repair activities in human skin fibroblast extracts. *Mech Ageing Dev* **131**: 661-665.

Porter NA, Caldwell SE, Mills KA (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**: 277-290.

Pourquier P (2006). DNA repair, a potential target for anticancer drug development. *Bull Cancer*: 124-144.

Pourquier P, Robert J (2011). General overview on DNA repair. *Bull Cancer* **98**: 229-237.

Povirk LF, Shuker DE (1994). DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res* **318**: 205-226.

Powers JC, Kam CM, Ricketts KM, Casillas RP (2000). Cutaneous protease activity in the mouse ear vesicant model. *J Appl Toxicol* **21**: 177-182.

Pullman A, Pullman B (1981). Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Q Rev Biophys* **14**: 289-380.

Qui M, Paromov VM, Yang H, Smith M, Stone WL (2006). Inhibition of inducible Nitric Oxide Synthase by a mustard gas analog in murine macrophages. *BMC Cell Biol* **7**.

Randerath K, Reddy MV, Gupta RC (1981). 32P-labeling test for DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6126-6129.

Rao MK, Bhadury PS, Sharma M, Dangi RS, Bhaskar ASB, Raza SK, Jaiswal DK (2002). A facile methodology for the synthesis and detection of N7-guanine adduct of sulfur mustard as a biomarker. *Can J Chem* **80**: 504-509.

Ravanat JL, Douki T, Duez P, et al. (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.

Ravanat JL, Duretz B, Guiller A, Douki T, Cadet J (1998). Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **715**: 349-356.

Ravanat JL, Turesky RJ, Gremaud E, Trudel LJ, Stadler RH (1995). Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography--mass spectrometry and HPLC--electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography--mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol* **8**: 1039-1045.

Ray R, Legere RH, Majerus BJ, Petralli JP (1995). Sulfur mustard-induced increase in intracellular free calcium level and arachidonic acid release from cell membrane. *Toxicol Appl Pharmacol* **131**: 44-52.

Ray R, Simbulan-Rosenthal CM, Keyser BM, Benton B, Anderson D, Holmes W, Trabosh VA, Daher A, Rosenthal DS (2010). Sulfur mustard induces apoptosis in lung epithelial cells via a caspase amplification loop. *Toxicology* **271**: 94-99.

Reed CI (1920). The minimum concentration of dichlorethylsulphide (mustard gas) effective for the eyes of man. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **15**: 77-80.

Reed DJ (1990). Review of the current status of calcium and yhiols in cellular injury. *Chem Res Toxicol* **3**: 495-502.

Regulus P, Spessotto S, Gateau M, Cadet J, Favier A, Ravanat JL (2004). Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 2223-2228.

Reifenrath WG, Chellquist EM, Shipwash EA, Jederberg WW (1994). Evaluation of animal models for predicting skin penetration in man. *Fund Appl Toxicol* **4**: 224-230.

Reifenrath WG, Hawkins GS, Kurtz MS (1991). Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: an in vitro-in vivo study. *J Pharm Sci* **80**: 526-532.

Reiner B, Zamenhof S (1957). Studies on the chemically reactive groups of deoxyribonucleic acids. *J Biol Chem* **228**: 475-486.

Reppert SM, Weaver DR (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-941.

Ricketts KM, Santai CT, France JA, Graziosi AM, Doyel TD, Gazaway MY, Casillas RP (2000). Inflammatory cytokine response in sulfur mustard-exposed mouse skin. *J Appl Toxicol* **21**: 73-76.

Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell Mol Life Sci* **66**: 981-993.

Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CM, Iyer S, Smith WJ, Ray R, Smulson ME (2000). Calmodulin, poly(ADP-ribose)polymerase and p53 are targets for modulating the effects of sulfur mustard. *J Appl Toxicol* **21**: 43-49.

Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CM, Liu WF, et al. (2001). PARP determines the mode of cell death in skin fibroblasts, but not keratinocytes, exposed to sulfur mustard. *J Invest Dermatol* **117**: 1566-1573.

Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CMG, Iyer S, Spoonde A, Smith W, Ray R, Smulson ME (1998). Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via a Ca²⁺-calmodulin and caspase-dependent pathway. *J Invest Dermatol* **111**: 64-71.

Rosenthal DS, Veleno A, Chou FP, Schlegel R, Ray R, Benton B, Anderson D, Smith WJ, Simbulan-Rosenthal CM (2003). Expression of dominant-negative Fas-associated death domain blocks human keratinocyte apoptosis and vesication induced by sulfur mustard. *J Biol Chem* **278**: 8531-8540.

Rowell M, Kehe K, Balszuweit F, Thiermann H (2009). The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology* **263**: 9-11.

Ruff AL, Dillman JF (2007). Signaling molecules in sulfur mustard-induced cutaneous injury. *Eplasty* **8**: 8-22.

Ruhl CM, Park SJ, Danisa O, Morgan RF, Papirmeister B, Sidell FR, Edlich RF, Anthony LS, Himel HN (1994). A serious skin sulfur mustard burn from an artillery shell. *J Emerg Med* **12**: 159-166.

Rusyn I, Asakura S, Li Y, Kosyk O, Koc H, Nakamura J, Upton PB, Swenberg JA (2005). Effects of ethylene oxide and ethylene inhalation on DNA adducts, apurinic/aprimidinic sites and expression of base excision DNA repair genes in rat brain, spleen, and liver. *DNA Repair* **4**: 1099-1110.

Rydberg B, Lindahl T (1982). Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *Embo J* **1**: 211-216.

Sage E (1993). Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol* **57**: 163-174.

Salem H, Ternay AL, Smart JK (2007) Brief history and use of chemical warfare agents in warfare. In: *Chemical warfare agents chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics* (Romano JA, Luckey BJ, Salem H, eds), Boca Raton, 1-20.

Sancar A (1996). DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* **65**: 43-81.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Kang TH, Reardon JT, Lee JH, Ozturk N (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Lett* **584**: 2618-2625.

Sancar GB (2000). Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* **451**: 25-37.

Saran M, Beck-Speier I, Fellerhoff B, Bauer G (1999). Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radic Biol Med* **26**: 482-490.

Sasaki M, Uchiyama J, Ishikawa H, Matsushita S, Kimura G, Nomoto K, Koga Y (1996). Induction of apoptosis by calmodulin-dependent intracellular Ca²⁺ elevation in CD4(+) cells expressing gp160 of HIV. *Virology* **224**: 18-24.

Sawyer TW, Hamilton MG (2000). Effect of intracellular calcium modulation on sulfur mustard cytotoxicity in cultured human neonatal keratinocytes. *Toxicol Vitro* **14**: 149-157.

Scharer OD (2003). Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 2946-2974.

Schlacher K, Leslie K, Wyman C, Woodgate R, Cox MM, Goodman MF (2005). DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome. *Mol Cell* **17**: 561-572.

Shakarjian MP, Heck DE, Gray JP, et al. (2010). Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicol Sci* **114**: 5-19.

Shall S, de Murcia G (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* **460**: 1-15.

Sharma DR, Sunkaria A, Bal A, Bhutia YD, Vijayaraghavan R, Flora SJ, Gill KD (2009). Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol* **240**: 208-218.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (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.

Shimada T, Guengerich FP (2006). Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* **19**: 288-294.

Shiokawa D, Ohyama H, Yamada T, Takahashi K, Tanuma S (1994). Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. *European Journal of Biochemistry* **226**: 23-30.

Shohrati M, Aslani J, Eshraghi M, Alaedini 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.

Shohrati M, Davoudi M, Ghanei M, Peyman M, Peyman A (2007). Cutaneous and ocular late complications of sulfur mustard in Iranian veterans. *Cutan Ocul Toxicol* **26**: 73-81.

Shohrati M, Ghanei M, Shamspour N, Babaei F, Abadi MN, Jafari M, Ali AH (2010). Glutathione and malondialdehyde levels in late pulmonary complications of sulfur mustard intoxication. *Lung* **188**: 77-83.

Shrivastav N, Li D, Essigmann JM (2010). Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **31**: 59-70.

Shugart L (1985). Covalent binding of benzo[a]pyrene diol epoxide to DNA of mouse skin: in vivo persistence of adducts formation. *J Toxicol Environ Health* **15**: 255-263.

Shuker DE, Bailey E, Gorf SM, Lamb J, Farmer PB (1984). Determination of N-7-[2H3]methyl guanine in rat urine by gas chromatography-mass spectrometry following administration of trideuteromethylating agents or precursors. *Anal Biochem* **140**: 270-275.

Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* **27**: 916-921.

Simbulan-Rosenthal CM, Ray R, Benton B, Soeda E, Daher A, Anderson D, Smith WJ, Rosenthal DS (2006). Calmodulin mediates sulfur mustard toxicity in human keratinocytes. *Toxicology* **227**: 21-35.

Singer B, Kroger M, Carrano M (1978). O2- and O4-alkyl pyrimidine nucleosides: stability of the glycosyl bond and of the alkyl group as a function of pH. *Biochemistry* **17**: 1246-1250.

Singh R, Farmer PB (2006). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* **27**: 178-196.

Smith HW, Clowes GH, Marshall EK (1919). On dichloroethylsulfide (mustard gas). IV The mechanism of absorption by the skin. *J Pharmacol Exp Ther* **13**: 1-30.

Smith KJ, Casillas R, Graham J, Skelton HG, Stemler F, Hackley BE, Jr. (1997). Histopathologic features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *J Dermatol Sci* **14**: 126-135.

Smith KJ, Graham JS, Moeller RB, Okerberg CV, Skelton H, Hurst CG (1995a). Histopathologic features seen in sulfur mustard induced cutaneous lesions in hairless guinea pigs. *J Cutan Pathol* **22**: 260-268.

Smith KJ, Hurst CG, Moeller RB, Skelton HG, Sidell FR (1995b). 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. *Journal of the American Academy of Dermatology* **32**: 765-776.

Smith WJ, Dunn MA (1991). Medical defense against blistering chemical warfare agents. *Archives of Dermatology* **127**: 1207-1213.

Smith WJ, Gross CL, Chan P, Meier HL (1990). The use of human epidermal keratinocytes in culture as a model for studying the biochemical mechanisms of sulfur mustard toxicity. *Cell Biol Toxicol* **6**: 285-291.

Sodum RS, Akerkar SA, Fiala ES (2000). Determination of 3-nitrotyrosine by high-pressure liquid chromatography with a dual-mode electrochemical detector. *Anal Biochem* **280**: 278-285.

Solberg Y, Alcalay M, Belkin M (1997). Ocular injury by mustard gas. *Survey of Ophthalmology* **41**: 461-466.

Somani SM, Babu SR (1989). Toxicodynamics of sulfur mustard. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **27**: 419-435.

Sourdeval M, Lemaire C, Deniaud A, Taysse L, Daulon S, Breton P, Brenner C, Boisvieux-Ulrich E, Marano F (2006). Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis* **11**: 1545-1559.

Spears CP, Kang SI, Kundu NG, Shamma T, Olah GA (1997). Swain-Scott constants and alkylating drug design. *Curr Top Med Chem* **2**: 85-100.

Stadtman ER (1992). Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224.

Steenken S (1989). Purines bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts *Chem Rev* **89**: 503-520.

Steenken S, Jovanovic SV (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J Am Chem Soc* **119**: 617-618.

Steinritz D, Elischer A, Balszuweit F, Gonder S, Heinrich A, Bloch W, Thiermann H, Kehe K (2009). Sulphur mustard induces time- and concentration-dependent regulation of NO-synthesizing enzymes. *Toxicol Lett* **188**: 263-269.

