

Description moléculaire de la brûlure à l'ypérite chez l'animal et pistes pour de nouvelles thérapies.

Thierry Douki¹, Isabelle Boudry², Mohamed Batal^{1,2}, Cécile Cléry-Barraud², Stéphane Mouret², Sylvie Sauvaigo¹

¹CEA, INAC, SCIB, UJF & CNRS, LCIB (UMR_E 3 CEA-UJF et FRE 3200), Laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques », 17 Rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.

²Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Unité de Brûlures Chimique, 24 av. des Maquis du Grésivaudan, Antenne de La Tronche, BP87, 38702 La Tronche Cedex

thierry.douki@cea.fr; iboudry@crssa.net

Résumé – Agent toxique de guerre bien connu, l'ypérite reste une menace d'actualité pour d'éventuelles actions terroristes. Les mécanismes moléculaires de l'action de l'ypérite sont encore mal connus, ce qui limite la définition de stratégies thérapeutiques efficaces. Le projet ToxYp s'inscrit dans le cadre de cette recherche. A travers une série d'études animales sur la souris sans poils SKH-1 exposée par voie cutanée à l'ypérite, nous avons montré la cinétique d'apparition des lésions par des méthodes non invasives et corrélé ces symptômes avec des marqueurs moléculaires d'expression génique. L'inflammation semble jouer un rôle majeur. Nous avons aussi quantifié la formation d'adduits à l'ADN dans la peau et dans des organes internes. Nous avons ainsi montré que si la diffusion radiale de l'ypérite est limitée dans la peau, le toxique passe efficacement dans le sang et atteint en particulier le cerveau et les poumons. Par ailleurs, l'utilisation de tests d'activité indique que l'ypérite diminue les capacités de réparation de l'ADN. Nous nous sommes ensuite intéressés à une série de stratégies de traitement de la brûlure par l'ypérite et notamment la détersion précoce des lésions.

Abstract – Sulphur mustard is a well known warfare agent that remains a threat mainly in relation with terrorist actions. The molecular mechanisms of the action of sulphur mustard are still poorly understood. This limits the design of efficient therapeutic strategies. The ToxYp project aims at providing novel data on this topic. Through a series of animal studies on SKH-1 hairless mice cutaneously exposed to sulphur mustard, we have determined the kinetic of formation of skin lesions and correlated these symptoms with molecular markers of gene expression. Inflammation appears to play a major role. We have also quantified the formation of sulphur mustard adducts to DNA in skin and internal organs. We thus showed that the radial diffusion of sulphur mustard is limited while the diffusion towards internal organs, and in particular brain and lungs, is efficient. Moreover, use of specific activity tests allowed us to show that sulphur mustard decreases DNA repair activities. Last, we investigated a series of novel therapeutic strategies of the sulphur mustard-induced burns and in particular of the early debridement of lesions.

1. Introduction

L'ypérite, ou gaz moutarde, est un agent vésicant utilisé comme toxique de guerre lors de la première guerre mondiale mais aussi plus récemment par exemple lors du conflit Iran-Iraq. Du fait de sa synthèse aisée et de l'existence de stocks non négligeables, l'ypérite reste une menace d'actualité puisqu'elle pourrait être utilisée à des fins terroristes¹. Ces dernières années ont donc vu se développer un nombre croissant d'études sur ce toxique puisque si ses effets sont bien connus², le mécanisme biochimique de son action reste à préciser au-delà de l'alkylation massive des biomolécules^{3,4}. De même, aucune stratégie thérapeutique satisfaisante n'est disponible pour soigner les brûlures induites par l'ypérite sur la peau⁵. Il est également à noter que l'ypérite est classée comme composé cancérigène certains chez l'humain, capable notamment d'induire des tumeurs par

exemple dans les poumons⁶. C'est dans ce contexte qu'a été conçu le projet ToxYp, financé dans l'axe transverse du programme CSOSG 2010. La stratégie consiste en une description moléculaire de la brûlure à l'ypérite dans un modèle murin afin de définir des biomarqueurs d'intérêt pour la mise au point de thérapies innovantes. Ce travail a été structuré autour de 4 tâches :

- Mise en place du modèle animal et étude de la brûlure par des méthodes non-invasives,
- Identification de marqueurs géniques et protéiques,
- Etudes de la génotoxicité de l'ypérite dans la peau et les organes internes suite à une exposition cutanée,
- Etude de stratégies thérapeutiques contre la brûlure à l'ypérite.

Le bilan du projet est positif puisqu'une série d'observations originales ont été faites sur les événements moléculaires associés à une exposition à l'ypérite. De plus,

des pistes ont été testées pour un meilleur traitement des brûlures.