Steinritz D, Emmler J, Hintz M, Worek F, Kreppel H, Szinicz L, Kehe K (2007). Apoptosis in sulfur mustard treated A549 cell cultures. *Life Sci* **80**: 2199-2201.

Stetinova V, Smetanova L, Grossmann V, Anzenbacher P (2002). In vitro and in vivo assessment of the antioxidant activity of melatonin and related indole derivatives. *Gen Physiol Biophys* **21**: 153-162.

Stojic L, Brun R, Jiricny J (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair* **3**: 1091-1101.

Surova O, Zhivotovsky B (2012). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*: 1-9.

Swain CG, Scott CB (1953). Quantitative correlation of relative rates. Comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxydes and acyl halides. *J Am Chem Soc* **75**: 141-147.

Swenberg JA, Fryar-Tita E, Jeong YC, Boysen G, Starr T, Walker VE, Albertini RJ (2008). Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. *Chem Res Toxicol* **21**: 253-265.

Swenson DH (1983). Significance of electrophilic reactivity and especially DNA alkylation in carcinogenesis and mutagenesis. *Dev Toxicol Environ Sci* **11**: 247-254.

Szinicz L (2005). History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* **214**: 167-181.

Takeshima Y, Inai K, Bennett WP, et al. (1994). p53 mutations in lung cancers from Japanese mustard gas workers. *Carcinogenesis* **15**: 2075-2079.

Tanaka F, Dannenberg AM, Higuchi K, Nakamura M, Pula PJ, Hugli TE, Discipio RG, Kreutzer DL (1997). Chemotactic factors released in culture by intact developing and healing skin lesions produced in rabbits by the irritant sulfur mustard. *Inflammation* **21**: 251-267.

Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem* **75**: 93-103.

Taysse L, Daulon S, Delamanche S, Bellier B, Breton P (2007). Skin decontamination of mustards and organophosphates: comparative efficiency of RSDL and Fuller's earth in domestic swine. *Hum Exp Toxicol* **26**: 135-141.

Taysse L, Dorandeu F, Daulon S, Foquin A, Perrier N, Lallement G, Breton P (2011). 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. *Hum Exp Toxicol* **30**: 491-498.

Tessier F, Marconnet P (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports* **10**: 1-13.

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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **336**: 450-459.

Tewari-Singh N, Gu M, Agarwal C, White CW, Agarwal R (2010). Biological and Molecular Mechanisms of Sulfur Mustard Analogue-Induced Toxicity in JB6 and HaCaT Cells: Possible Role of Ataxia Telangiectasia-Mutated/Ataxia Telangiectasia-Rad3-Related Cell Cycle Checkpoint Pathway. *Chem Res Toxicol* **23**: 1034-1044.

Tewari-Singh N, Jain AK, Inturi S, Agarwal C, White CW, Agarwal R (2012). Silibinin attenuates sulfur mustard analog-induced skin injury by targeting multiple pathways connecting oxidative stress and inflammation. *PLoS One* **7**: 1-12.

Tewari-Singh N, Rana S, Gu M, Pal A, Orlicky DJ, White CW, Agarwal R (2009). Inflammatory biomarkers of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced skin injury in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Sci* **108**: 194-206.

Townsend L, Robins RK (1963). Ring cleavage of purine nucleosides to yield possible biogenetic precursors of pteridines and riboflavin. *J Am Chem Soc* **85**: 242-243.

Tretyakova N, Goggin M, Sangaraju D, Janis G (2012). Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* **25**: 2007-2035.

Trump BF, Berezesky IK, Smith MW, Phelps PC, Elliget KA (1989). The relationship between cellular ion deregulation and acute and chronic toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **97**: 6-22.

Tsuruta J, Sugisaki K, Dannenberg AM, Yoshimura T, Abe Y, Mounts P (1996). The cytokines NAP-1 (IL-8), MCP-1, IL-1 beta, and GRO in rabbit inflammatory skin lesions produced by the chemical irritant sulfur mustard. *Inflammation* **20**: 293-318.

Vallet V, Poyot T, Clery-Barraud C, Coulon D, Sentenac C, Peinnequin A, Boudry I (2012). Acute and long-term transcriptional responses in sulfur mustard-exposed SKH-1 hairless mouse skin. *Cutan Ocul Toxicol* **31**: 38-47.

Vamecq J, Vallée L, Storme L, Gelé P, Bordet R (2004). Key players in oxidative stress. *Parmacologie* **18**: 16-23.

van der Schans GP, Mars-Groenendijk R, de Jong LP, Benschop HP, Noort D (2004). Standard operating procedure for immunuslotblot assay for analysis of DNA/sulfur mustard adducts in human blood and skin. *J Anal Toxicol* **28**: 316-319.

van der Schans GP, Scheffer AG, Marsgroenendijk RH, Fidder A, Benschop HP, Baan RA (1994). Immunochemical detection of adducts of sulfur mustard to DNA of calf thymus and human white blood cells. *Chem Res Toxicol* **7**: 408-413.

van Gent DC, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**: 196-206.

Vandervalk PGM, Nater JP, Bleumink E (1984). Skin irritancy of surfactants as assessed by water vapor loss measurements. *J Invest Dermatol* **82**: 291-293.

Varadarajan S, Shah D, Dande P, Settles S, Chen FX, Fronza G, Gold B (2003). DNA damage and cytotoxicity induced by minor groove binding methyl sulfonate esters. *Biochemistry* **42**: 14318-14327.

Vijayaraghavan R, Gautam A, Sharma M, Satish HT, Pant SC, Ganesan K (2008). Comparative evaluation of some flavonoids and tocopherol acetate against the systemic toxicity induced by sulphur mustard. *Indian Journal of Pharmacology* **40**: 114-120.

Vijayaraghavan R, Sugendran K, Pant SC, Husain K, Malhotra RC (1991). Dermal intoxication of mice with bis(2-chloroethyl)sulphide and the protective effect of flavonoids. *Toxicology* **69**: 35-42.

Vivancos PD, Wolff T, Markovic J, Pallardo FV, Foyer CH (2010). A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J* **431**: 169-178.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310.

Wada S, Miyanishi M, Nishimoto Y, Kambe S, Miller RW (1968). Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man. *Lancet* **1**: 1161-1163.

Wagner JR, Hu CC, Ames BN (1992). Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3380-3384.

Watson JD, Crick FH (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738.

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.

Wei Y, Yue L, Liu Q, Chen J, Xie J (2011). A sensitive high performance liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry method for N7-[2-(2-hydroxyethyl)thio]-ethyl]guanine determination. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**: 1707-1712.

Weston A, Rowe ML, Manchester DK, Farmer PB, Mann DL, Harris CC (1989). Fluorescence and mass spectral evidence for the formation of benzo[a]pyrene anti-diol-epoxide-DNA and -hemoglobin adducts in humans. *Carcinogenesis* **10**: 251-257.

Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P, et al. (2004). AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* **15**: 209-220.

Willems JL (1989). Clinical management of mustard gas casualties. *Ann Med Milit Belg* **3**: 1-61.

Wu GY, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* **134**: 489-492.

Xu-Welliver M, Pegg AE (2002). Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **23**: 823-830.

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.

Yang W (2003). Damage repair DNA polymerases Y. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 23-30.

Yang Y, Nikolic D, Swanson SM, van Breemen RB (2002). Quantitative determination of N7-methyldeoxyguanosine and O6-methyldeoxyguanosine in DNA by LC-UV-MS-MS. *Anal Chem* **74**: 5376-5382.

Yarosh DB, Yee V (1990). SKH-1 hairless mice repair UV-induced pyrimidine dimers in epidermal DNA. *J Photochem Photobiol B-Biol* **7**: 173-179.

Yourick JJ, Clark CR, Mitcheltree LW (1991). Niacinamide pretreatment reduces microvesicle formation in hairless guinea pigs cutaneously exposed to sulfur mustard. *Fundam Appl Toxicol* **17**: 533-542.

Yu D, Niu TQ, Austin-Ritchie P, Ludlum DB (1994). A 32P-postlabeling method for detecting unstable N-7-substituted deoxyguanosine adducts in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7232-7236.

Zhao HM, Ruan HH, Li HT (2011). Progress in the research of GSH in cells. *Chinese Science Bulletin* **56**: 3057-3063.

Zhou BBS, Elledge SJ (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439.

Zlotogorski A, Goldenhersh M, Shafran A (1997). A model for quantitative measurement of sulfur mustard skin lesions in the rabbit ear. *Toxicology* **120**: 105-110.

Annexe

Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry

Mohamed Batal^{ab}, Isabelle Boudry^b, Cécile Cléry-Barraud^b, Stéphane Mouret^b and Thierry Douki^{a*}

^aLaboratoire “Lésions des Acides Nucléiques,” Université Joseph Fourier – Grenoble 1/CEA/ Institut Nanoscience et Cryogénie/ SCIB, UMR-E3, Grenoble, France; ^bDépartement de Toxicologie et Risques Chimiques; Unité de Brûlure Chimique, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, La Tronche Cedex, France

(Received 19 July 2012; final version received 8 December 2012)

Sulphur mustard (SM) is known as an efficient vesicating agent as well as a carcinogenic chemical. This warfare agent remains a threat for both civilians and militaries. DNA alkylation is one of the critical molecular pathways at the origin of the symptoms associated with SM exposure. SM forms monoadducts with guanine and adenine as well as a biadduct between two guanine bases. The aim of the present work is to determine the relative yields of these three lesions in DNA samples after SM exposure without using radiolabeled SM as in earlier works. For this purpose, we have developed a high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric method to simultaneously quantify the SM monoadducts and biadduct in the same DNA sample. We observed in isolated and cellular DNA that the guanine monoadduct was the predominant lesion, while the biadduct was present in twofold lower yield. The adenine monoadduct was generated in lowest amounts. The analytical approach was extended to 2-chloroethyl ethyl sulphide, a widely used SM analog. Again, the adenine adduct was much less frequent than the guanine derivative. The developed assay will allow performing studies involving large numbers of samples.

Keywords: genotoxicity; sulphur mustard; 2-chloroethyl ethyl sulphide; DNA adducts; mass spectrometry

Introduction

Sulphur mustard (SM) or bis-(2-chloroethyl) sulphide was first used as a chemical warfare agent during World War I, and more recently during the Iraq–Iran conflict causing more than 100,000 injuries (Balali-Mood and Hefazi 2005; Kehe and Szinicz 2005). SM also remains a threat for civilians because of its potential use in terrorist attacks due to its relatively easy synthesis (Wattana and Bey 2009). The risks associated with SM exposure are worsened by the fact that no antidote is available. The acute symptoms resulting from SM exposure are mostly encountered in the three organs interacting with the external environment namely skin, eyes, and lungs. Under its cyclic episulphonium ionic form, SM is a strong electrophile. This intermediate can react with nucleophilic sites of cellular constituents like proteins, lipids, RNA, and DNA. Among the critical molecular steps proposed

*Corresponding author. Email: thierry.douki@cea.fr

to be at the origin of the SM toxicity and carcinogenicity, DNA alkylation is the most widely accepted (Papirmeister et al. 1985; Lodhi et al. 2001; Kehe and Szinicz 2005). The induction of DNA damage is also associated with the carcinogenic properties of SM, which are well documented for pharynx and larynx in workers manufacturing SM (Easton, Peto, and Doll 1988). Altogether, monitoring SM-induced DNA damage is relevant to both acute and chronic effects of this toxic agent.

The SM-specific DNA lesions result from alkylation reactions to form adducts to nucleobases (Figure 1). Using paper chromatographic analysis of DNA treated with ^{35}S -labeled sulphur mustard, Brookes and Lawley (1960, 1961; Lawley and Brookes 1963) have shown in an indirect way that the N7 position of guanine was the main target in DNA. Subsequent hydrolysis of the remaining chlorine atom results in the formation of N7-hydroxyethylthioethyl-2'-deoxyguanosine (HETE-N7dGuo), which may undergo depurination, yielding free N7-hydroxyethylthioethyl-guanine (HETE-N7Gua) and an abasic site. The same authors also showed that SM formed biadducts between the N7 positions of two guanines moieties (N7Gua-ETE-N7Gua) and another monoadduct by alkylation of the N3 position of adenine (HETE-N3Ade). These results were further confirmed in isolated calf thymus DNA and white blood cells by Fidder et al. (1994) and Ludlum et al. (1994). The widely used monofunctional analog of SM 2-chloroethyl ethyl sulphide (CEES) also generates guanine and adenine monoadducts in DNA, N7-ethylthioethyl-guanine (ETE-N7Gua) and N3-ethylthioethyl-adenine (ETE-N3Ade).

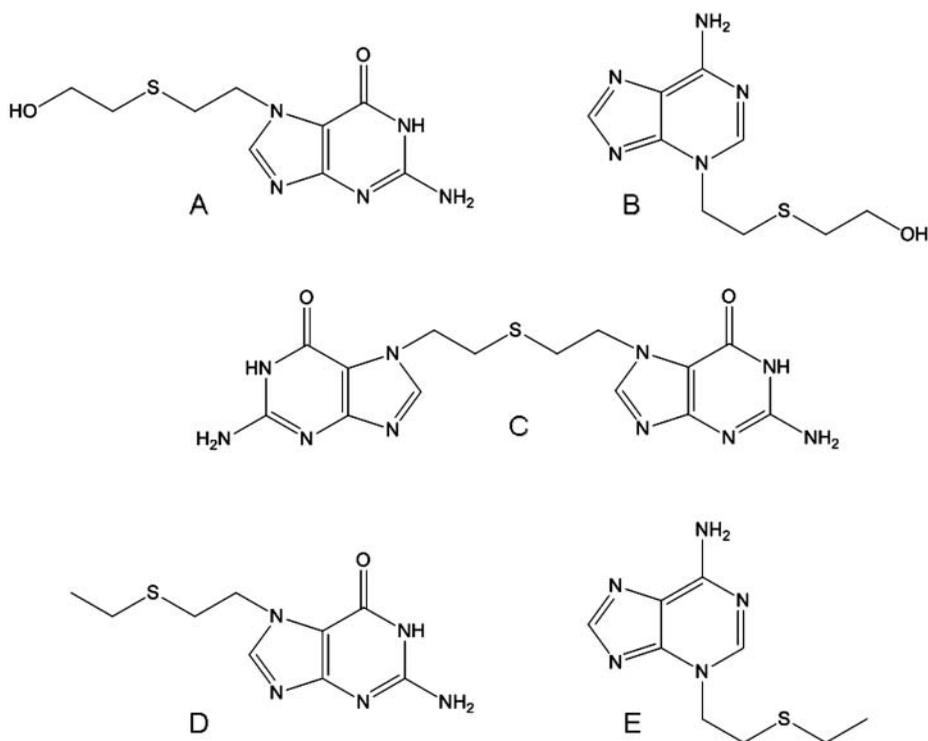


Figure 1. Chemical structures of SM-DNA bases adducts. (A) HETE-N7Gua, (B) HETE-N3Ade, (C) N7Gua-ETE-N7Gua, and CEES (D) ETE-N7Gua and (E) ETE-N3Ade.

Because these different DNA lesions may not exhibit the same mutagenic properties and may not be repaired at the same rate, it is important to gather individual information on all of them in the same samples. Several methods have been developed to detect the major adduct formed by SM with cellular DNA, namely HETE-N7Gua. These techniques include high performance liquid chromatography (HPLC) with radioactivity detection (Fidder et al. 1994), ^{32}P -postlabeling assay (Yu et al. 1994), and immunoassay (Vanderschans et al. 1994). A more modern technique, HPLC followed by electrospray ionization (ESI) and single stage mass spectrometric (MS) detection was used by Rao et al. (2002) to detect HETE-N7Gua as a free base. Higher specificity and sensitivity can be reached with tandem mass spectrometric detection (MS/MS). Singh and Farmer (2006) described HPLC–ESI–MS/MS as “the future of DNA adduct detection”. HPLC–ESI–MS/MS was recently used for the determination of the level of HETE-N7Gua (Wei et al. 2011).

All the analytical approaches mentioned above targeted only the major SM-induced DNA adduct. The use of radiolabeled SM allowed detection of three types of adducts, (Brookes and Lawley 1961; Fidder et al. 1994), but such an assay cannot be employed for large-scale cellular or animal studies. As a matter of fact, it was applied to isolated DNA only, and once to blood cells exposed *ex vivo*. To determine the distribution of the SM-induced DNA damage at low concentration of the toxic agent and in a wide variety of biological samples, we developed a convenient HPLC–ESI–MS/MS method for simultaneous detection of HETE-N7Gua, N7Gua-ETE-N7Gua, and HETE-N3Ade. It was extended to CEES adducts ETE-N7Gua and ETE-N3Ade.

Materials and methods

Caution

SM and CEES are carcinogenic and cytotoxic agents. They should be handled carefully in a ventilated room with adequate protection by experienced personnel.

Chemicals and enzymes

Sulphur mustard was obtained from the French Single National Small-Scale Facility (Délégation Générale pour l'Armement, DGA Maîtrise NRBC, Vert-Le-Petit, France) and was >95% pure. The agent was stored at -20°C in sealed vials and thawed at room temperature on the day of the experiment. CEES was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Double-stranded calf thymus DNA (CT-DNA) and yeast RNA were obtained from Sigma and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. Formic acid and ammonium hydroxide for HPLC were provided by Sigma. HPLC grade acetonitrile and methanol were obtained from Merck and Carlo Erba (Milano, Italy). The reagents for cell cultures, i.e., Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 cell culture medium with L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAX[®]), phosphate buffered saline (PBS), minimum essential medium (eagle) (MEM), penicillin, and streptomycin were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). PBS with CaCl_2 and MgCl_2 used for cell treatments was from Sigma. For DNA extraction, sucrose, MgCl_2 , tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (tris-HCl), deferoxamine, triton X-100, ribonuclease A, ribonuclease T1, sodium dodecyl sulphate, NaI, and propan-2-ol were provided by Sigma, ethanol by Carlo Erba, disodium ethylenediamine tetraacetate by Amresco (Solon, OH), and serine protease by Qiagen (Courtaboeuf, France). For DNA digestion, nuclease P1, phosphodiesterase II,

deoxyribonuclease II (DNase II), alkaline phosphatase, succinic acid, ammonium acetate, CaCl_2 , and ZnSO_4 were purchased from Sigma, and phosphodiesterase I from Worthington (Lakewood, NJ).

Exposure of isolated DNA and cultured human cells to SM and CEES

Pure SM was stored in 1 mL tubes at -20°C . A 400 mmol L^{-1} stock solution of CEES was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Treatment solutions of SM and CEES were prepared from these stock solutions in DMSO just before use. The CT-DNA at a concentration of 1 mg mL^{-1} in Na_2HPO_4 buffer (50 mmol L^{-1} , pH 7) was treated by different concentrations of either SM or CEES (0, 10, 20, 50, and $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) for 4 h at room temperature. The final DMSO concentration was below 0.5%. DNA was then precipitated by the addition of anhydrous ethanol ($2.5 \times$ volumes) and 4 mol L^{-1} NaCl ($0.1 \times$ volume). The DNA pellet was washed three times for removal of SM or CEES. For this purpose, the pellet was suspended in 70% (v/v) aqueous ethanol. The sample was centrifuged for 5 min at $1500 \times g$ on a Hereaus Megafuge 40R centrifuge (Thermo scientific). Human acute monocytic leukemia (THP1) monocytes were grown in RPMI 1640 medium with GlutaMAX supplemented with 10% (v/v) decomplexed fetal calf serum (Gibco Invitrogen), 1% (v/v) MEM-NEAA (minimum essential medium non-essential amino acids) and 1% (v/v) of a mixture of antibiotics (50 U mL^{-1} of penicillin and $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin). Cells were grown in a Hera Cell incubator (Hereaus) in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C . Samples containing 20×10^6 cells were obtained and used in triplicate for each concentration (0, 10, 20, 50, and $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) of treatment with SM or CEES. Before treatment, the cells were centrifuged ($1200 \times g$, 5 min) and the supernatant was discarded. Then cells were suspended in 2 mL PBS containing CaCl_2 (0.9 mmol L^{-1}) and MgCl_2 (0.49 mmol L^{-1}). The cells were then treated with either SM or CEES for 1 h at room temperature. Subsequently, they were centrifuged ($1200 \times g$, 5 min) in a Hereaus Megafuge 40R centrifuge (Thermo scientific), the supernatant was discarded, and 2 mL PBS with CaCl_2 and MgCl_2 was added. The latter operation was repeated three times to remove traces of SM or CEES. Last, the THP1 monocyte pellets were stored at -80°C before DNA extraction.

Extraction and digestion of DNA from cultured human cells

DNA extraction from SM- or CEES-treated THP1 was carried out following the NaI/propan-2-ol chaotropic method (Ravanat et al. 2002). Briefly, plasmic membranes were lysed by adding a buffer (sucrose 320 mmol L^{-1} , MgCl_2 5 mmol L^{-1} , Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , deferoxamine 0.1 mmol L^{-1}) containing 1% (v/v) triton X-100, and the nuclei were collected by centrifugation on a Hereaus Megafuge 40R centrifuge (5 min at $1500 \times g$). Then, the nuclear membranes were lysed and DNA was extracted by adding a second buffer (EDTA- Na_2 5 mmol L^{-1} , Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , deferoxamine 0.15 mmol L^{-1}) containing 0.5% (v/v) SDS. RNA was hydrolyzed using RNases A ($300\text{ }\mu\text{g}$) and T1 (8 U) at 37°C for 15 min. Samples were then incubated after the addition of protease at 37°C for 1 h. DNA was precipitated with $2 \times$ volumes of buffered NaI-solution (EDTA- Na_2 20 mmol L^{-1} , NaI 7.6 mol L^{-1} , Tris-HCl 40 mmol L^{-1} , deferoxamine 0.3 mmol L^{-1}) and $3.3 \times$ volumes of absolute propan-2-ol. The DNA pellet was then washed by successive centrifugation and re-suspension once each with aqueous propan-2-ol (40%, v/v) and aqueous ethanol (70%, v/v). The DNA pellet was suspended in $100\text{ }\mu\text{L}$ of 0.1 mmol L^{-1} deferoxamine. DNA was digested as previously described (Frelon et al. 2000; Douki et al. 2004) in two steps, each

one with a specific enzymatic cocktail: nuclease P1, phosphodiesterase II and DNase II at pH 6 (50 mmol L⁻¹ succinic acid, 25 mmol L⁻¹ CaCl₂, 75 mmol L⁻¹ ammonium acetate) for the first; phosphodiesterase I and alkaline phosphatase at pH 8 (50 mmol L⁻¹ tris) for the second. Each step was carried out at 37°C for 2 h. The samples were then left at 90°C in a heating block for 20 min in order to release DNA adducts.

Preparation of calibrated solutions of SM and CEES DNA adducts

CT-DNA (1 mg mL⁻¹) in Na₂HPO₄ buffer (50 mmol L⁻¹, pH 7) was incubated with SM (final concentration 30 mmol L⁻¹) or CEES (final concentration 100 mmol L⁻¹) for 4 h at room temperature. The concentration of the stock solutions was 2 mol L⁻¹; the final concentration of DMSO was thus 1.5 and 4% (v/v). Then, DNA was precipitated by the addition of anhydrous ethanol (2.5 × volumes) and 4 mol L⁻¹ NaCl (0.1 × volume), washed three times with 70% ethanol (v/v) by successive centrifugation and discarding of the supernatant to remove possible traces of SM or CEES. DNA was then suspended in deionized water and enzymatically hydrolyzed as described above. As expected for N7Gua adducts (Boysen et al. 2009) depurination of mono- and biadducts was completed by neutral thermal hydrolysis (90°C for 20 min in a heating block). Targeted base adducts were purified using a preparative HPLC system consisting of a L6200 intelligent pump from Merck-Hitachi, a 7125 injector valve from Rheodyne (San Jose, CA), an Uptisphere C₁₈-reverse phase column (4.0 × 250 mm I.D., 5 μm particle size) from Interchim (Montluçon, France), a Waters 484 UV detector (Munich, Germany) and a FC 204 fraction collector from Gilson (Middleton, WI). Elution was carried out using a gradient of ammonium formate (pH 6.3) and methanol (0 min: 0% methanol, 15 min: 7% methanol; 30 min: 15% methanol; 80 min: 30% methanol) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Fractions of 2 mL were collected from which 20 μL were analyzed by HPLC–ESI–MS/MS (see below). Fractions containing DNA adducts of interest were pooled, freeze-dried and suspended in deionized water. A HPLC analysis with UV detection was used to calibrate the prepared solutions of DNA adducts. Calculations were based on the hypothesis that the UV absorption properties of HETE-N7Gua were similar to those of 7-methylguanosine ($\epsilon_{258} = 13,600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Jones and Robins 1963), those of HETE-N3Ade were equivalent to those of 3-methyladenosine ($\epsilon_{270} = 17,400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Fujii, Saito, and Nakasaka 1989) and those of N7Gua-ETE-N7Gua was close to those of bis-N7-guanine cross-link formed by cyclophosphamide ($\epsilon_{251} = 15,700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Malayappan et al. 2010).

HPLC–ESI–MS/MS quantification of SM and CEES DNA adducts

Isolated and cellular DNA hydrolysates were analyzed using a HPLC system composed of an Accela pump, an autosampler, and a UV diode array detector from Thermofisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). It was equipped with a Nucleodur C₁₈ HTec C18-reverse phase column (2 × 125 mm I.D., 3 μm particle size, HPLC system 1) from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Some analyses were performed using an Uptisphere ODB C₁₈-reverse phase column (2 × 150 mm I.D., 5 μm particle size, HPLC system 2) from Interchim (Montluçon, France). The HPLC gradient involved a 2 mmol L⁻¹ aqueous solution of ammonium formate (pH 6.3) and acetonitrile (0 min: 0% ACN, 15 min: 7% ACN; 30 min: 15% ACN; 35 min: 30% ACN) at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. The mobile phase eluting from the column was first directed to a UV diode array detector and then into a Finnigan TSQ Quantum Ultra triple quadrupole tandem mass spectrometer (Thermofisher Scientific). All analyses were performed in

the positive ESI mode. The HPLC–ESI–MS/MS system was first used to record fragmentation spectra of the analytes. For this purpose, the first quadrupole was locked on the m/z value of the protonated compound, while the third quadrupole scanned over a defined range of mass units to identify the fragments produced in the collision cell (quadrupole 2). For quantification purposes, the system was used in the multiple reactions monitoring (MRM) mode. Fragmentations monitored for SM and CEES monoadducts in the form of modified bases corresponded to the release of the reactive part of SM and CEES, namely fragments at $m/z = 105$ and 89 , respectively. Additional qualifiers ions corresponding to the loss of ethylene (C_2H_4 , 28 mass units) were also monitored. For the SM biadduct, the monitored fragmentation corresponded to the release of a fragment at $m/z = 210$. The quantification of SM and CEES DNA adducts was achieved by external calibration and normalized with the respect to the amount of normal bases, which was determined online by UV detection set at 280 nm.

Stability of SM and CEES DNA and RNA adducts

The depurination of SM and CEES DNA adducts as modified nucleosides was studied in SM- and CEES-treated DNA hydrolyzed by enzymatic digestion. Samples were diluted 10 times in the DNA hydrolysis buffers either at pH 6 or pH 8 described above. The extent of depurination was determined by HPLC–ESI–MS/MS (HPLC system 1) by monitoring the signal of the fragmentation corresponding to the loss of the deoxyribose unit [M-116] for the monoadducts of dGuo and dAdo with SM and CEES. Rate constants of the reaction were calculated with the assumption of first-order kinetics. To study the stability of the RNA adducts of SM and CEES, yeast RNA (1 mg mL^{-1}) in Na_2HPO_4 (50 mmol L^{-1} , pH 7) buffer was treated with 30 mmol L^{-1} of SM or CEES (final concentration) during 4 h at room temperature. RNA was precipitated by the addition of anhydrous ethanol ($2.5 \times$ volumes) and 4 mol L^{-1} NaCl ($0.1 \times$ volume.). Three washings were performed in order to remove possible traces of SM or CEES. RNA was then enzymatically hydrolyzed using the protocol described above for DNA. Two incubation times were used, either 2 or 4 h. Enzymatic digestion was completed in some cases by a thermal hydrolysis at 90°C that lasted 5, 20, 60 or 120 min. Products of digestion were then analyzed by HPLC–ESI–MS/MS (HPLC system 1). The fragmentations monitored for ribonucleoside adducts (N7-HETEGuo and N3-HETEAdo for SM, N7-ETEGuo and N3-ETEGuo for CEES) corresponded to the loss of the ribose moiety (132 mass units).

Validation of the analytical method

A series of experiments was carried out for the statistical validation of the HPLC–ESI–MS/MS assay for SM- and CEES-DNA adducts. First, linearity was tested by injecting increasing amounts of pure standards (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 pmol). To check the absence of matrix effect, the same analyses were repeated with the standards in solution in a digested sample of CT-DNA (1 mg L^{-1}). Repeatability was tested by analyzing in a same run of HPLC analyses eight samples of DNA exposed to $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ of SM or CEES. Variation coefficients were calculated. For the evaluation of reproducibility, treated DNA was analyzed in triplicates on six different days. For each day, a separate hydrolysis was performed and new calibration curves were determined. The three values for one day were averaged, providing six values per adduct that were used for the calculation of the variation coefficients.

Results and discussion

The aim of the present study is to determine the relative yields of the different SM-induced DNA adducts by using a straightforward method that could be applied to large series of biological samples. The latter conditions preclude the use of radiolabeling that was the basis of the vast majority of previous studies. As an alternative analytical approach, we developed an assay based on HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry following hydrolysis of DNA. This technique is receiving growing numbers of application for the quantification of modified bases released as nucleosides. Because SM and CEES adducts are known to undergo depurination, they were quantified as modified bases. After ruling out a possible interference of RNA adducts with the measurements, the assay was applied to isolated DNA and cultured human monocytes exposed to SM and CEES.

Optimization of the DNA hydrolysis procedure

Quantitative release of DNA lesions is a requisite to any type of chromatographic detection of DNA base damage. As previously emphasized (Boysen et al. 2009), this has been a limitation to numerous studies on alkylating agents which, like SM and CEES, react with the N7 atom of guanine and the N3 atom of adenine. Indeed, it is well known that such DNA adducts are not stable and undergo depurination that is the cleavage of the N-glycosidic bond and the release of the alkylated base (Gates, Nooner, and Dutta 2004; Boysen et al. 2009). Depurination occurs more rapidly in nucleosides than in DNA (Gates, Nooner, and Dutta 2004). This instability of SM adducts to DNA during sample work-up could result in drastic underestimation of the measures, whether HPLC-ESI-MS/MS or ^{32}P -post labeling is used. As expected, we observed that both SM and CEES adducts as nucleosides (fragmentation mass spectra in supplementary data Figure S1, available online) underwent depurination when left in solution in the two buffers used for the enzymatic digestion classically applied to release nucleosides. Depurination took place more rapidly at pH 6 than pH 8. The respective rate constants for HETE-N7dGuo were $0.45 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$ and $0.044 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$, corresponding to respective half depurination times of 1.5 and 16 h (Figure 2). Similar observations were made for CEES adducts (Figure S2, available online). We thus decided to quantify SM and CEES adducts as modified bases. To complete the depurination of alkylated nucleosides produced during the enzymatic hydrolysis of DNA, we applied a simple thermal treatment (20 min, 90°C) at the end of the enzymatic step. The completeness of the depurination of the studied adducts was established by the disappearance from the HPLC-ESI-MS/MS chromatograms of the peaks corresponding to the modified nucleosides concomitant with the increase of those of the bases (data not shown). It is worth mentioning that unmodified nucleosides were stable under the heating conditions. It was thus possible to use the quantification of normal bases released as nucleosides by a UV spectrometer placed before the inlet of the mass spectrometer to accurately determine the amount of analyzed DNA. A more direct hydrolysis procedure involving incubation at high temperature in concentrated acid could have been applied like for instance prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis of oxidized bases. However, it was shown that unmodified pyrimidines are only partly released under these conditions (Ravanat et al. 1995). In our hands, such an approach led to busy HPLC-UV chromatograms. In addition, such a protocol requires removal of the acid before HPLC analysis, a time-consuming step and a source of sample loss and decreased reproducibility of the assay.

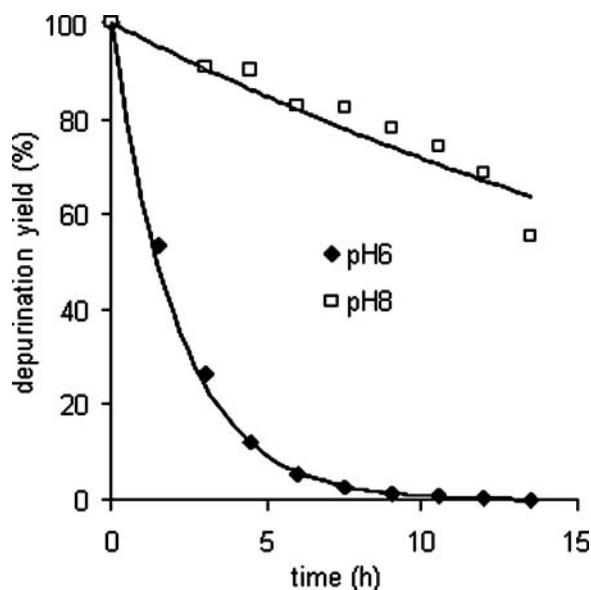


Figure 2. Depurination kinetics of HETE-N7dGuo, the major SM-DNA adduct. Experiments were carried out under the conditions of enzymatic hydrolysis (37°C in specific buffers at pH either 6 or 8). The studied sample was DNA (1 mg mL⁻¹) treated by 30 mmol L⁻¹ of SM in Na₂HPO₄ (50 mmol L⁻¹, pH7) and further enzymatically hydrolyzed. Analyses were performed after increasing periods of times with the sample left at 37°C in the HPLC autosampler. DNA adducts were quantified by HPLC-ESI-MS/MS using loss of the deoxyribose moiety (116 mass units) as the monitored signal. The reported data are representative of the three experiments aimed at determining the depurination rate constants.

A last question we addressed was a possible contribution of RNA adducts. Indeed, DNA extraction protocols often do not completely eliminate RNA, even in spite of RNase treatment (Ravanat et al. 2002). Because we quantified adducts as modified bases and not nucleosides, it was not possible to discriminate those arising from DNA and from RNA as a consequence of the absence of the sugar moiety. It was thus important to check whether RNA base adducts would be released upon hydrolysis. It is known that N-glycosidic bonds are stronger in ribonucleosides than in their 2-deoxy derivatives, but it remained to be established to what extent this held true for the SM and CEES adducts. With the exception of Brookes and Lawley (1960) who showed the lack of depurination in whole RNA, this point has never been addressed in works targeting SM base adducts. We found that no depurination of SM and CEES RNA adducts took place during enzymatic hydrolysis. In addition, only limited decomposition of the SM ribonucleosides adducts took place during the 20 min at 90°C. Incubation time of 2 h was necessary to achieve depurination of more than 75% of HETE-N7Guo (Figure 3). CEES adducts were slightly less stable. After 20 min of heating at 90°C (Figure S3, available online), the extent of depurination for ETE-N7Guo was ~40%, while it was 60% for ETE-N3Ado. Altogether, the defined hydrolysis procedure is very quantitative because it prevents possible underestimation due to depurination of adducts as well as overestimation resulting from the contribution of RNA traces in the extracted DNA samples.

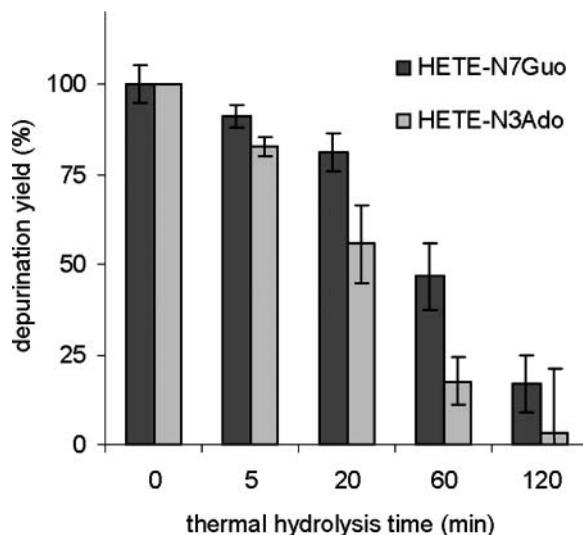


Figure 3. Time-course study of the depurination of SM RNA adducts upon thermal hydrolysis. The studied samples were yeast RNA (1 mg mL^{-1}) treated by 30 mmol L^{-1} of SM in Na_2HPO_4 (50 mmol L^{-1} , pH7) and further enzymatically hydrolyzed. The samples were then placed at 90°C and analyzed after increasing periods of time. RNA adducts were quantified by HPLC–ESI–MS/MS using loss of the ribose moiety (132 mass units) as the monitored signal. Results are presented as % of control. Treatments and analyses were made in triplicate.

Set up of the HPLC–MS detection

The hydrolysis procedure described above allowed us to synthesize, purify, and prepare calibrated solutions of the reference standards necessary to the optimization of the chromatographic separation and of the MS detection (Table 1). This was done by incubating large amounts of isolated calf thymus DNA with either SM or CEES. Adducts were isolated by preparative HPLC following hydrolysis. The interest of using DNA as a substrate rather than monomeric guanine and adenine for the synthesis is that the biologically relevant and previously identified adducts are readily produced in CT-DNA. In contrast, the reactivity might be different with the isolated bases and several isomers can be produced. Moreover, treating DNA is a suitable way to obtain the

Table 1. Retention times^a and monitored fragmentations of SM and CEES DNA adducts (bases and nucleosides adducts).

| | Adducts | Retention time (min) | Monitored fragmentations |
|------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| SM | HETE-N7Gua | 21.9 | 256.0 → 105.0 |
| | HETE-N3Ade | 23.8 | 240.0 → 105.0 |
| | N7Gua-ETE-N7Gua | 29.9 | 389.3 → 210.0 |
| | HETE-N7dGuo | 20.8 | 372.2 → 256.0 |
| | HETE-N3dAdo | 21.9 | 356.2 → 240.0 |
| CEES | ETE-N7Gua | 38.2 | 240.0 → 89.0 |
| | ETE-N3Ade | 40.5 | 224.0 → 89.0 |
| | ETE-N7dGuo | 23.5 | 356.2 → 240.0 |
| | ETE-N3dAdo | 25.1 | 340.2 → 224.0 |

^aRetention times were determined on HPLC system 1.

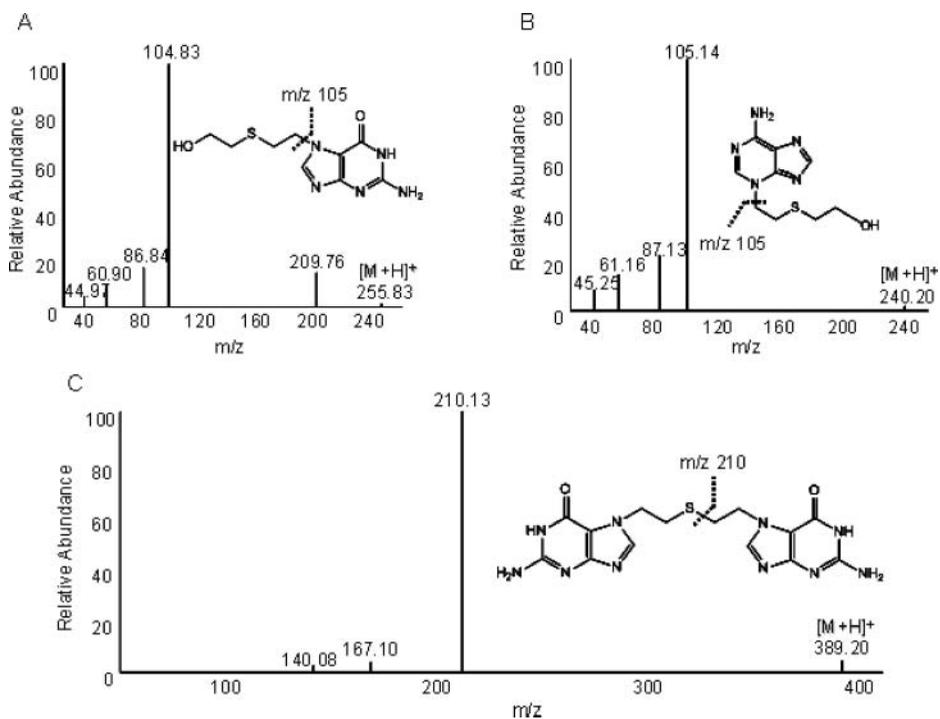


Figure 4. Fragmentation mass spectra of SM DNA base adducts (A) HETE-N7Gua, (B) HETE-N3Ade and (C) N7Gua-ETE-N7Gua. Spectra were obtained by electrospray ionization in the positive mode. The adducts were synthesized by incubating calf thymus DNA with 30 mmol L⁻¹ of SM during 4 h at room temperature followed by hydrolysis and HPLC purification.

SM-biadduct because its formation depends on the close vicinity of two guanine moieties. Such a situation is unlikely to be encountered in diluted solutions of the monomer. With the pure targeted analytes in hands, we determined their fragmentation mass spectra, which are necessary information to set up the MS detection performed in the MRM mode. In this configuration, the triple quadrupolar mass spectrometer monitors with high sensitivity and specificity selected fragments arising from the pseudomolecular ion of the targeted compound. For both the SM adducts HETE-N7Gua and HETE-N3Ade, the major fragment was observed at $m/z = 105$ (Table 1 and Figure 4), together with a minor one at $m/z = 89$. For the SM base biadduct N7Gua-ETE-N7Gua, a major fragment was observed at $m/z = 210$ (Figure 4C). Similar fragmentation reactions were observed for the CEES monoadducts ETE-N7Gua and ETE-N3Ade with a fragment at $m/z = 89$ (Table 1 and supplementary data Figure S4).

After optimization of the mass spectrometer parameters (electrospray high voltage, different voltages along the ion path and collision energy) and of the chromatographic conditions, the limit of detection of the method was in the range of 25 fmol of injected analyte, with a slightly better sensitivity for adenine monoadducts. It should be emphasized that the response of the MS/MS detection was found to be very stable. Dispersion below 10% was recorded for series of standard solutions repeatedly injected along a one-week run of analyses of cellular DNA. A very good linearity of the detection (Figure S5, available online) was observed for the SM and CEES adducts as shown by the r^2 values of the calibration curves (Table 2). Excellent repeatability and reproducibility (Figure S6, available online) were also observed with variation coefficient below 10% for the five

Table 2. Validation of the analytical method for SM and CEES adducts. Linearity was determined by injection of increasing amounts of standards (0.1–4 pmol). Repeatability and reproducibility were evaluated by analyzing several times treated DNA either in a same HPLC run ($n = 8$) or on separated days ($n = 6$), respectively.

| | Linearity (r^2) ^a | Repeatability (c_v) ^b (%) | Reproducibility (c_v) ^b (%) |
|-------------------------|----------------------------------|--|--|
| Sulphur mustard adducts | | | |
| HETE-N7Gua | 0.998 | 4.0 | 9.3% |
| HETE-N7Ade | 0.994 | 3.9 | 8.1% |
| N7Gua-ETE-N7Gua | 0.989 | 4.3 | 5.9% |
| CEES adducts | | | |
| ETE-N7Gua | 0.999 | 7.3 | 6.5% |
| ETE-N7Ade | 0.993 | 8.1 | 6.7% |

^a r^2 is the correlation coefficient of the calibration curve.

^b c_v is variation coefficient of the series of analyses of the same DNA samples.

quantified adducts (Table 2). These excellent performances show that no internal standard is required and this can be explained in several ways. First, the sample treatment is very straightforward, without prepurification step and possible loss of material. Second, normal nucleosides were simultaneously quantified with adducts. Since the results are expressed in number of adducts per million normal nucleosides, normalization is done that eliminates putative variations in injection volumes. Last, no matrix effect was observed. The response of the detector was the same for standards injected either in solution in water or in digested DNA (Figure 5). This can be explained in particular by the large difference in retention times between the analytes and the normal nucleosides, which constitute the bulk of the matrix.

Formation of SM and CEES DNA adducts in CT-DNA

The designed HPLC–ESI–MS/MS assays were first applied to the quantification of SM and CEES adducts in isolated CT-DNA (Figure 6). The data gathered are in agreement

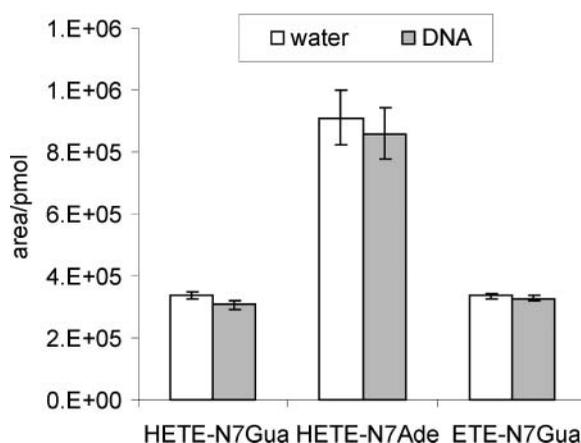


Figure 5. Lack of matrix effect on the HPLC–MS/MS detection of SM and CEES adducts. Solutions of standard adducts were prepared by dilution of stock solution either in water or in digested calf thymus DNA. A calibration curve was determined between 0 and 4 pmol injected. The reported values are the slopes of the calibration curves with standard error.

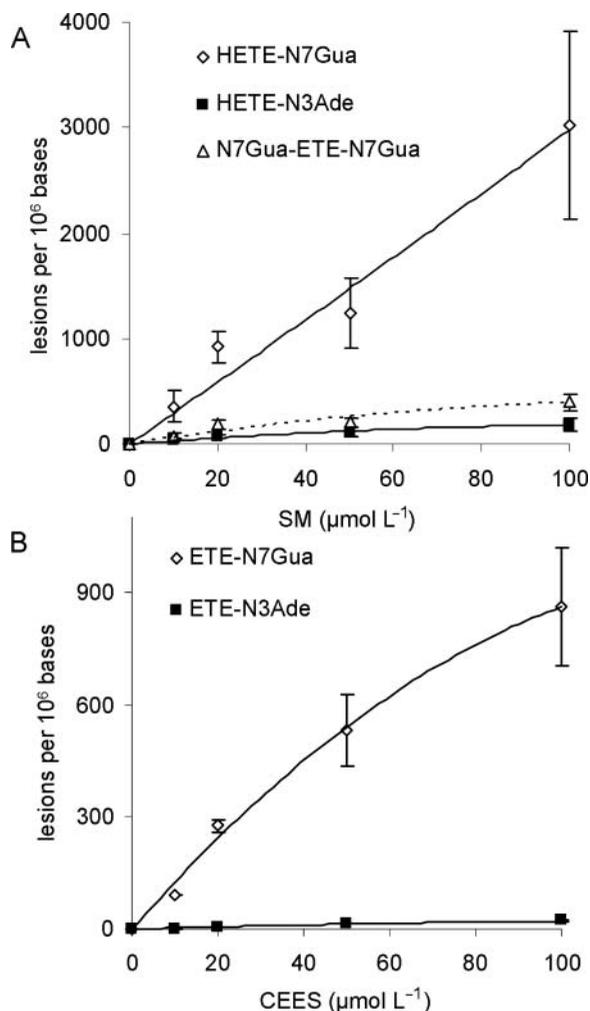


Figure 6. Formation of SM (A) and CEES (B) DNA adducts in isolated double-stranded calf thymus DNA. DNA (1 mg mL^{-1}) in Na_2HPO_4 (50 mmol L^{-1} , pH 7) was treated by 0, 10, 20, 50 or $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ of SM or CEES and DNA adducts formed were quantified by HPLC–MS/MS. The monitored fragmentations corresponded to the release of the reactive part of SM ($m/z = 105$) and CEES ($m/z = 89$). Results were normalized with the respect to the amount of normal bases. Treatments and analyses were made in triplicate.

with those obtained in earlier works, with the advantage of quantifying all adducts in one HPLC analysis. As shown previously, the main target of SM in DNA is the N7 position of guanine (Brookes and Lawley 1963; Fidder et al. 1994; Ludlum et al. 1994; Yu et al. 1994) and to a lesser extent the N3 position of adenine (Brookes and Lawley 1963; Fidder et al. 1994; Ludlum et al. 1994) and N7 positions of two guanine moieties (Brookes and Lawley 1963; Fidder et al. 1994) (Figure 6A). Our HPLC–ESI–MS/MS analyses showed that, at the lowest SM concentrations, HETE-N7Gua represented in average 81% of total SM DNA adducts, whereas N7Gua-ETE-N7Gua and HETE-N3Ade formed 13% and 6%, respectively. We also observed a deviation from linearity for the biadduct at the highest concentration. This result may explain some differences in the distribution SM adducts

between the works cited above. It should be also reminded that the relative yields of the SM adducts were shown to depend on the origin of the DNA sample (Fidder et al. 1994)

The quantification of CEES DNA adducts showed that the N7 position of guanine is even more selectively targeted with respect to the N3 position of adenine by CEES than by SM. Indeed, ETE-N7Gua represented 98% of total alkylated bases in CEES-treated CT-DNA (Figure 6B). When comparing the two toxic agents, it was found that the reactivity of guanine was 3.6 fold higher with SM than with CEES. For adenine, this ratio was 9.4. This information should be kept in mind when using CEES as a simulating agent of SM, especially in terms of mutation spectrum because the initial distribution of alkylated bases is very different. It may be added that additional HPLC-MS/MS signals that could correspond to O^6 -adducts of guanine, a minor but highly mutagenic class of lesions produced by some alkylating agents, as well as formamidopyrimidine derivatives of the SM and CEES adducts that could be produced under alkaline conditions were searched. None was actually detected (data not shown). In summary, concerning DNA alkylating properties of the two studied toxic agents, SM is more reactive than CEES and N7 position of guanine is more targeted by both compounds than adenine. This higher reactivity of the N7 position of guanine can be explained first in terms of nucleophilicity of molecules as formalized for instance in the Swain-Scott equation. Using this approach, Spears et al. (1997) determined a ratio between the amounts of adducts to different cellular targets depending of the s value of the nucleophile. With an s parameter of 1.15 for SM, guanine adducts at N7 are expected to be more frequent than at O^6 . As far as the difference between adenine and guanine is concerned, it should be reminded that the N3 position of adenine points toward the minor groove of DNA and is thus less accessible than the N7 position of guanine.

Formation of SM and CEES DNA adducts in THP1 monocytes DNA

We then applied our assay to cultured human THP1 monocytes. Even at the lowest investigated concentration, a very clear signal was detected for adducts, as illustrated on Figure 7 for CEES. A major difference with experiments involving isolated DNA was that an extraction step was necessary. Depurination in double-stranded DNA is of less concern than at the nucleoside level. Indeed, it is known that the double-helix structure drastically reduces the rate of hydrolysis of the N -glycosidic bond and that N7-adducts are stable for periods as long as several days under physiological conditions (Boysen et al. 2009). However, we limited the temperature of the RNase treatment of our published extraction protocol to 37°C instead of 50°C (Ravanat et al. 2002). No influence of RNA was expected since the corresponding adducts do not efficiently depurinate as shown above. In addition, the amount of contaminating RNA was found to be low (<1%). As observed upon treatment of CT-DNA, the main alkylation site of SM in THP1 monocytes DNA was found to be the N7 position of guanine, while the N3 position of adenine was much less reactive (Figure 8A). The guanine biadduct was produced in significant yield. Altogether, the proportions of each SM DNA adduct (81% HETE-N7Gua, 12% N7Gua-ETE-N7Gua, and 7% HETE-N3Ade) were similar to those determined in isolated DNA. The levels of all DNA adducts in the DNA of SM-treated THP1 monocytes were approximately one order of magnitude lower than in CT-DNA exposed to the same SM concentration. This observation shows that DNA in cells is well protected by the cellular components, which trap SM before it reaches the nucleus. As far as CEES was concerned, the major alkylation product was ETE-N7Gua (Figure 8B). A larger proportion of ETE-N3Ade with respect to ETE-N7Gua was found in cells than in isolated DNA, 11% versus 2%, respectively. In cells, SM was found to be 10 times more reactive than CEES when

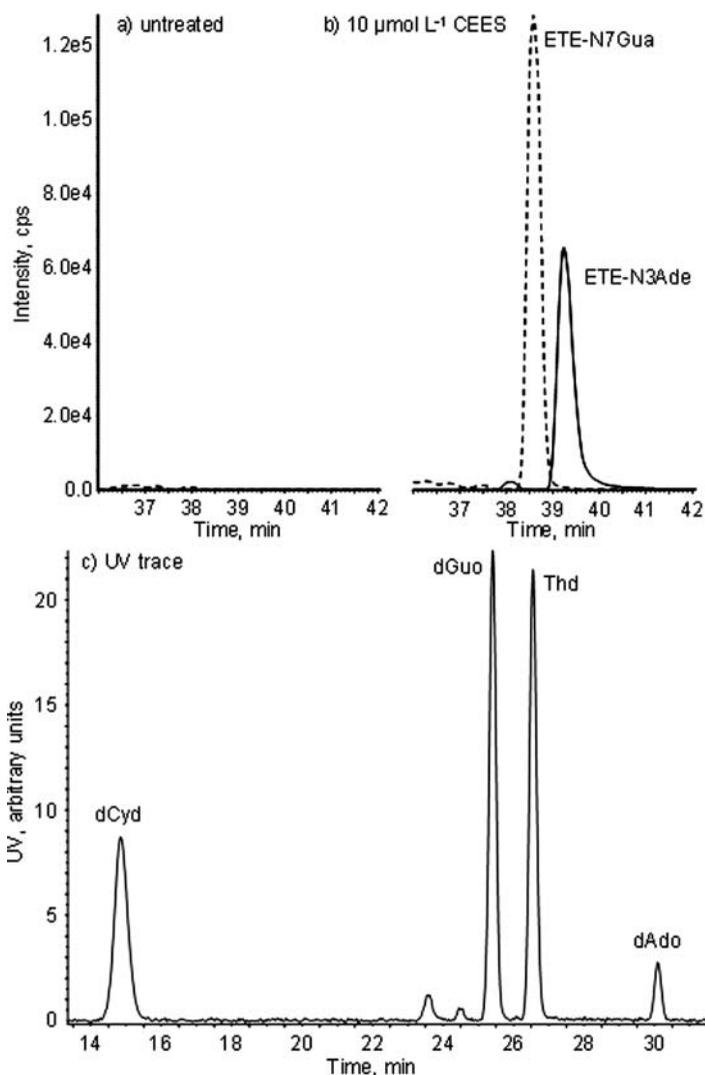


Figure 7. HPLC–MS/MS detection of ETE-N7Gua and ETE-N3Ade in THP1 cells (A) untreated or (B) exposed to $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ CEES. Subpart c shows the UV trace aimed at quantifying normal nucleosides in the latter sample. After treatment, DNA was extracted, hydrolyzed, and injected on HPLC system 1.

all adducts were considered. This may partly explain why, in addition to the absence of biologically deleterious biadducts, CEES is less toxic than SM.

Conclusion

The present results provide a clear picture of the genotoxicity of two related alkylating agents, SM and its monofunctional analog CEES, in isolated CT-DNA and DNA from cultured human cells. The completion of this work was made possible by the development of the first HPLC–ESI–MS/MS method for the simultaneous and individual quantification

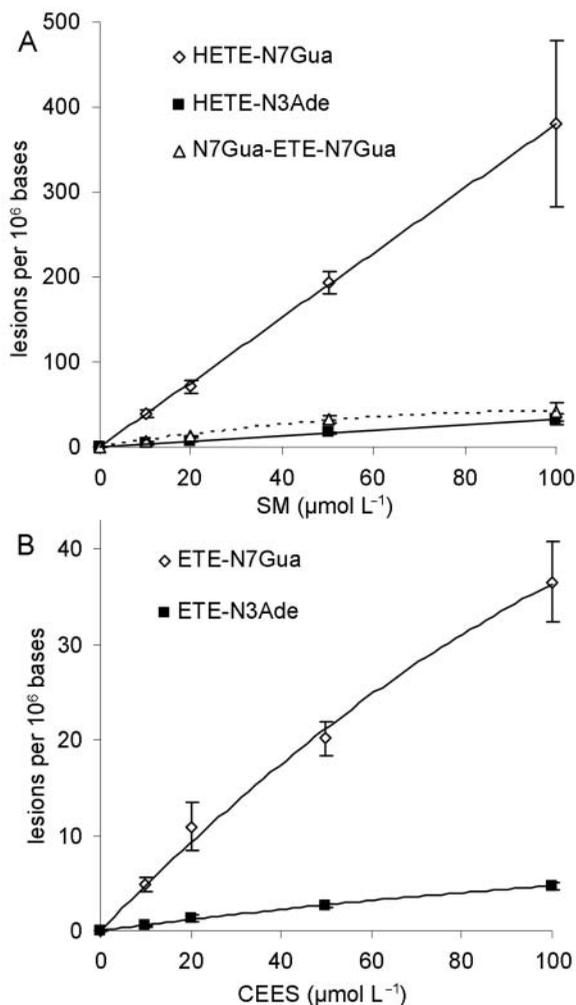


Figure 8. Formation of SM (A) and CEES (B) DNA adducts in THP1 monocytes DNA. THP1 (20×10^6 cells) were treated by 0, 10, 20, 50 or $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ of SM or CEES and DNA adducts formed were quantified by HPLC-MS/MS. The monitored fragmentations corresponded to the release of the reactive part of SM ($m/z = 105$) and CEES ($m/z = 89$). Results were normalized with the respect to the amount of normal bases. Treatments and analyses were made in triplicate.

of the three main SM adducts, as well as the two corresponding CEES DNA lesions. The advantages are that this technique is quantitative and does not require radioactive labeling. The assay also has a higher throughput than ^{32}P -postlabeling; more than hundred samples can be analyzed weekly, from extraction to HPLC-ESI-MS/MS analysis. Last, MS detection permits unambiguous structural identification of the analytes. Application of this assay to isolated DNA and human cells allowed us to precisely determine the relative yield of the SM-induced DNA adducts. An interesting observation was the relatively high yield of biadducts between adjacent or interstrand guanines. These types of DNA damage are known to be particularly deleterious to cells as they are strong blocks for replication and transcription and are less efficiently repaired than single lesions.

Acknowledgements

This work was supported by the French “Agence Nationale pour la Recherche” (ToxYp project, # ANR-10-CSOSG-002-02) and the “Direction Générale de l’Armement” (PDH-2NRBC-C-501).

References

- Balali-Mood, M., and M. Hefazi. 2005. “The Pharmacology, Toxicology, and Medical Treatment of Sulphur Mustard Poisoning.” *Fundamental & Clinical Pharmacology* 19: 297–315.
- Boysen, G., B. F. Pachkowski, J. Nakamura, and J. A. Swenberg. 2009. “The Formation and Biological Significance of N7-Guanine Adducts.” *Mutation Research* 678: 76–94.
- Brookes, P., and P. D. Lawley. 1960. “Reaction of Mustard Gas With Nucleic Acids *in vitro* and *in vivo*.” *Biochemical Journal* 77: 478–484.
- Brookes, P., and P. D. Lawley. 1961. “Reaction of Mono- and Di-Functional Alkylating Agents With Nucleic Acids.” *Biochemical Journal* 80: 496–503.
- Brookes, P., and P. D. Lawley. 1963. “Effects of Alkylating Agents on T2 And T4 Bacteriophages.” *Biochemical Journal* 89: 138–144.
- Douki, T., F. Odin, S. Caillat, A. Favier, and J. Cadet. 2004. “Predominance of the 1, N²-Propano 2'-Deoxyguanosine Adduct Among 4-Hydroxy-2-Nonenal-Induced DNA Lesions.” *Free Radicals in Biology and Medicine* 37: 62–70.
- Easton, D. F., J. Peto, and R. Doll. 1988. “Cancers of the Respiratory-Tract in Mustard Gas Workers.” *British Journal of Industrial Medicine* 45: 652–659.
- Fidder, A., G. W. H. Moes, A. G. Scheffer, G. P. Vanderschans, R. A. Baan, L. P. A. Dejong, and H. P. Benschop. 1994. “Synthesis, Characterization, and Quantitation of the Major Adducts Formed Between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood.” *Chemical Research in Toxicology* 7: 199–204.
- Frelon, S., T. Douki, J. L. Ravanat, J. P. Pouget, C. Tornabene, and J. Cadet. 2000. “High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Measurement of Radiation-Induced Base Damage to Isolated and Cellular DNA.” *Chemical Research in Toxicology* 13: 1002–1010.
- Fujii, T., T. Saito, and T. Nakasaka. 1989. “Purines .34. 3-Methyladenosine and 3-methyl-2'-Deoxyadenosine – Their Synthesis, Glycosidic Hydrolysis, and Ring Fission.” *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37: 2601–2609.
- Gates, K. S., T. Nooner, and S. Dutta. 2004. “Biologically Relevant Chemical Reactions of N7-Alkylguanine Residues in DNA.” *Chemical Research in Toxicology* 17: 839–856.
- Jones, J. W., and R. K. Robins. 1963. “Purine Nucleosides. 3. Methylation Studies of Certain Naturally Occurring Purine Nucleosides.” *Journal of the American Chemical Society* 85: 193–201.
- Kehe, K., and L. Szinicz. 2005. “Medical Aspects of Sulphur Mustard Poisoning.” *Toxicology* 214: 198–209.
- Lawley, P. D., and P. Brookes. 1963. “Further Studies on Alkylation of Nucleic Acids and Their Constituent Nucleotides.” *Biochemical Journal* 89: 127–138.
- Lodhi, I. J., J. F. Sweeney, R. E. Clift, and D. B. Hinshaw. 2001. “Nuclear Dependence of Sulfur Mustard-Mediated Cell Death.” *Toxicological and Applied Pharmacology* 170: 69–77.
- Ludlum, D. B., P. Austinritchie, M. Hagopian, T. Q. Niu, and D. Yu. 1994. “Detection of Sulfur Mustard-Induced DNA Modifications.” *Chemico-Biological Interactions* 91: 39–49.
- Malayappan, B., L. Johnson, B. Nie, D. Panchal, B. Matter, P. Jacobson, and N. Tretyakova. 2010. “Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Analysis of *bis*-N7-Guanine DNA-DNA Cross-Links in White Blood Cells of Cancer Patients Receiving Cyclophosphamide Therapy.” *Analytical Chemistry* 82: 3650–3658.
- Papirmeister, B., C. L. Gross, H. L. Meier, J. P. Petrali, and J. B. Johnson. 1985. “Molecular Basis for Mustard-Induced Vesication.” *Fundamental and Applied Toxicology* 5: S134–S149.
- Rao, M. K., P. S. Bhadury, M. Sharma, R. S. Dangi, A. S. B. Bhaskar, S. K. Raza, and D. K. Jaiswal. 2002. “A Facile Methodology for the Synthesis and Detection of N7-Guanine Adduct of Sulfur Mustard as a Biomarker.” *Canadian Journal of Chemistry* 80: 504–509.
- Ravanat, J. L., T. Douki, P. Duez, E. Gremaud, K. Herbert, T. Hofer, L. Lasserre, C. Saint-Pierre, A. Favier, and J. Cadet. 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.

- Ravanat, J. L., R. J. Turesky, E. Gremaud, L. J. Trudel, and R. H. Stadler. 1995. "Determination of 8-Oxoguanine in DNA by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry and HPLC-Electrochemical Detection: Overestimation of the Background Level of the Oxidized Base by the Chromatography Mass-Spectrometry Assay." *Chemical Research in Toxicology* 8: 1039–1045.
- Singh, R., and P. B. Farmer. 2006. "Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: The Future of DNA Adduct Detection." *Carcinogenesis* 27: 178–196.
- Spears, C. P., S. I. Kang, N. G. Kundu, T. Shamma, and G. A. Olah. 1997. "Swain-Scott Constants and Alkylating Agent Drug Design." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2: 85–100.
- Vanderschans, G. P., A. G. Scheffer, R. H. Marsgroenendijk, A. Fidler, H. P. Benschop, and R. A. Baan. 1994. "Immunochemical Detection of Adducts of Sulfur Mustard to DNA of Calf Thymus and Human White Blood-Cells." *Chemical Research in Toxicology* 7: 408–413.
- Wattana, M., and T. Bey. 2009. "Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat." *Prehospital and Disaster Medicine* 24: 19–29.
- Wei, Y. X., L. J. Yue, Q. Liu, J. Chen, and J. W. Xie. 2011. "A Sensitive High Performance Liquid Chromatography-Positive Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method for N(7)-[2-(2-hydroxyethyl)thio]-ethyl]guanine Determination." *Journal of Chromatography B* 879: 1707–1712.
- Yu, D., T. Q. Niu, P. Austinritchie, and D. B. Ludlum. 1994. "A P-32 Postlabeling Method for Detecting Unstable N-7-Substituted Deoxyguanosine Adducts in DNA." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 7232–7236.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| <i>Liste des abréviations</i> | 7 |
| <i>Liste des schémas, photos, figures et tableaux</i> | 11 |
| Avant-propos | 17 |
| Chapitre 1: Contexte bibliographique | 19 |
| I. Les armes chimiques | 21 |
| 1. Les agents chimiques non létaux | 21 |
| 1.1. Les neutralisants | 21 |
| 1.2. Les incapacitants..... | 21 |
| 2. Les agents chimiques létaux | 22 |
| 2.1. Les suffocants | 22 |
| 2.2. Les agents hémotoxiques | 22 |
| 2.3. Les neurotoxiques | 22 |
| 2.4. Les vésicants | 23 |
| 2.4.1. La lewisite | 23 |
| 2.4.2. L'oxime de phosgène | 24 |
| II. L'ypérite | 24 |
| 1. Historique des synthèses..... | 24 |
| 2. Propriétés physico-chimiques..... | 26 |
| 3. Historique des utilisations militaires | 27 |
| 3.1. Première guerre mondiale | 27 |
| 3.2. Entre les deux guerres | 29 |
| 3.3. Deuxième guerre mondiale | 30 |
| 3.4. Après la deuxième guerre mondiale..... | 30 |
| 3.5. Une molécule, plusieurs appellations..... | 31 |
| 3.6. Les effets d'une exposition à l'ypérite | 31 |
| 3.6.1. Toxicité à court terme ou toxicité aiguë..... | 32 |
| 3.6.1.1. Yeux | 32 |
| 3.6.1.2. Peau | 33 |
| 3.6.1.3. Appareil respiratoire..... | 36 |
| 3.6.1.4. Toxicité systémique..... | 36 |
| 3.6.2. Toxicité à long terme ou toxicité chronique..... | 37 |
| 3.6.2.1. Yeux | 37 |
| 3.6.2.2. Peau | 38 |
| 3.6.2.3. Appareil respiratoire..... | 39 |
| 3.6.3. Prise en charge des victimes d'une exposition à l'ypérite..... | 40 |
| 3.6.3.1. Peau | 40 |
| 3.6.3.2. Yeux | 41 |
| 3.6.3.3. Appareil respiratoire..... | 42 |
| III. Mécanismes à l'origine de la toxicité de l'ypérite | 42 |
| 1. Déplétion du glutathion | 44 |
| 1.1. Glutathion: généralités | 44 |
| 1.2. Glutathion: synthèse | 45 |
| 1.3. Glutathion : rôles | 45 |
| 1.4. Déplétion du glutathion par l'ypérite | 47 |
| 2. Perturbation de l'homéostasie calcique | 49 |
| 2.1. Calcium : généralités | 49 |
| 2.2. Calcium : rôles | 49 |
| 2.3. Perturbation de l'homéostasie calcique par l'ypérite | 50 |
| 3. Induction d'un stress oxydant..... | 53 |

| | |
|--|------------|
| 3.1. Espèces oxydantes | 53 |
| 3.2. Fonctions biologiques des espèces oxydantes..... | 55 |
| 3.3. Défenses antioxydantes..... | 55 |
| 3.3.1. Défenses antioxydantes enzymatiques | 56 |
| 3.3.2. Défenses antioxydantes non enzymatiques | 57 |
| 3.4. Stress oxydant | 58 |
| 3.5. Induction d'un stress oxydant par l'ypérite..... | 59 |
| IV. Alkylation de l'ADN par l'ypérite et conséquences..... | 63 |
| 1. L'ADN..... | 63 |
| 1.1. Structure..... | 63 |
| 1.2. Fonctions | 66 |
| 1.2.1. Transmission de l'information génétique..... | 66 |
| 1.2.2. Synthèse des protéines | 66 |
| 2. Modifications de la structure d'ADN | 67 |
| 2.1. Modifications d'origine endogène | 67 |
| 2.2. Modifications d'origine exogène | 71 |
| 2.2.1. Agents physiques | 71 |
| 2.2.2. Agents chimiques..... | 72 |
| 2.2.2.1. Alkylation directe de l'ADN | 72 |
| 2.2.2.2. Attaque de l'ADN après métabolisation..... | 73 |
| 2.3. Alkylation de l'ADN par l'ypérite | 74 |
| 3. Conséquences biologiques des modifications de l'ADN..... | 77 |
| 3.1. Arrêt du cycle cellulaire..... | 77 |
| 3.2. La réparation des dommages à l'ADN..... | 80 |
| 3.2.1. Mécanismes de réparation fidèle..... | 80 |
| 3.2.1.1. La réparation par réversion directe..... | 80 |
| 3.2.1.2. La réparation des mésappariements..... | 81 |
| 3.2.1.3. La réparation par excision de bases..... | 83 |
| 3.2.1.4. La réparation par excision de nucléotides | 85 |
| 3.2.1.5. La réparation par recombinaison de l'ADN | 87 |
| 3.2.2. La synthèse translésionnelle..... | 90 |
| 3.3. De la mutation au cancer | 91 |
| 3.4. La mort cellulaire..... | 93 |
| 3.4.1. L'apoptose..... | 93 |
| 3.4.2. La nécrose | 95 |
| 4. Conséquences de l'alkylation de l'ADN par l'ypérite | 95 |
| 4.1. Alkylation de l'ADN et toxicité aiguë de l'ypérite..... | 95 |
| 4.1.1. L'hypothèse de Papirmeister..... | 95 |
| 4.1.2. Alkylation de l'ADN et mort cellulaire..... | 98 |
| 4.1.3. Alkylation de l'ADN et signalisation..... | 100 |
| 4.1.4. Alkylation de l'ADN et réparation..... | 102 |
| 4.2. Alkylation de l'ADN et toxicité chronique..... | 103 |
| Chapitre 2: Du contexte aux objectifs | 107 |
| Chapitre 3: Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite par HPLC-MS/MS | 113 |
| I. Les méthodes de détection quantitative des dommages à l'ADN..... | 115 |
| 1. Les méthodes biochimiques..... | 115 |
| 1.1. Les méthodes immunologiques..... | 115 |
| 1.2. Les méthodes enzymatiques | 116 |
| 2. Les méthodes chromatographiques..... | 117 |
| 2.1. Utilisation de composés radioactifs | 117 |
| 2.2. Post-marquage au ³² P..... | 118 |
| 2.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse..... | 119 |
| 2.4. HPLC couplée à une détection électrochimique ou par fluorescence | 120 |
| 2.5. HPLC couplée à la spectrométrie de masse | 121 |
| 2.6. HPLC-MS/MS | 123 |

| | |
|--|------------|
| II. Mise au point d'une méthode de détection des adduits de l'ypérite et de son analogue monofonctionnel par HPLC-MS/MS | 126 |
| 1. Introduction | 126 |
| 2. Méthode de détection quantitative des lésions de l'ADN au laboratoire..... | 127 |
| 3. Mise au point d'une méthode de détection quantitative des adduits de l'ypérite | 129 |
| 3.1. Synthèse des adduits de l'ypérite..... | 129 |
| 3.2. Caractérisation des adduits de l'ypérite en HPLC-MS/MS | 130 |
| 3.3. Etude de la dépurination des adduits de l'ypérite dans les conditions de la digestion enzymatique | 132 |
| 3.4. Essais d'hydrolyse | 133 |
| 3.5. Optimisation des conditions d'hydrolyse..... | 135 |
| 3.5.1. Dépurination quantitative des adduits de l'ypérite sous forme 2' désoxyribonucléosides modifiés | 135 |
| 3.5.2. Etude de la stabilité des adduits à l'ARN de l'ypérite..... | 136 |
| 3.6. Préparation de solutions calibrées..... | 138 |
| 3.7. Extension de la méthode aux adduits du CEES | 139 |
| 3.8. Validation analytique de la méthode de détection des adduits de l'ypérite et du CEES | 143 |
| 3.8.1. Répétabilité et reproductibilité | 143 |
| 3.8.2. La linéarité | 144 |
| 3.8.3. L'effet matrice..... | 145 |
| 3.9. Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES <i>in vitro</i> | 145 |
| 3.9.1. Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans de l'ADN isolé..... | 146 |
| 3.9.2. Quantification des adduits de l'ypérite et du CEES dans l'ADN de monocytes humains THP1 | 147 |
| 4. Conclusion | 149 |

Chapitre 4: Etude de la formation et de la persistance des adduits de l'ypérite chez la souris sans poils SKH-1 151

| | |
|--|------------|
| I. Introduction | 153 |
| II. Formation et persistance des adduits de l'ypérite dans la peau | 155 |
| 1. Peau exposée | 155 |
| 1.1. Suivi du processus lésionnel | 155 |
| 1.2. Formation des adduits | 157 |
| 1.2.1. Exposition liquide | 157 |
| 1.2.2. Exposition vapeur | 159 |
| 1.3. Induction de l'apoptose par l'ypérite | 160 |
| 1.4. Persistance des adduits..... | 161 |
| 2. Peaux non directement exposées | 164 |
| 2.1. Formation des adduits..... | 164 |
| 2.2. Persistance des adduits..... | 165 |
| III. Formation et persistance des adduits dans les organes internes | 167 |
| 1. Formation des adduits..... | 167 |
| 1.1. Formation des adduits après traitement à 60 mg/kg..... | 167 |
| 1.2. Formation des adduits après une exposition à 2 et 6 mg/kg..... | 168 |
| 2. Persistance des adduits | 171 |
| 3. Effet de la détersion sur la persistance des adduits..... | 174 |
| 4. Dosage de la 8-oxo-dGuo | 177 |
| IV. Conclusion | 181 |

Chapitre 5: Impact d'une exposition à l'ypérite sur les activités de réparation de l'ADN 187

| | |
|---|------------|
| I. Introduction | 189 |
| II. Impact d'une exposition à l'ypérite sur certaines activités glycosylases du BER | 190 |
| 1. Principe de la biopuce oligonucléotidique..... | 190 |
| 2. Impact de l'ypérite sur certaines activités glycosylases du BER..... | 191 |
| 2.1. Effet de la concentration de l'ypérite sur les activités de réparation 4 h après exposition..... | 191 |

| | |
|--|------------|
| 2.2. Effet de la concentration de l'ypérite sur les activités de réparation 24 h après exposition..... | 193 |
| III. Impact d'une exposition à l'ypérite sur la réparation de dommages par le BER et le NER | 194 |
| 1. Principe de la biopuce plasmide | 194 |
| 2. Impact de l'ypérite sur la réparation globale de lésions prises en charge par le BER ou le NER..... | 195 |
| 2.1. Effet de la concentration de l'ypérite sur les activités de réparation 4 h après exposition..... | 196 |
| 2.2. Effet de la concentration d'ypérite sur les activités de réparation 24 h après exposition..... | 197 |
| 3. Corrélation entre les taux d'adduits et les activités de réparation du NER..... | 198 |
| 3.1. 4 h après exposition | 199 |
| 3.2. 24 h après exposition | 201 |
| IV. Conclusion | 202 |
| Chapitre 6: Vers de nouveaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite | 205 |
| I. Introduction | 207 |
| II. Caractérisation d'un nouvel adduit à l'ADN formé par l'ypérite..... | 207 |
| 1. Synthèse et caractérisation HPLC-MS/MS de l'adduit formé par le conjugué ypérite-GSH | 207 |
| 2. Quantification de l'adduit GSH-HETE-N7Gua <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | 209 |
| 2.1. Quantification <i>in vitro</i> | 209 |
| 2.2. Quantification <i>in vivo</i> | 210 |
| 2.2.1. Formation..... | 210 |
| 2.2.2. Persistance..... | 211 |
| III. Mise au point d'une méthode de quantification des conjugués formés par le CEES avec le glutathion, la N-acétylcystéine et la cystéine..... | 213 |
| 1. Mise au point d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS des conjugués du CEES avec le glutathion, la N-acétylcystéine et la cystéine..... | 215 |
| 2. Quantification des adduits et des conjugués formés par le CEES dans des kératinocytes primaires.... | 217 |
| 2.1. Evaluation de la cytotoxicité du CEES | 217 |
| 2.2. Cinétique de formation | 218 |
| 2.3. Effet dose | 219 |
| 2.4. Cinétique de réparation..... | 220 |
| 3. Quantification des adduits et des conjugués formés par le CEES dans des cellules épithéliales alvéolaires | 221 |
| 3.1. Evaluation de la cytotoxicité du CEES | 221 |
| 3.2. Cinétique de formation | 222 |
| 3.3. Effet dose | 224 |
| IV. Conclusion | 228 |
| Chapitre 7: Discussion générale..... | 231 |
| I. L'ypérite : une arme chimique toujours d'actualité | 233 |
| II. Toxicité de l'ypérite | 234 |
| III. Alkylation de l'ADN..... | 235 |
| IV. Positionnement du travail de thèse | 237 |
| V. Les adduits de l'ypérite..... | 238 |
| VI. Mise au point d'une méthode de quantification des adduits de l'ypérite sensible et haut débit..... | 239 |
| VII. Formation des adduits de l'ypérite <i>in vitro</i> | 242 |
| VIII. Le modèle animal choisi..... | 247 |
| IX. Les adduits de l'ypérite dans la peau..... | 248 |
| X. Les adduits de l'ypérite dans les organes internes | 253 |
| XI. Impact de l'ypérite sur les activités de réparation | 257 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre 8: Conclusion et perspectives | 261 |
| Chapitre 9: Conditions expérimentales | 269 |
| I. Culture cellulaire | 271 |
| 1. Produits et matériel | 271 |
| 2. Monocytes THP1 | 271 |
| 3. Kératinocytes primaires | 272 |
| 3.1. Isolement des kératinocytes primaires | 272 |
| 3.2. Culture des kératinocytes primaires | 273 |
| 4. Cellules A549 | 274 |
| 5. Extraction d'ADN | 274 |
| 6. Extraction de la fraction cytosolique et dosage des protéines | 275 |
| 7. Test de cytotoxicité | 276 |
| II. Animaux et exposition à l'ypérite | 276 |
| 1. Animaux | 276 |
| 2. Ypérite et sécurité | 277 |
| 3. Anesthésie et analgésie des animaux | 277 |
| 4. Exposition cutanée à l'ypérite | 278 |
| 4.1. Exposition liquide | 278 |
| 4.2. Exposition vapeur | 278 |
| 5. Décontamination | 279 |
| 6. Mesure de la perte insensible en eau | 280 |
| 7. Déterision | 281 |
| 8. Prélèvements des tissus | 281 |
| 9. Quantification des cellules apoptotiques | 282 |
| 10. Broyage des tissus et extraction d'ADN | 283 |
| III. Digestion de l'ADN | 284 |
| IV. Analyses HPLC-MS/MS | 285 |
| 1. Analyse des dommages à l'ADN | 285 |
| 2. Analyse des conjugués du CEES | 285 |
| V. Mesure des activités de réparation | 286 |
| 1. Mesure des activités d'excision (biopuce oligonucléotidique) | 286 |
| 2. Mesure des activités d'excision-resynthèse (biopuce plasmide) | 288 |
| VI. Analyses statistiques | 289 |
| Liste des publications et des communications | 291 |
| Références bibliographiques | 295 |
| Annexe | 329 |