2. Approches expérimentales

2.1 Modèle animal et intoxication

Les études de toxicité cutanée de l'ypérite ont été réalisées sur un modèle de souris sans pelage hr/hr SKH-1 euthymiques âges de 4 à 6 semaines (Laboratoire Charles River)⁷. Les animaux ont été anesthésiés par un mélange de kétamine (Panpharma, 33.3 mg/kg) et de diazepam (Valium®, Roche, 37.5 mg/kg). La buprenorphine (Temgesic®, Schéring-Plough, 0.05 mg/kg) a été employée comme antalgique et administrée toutes les 12 heures pendant 2 jours. L'ypérite, préalablement diluée dans le dichlorométhane a été déposée sur une zone circulaire cutanée du dos de l'animal de 0.28 cm². Quatre doses d'ypérite liquide (0.6, 2, 6 et 60 mg.kg⁻¹) ont été étudiées selon les expériences de façon à obtenir des brûlures superficielles du second degré et des brûlures plus sévères du second degré profond. Cinq ou six animaux différents ont été utilisés par dose et par temps. Quatre heures après l'exposition, la peau du dos des animaux a été décontaminée par essuyage à l'aide d'éponges imbibées d'hypochlorite de sodium à 8 g L⁻¹ de chlore actif selon les protocoles en vigueur à l'IRBA. Les animaux ont ensuite été sacrifiés après différents temps selon les études.

2.2 Suivi microscopique

Les animaux ont été séquentiellement sacrifiés à J1, J3 et J7 après l'exposition cutanée. Des biopsies de peaux saines et intoxiquées ont été prélevées puis fixées dans une solution de formol neutralisée à 10% avant d'être incluses dans la paraffine. La méthode trichromique usuelle (Hématéine-Eosine-Safran ou HES) a été réalisée pour des études morphologiques globales, cellulaires et matricielles des tissus lésés par l'ypérite.

2.3 Expression génomique

Des biopsies de peaux saines et intoxiquées ont été prélevées, puis congelées à -20°C en vue de dosages de RT-qPCR. Pour assurer la normalisation des données de qPCR, 4 gènes de référence ont été ajoutés avec les échantillons (Hprt, Cyca, Tbp, Arbp). L'expression temporelle de gènes cibles de l'inflammation (interleukines : IL1β, IL6 et chémokines : CCR1, CXCL2) a été précédemment quantifiée à J1, J3 et J7. Cette analyse a été complétée par l'étude de l'expression de protéases (MMP-2, -3, -9, -13 et TIMP-1) et d'une protéine de structure de la jonction épidermique (JDE) (Lamc2).

2.4 Mesures des adduits à l'ADN

Les adduits de l'ypérite à l'ADN ont été quantifiés par une méthode mise au point dans le cadre du projet et basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie

de masse⁸. L'ADN extrait des échantillons d'intérêt est hydrolysé par un traitement enzymatique et thermique afin de libérer les bases nucléiques et les adduits. Le mélange est séparé par HPLC. Les adduits sont quantifiés spécifiquement par spectrométrie de masse, tandis que les bases normales, en large excès, sont quantifiées avec un détecteur UV. Les mesures ont été réalisées dans des biopsies de peau de 8 mm prélevées sur la zone contaminée, en position adjacente ou à une distance de 2 cm. Des mesures ont également été réalisées dans le cerveau, les poumons, les reins, la rate et le foie.

2.5 Mesure des activités de réparation de l'ADN

Les activités de réparation de l'ADN ont été quantifiées sur deux types de puces mises au point au laboratoire LAN. Dans le premier, qui mesure les activités d'excision-resynthèse, des ADN plasmidiques portant chacun une lésion spécifique (oxydation, alkylation, photoproduit) sont déposés sur une lame de verre. L'extrait protéique testé est incubé en présence de nucléosides triphosphates fluorescents qui sont incorporés lors de l'étape de resynthèse s'il y a réparation. Il est ainsi possible de quantifier simultanément la réparation d'un large panel de lésions. La seconde version de ce test vise les activités glycosylases de la réparation par excision de bases. Elle utilise des oligonucléotides portant une lésion et un fluorophore qui est perdu lors de l'excision, étape initiale de la réaction de réparation. Ces mesures ont été réalisées sur la peau traitée, le cerveau, les poumons et les reins.

3. Suivi microscopique de la brûlure et marqueurs moléculaires

Nos résultats précédents ont permis de démontrer que la souris SKH-1 était un modèle pertinent pour étudier la physiopathologie cutanée induite par l'ypérite. Après exposition cutanée, les paramètres macroscopiques, tels que l'érythème, l'œdème et la nécrose ont été observés dans ce modèle. Un suivi microscopique complémentaire du tissu lésé a été réalisé.

3.1 Suivi microscopique

L'analyse histologique du tissu lésé à J1, J3 et J7 post-exposition confirme que la sévérité de la brûlure est corrélée à la dose. A J1, pour les doses de 0.6 et 6 mg/kg, on observe une vacuolisation des cellules basales de l'épiderme (Fig. 1A et 1B) alors qu'à 60 mg/kg, la nécrose de l'épiderme est déjà installée et recouvre toute la zone brûlée (Fig. 1C).

La formation de microvésications (fig. 1D) qui signe véritablement l'exposition à ce toxique est observée pour la plus faible dose à J3 post-exposition mais pas pour les doses 6 et 60 mg/kg aux temps de sacrifice définis. A J7, l'eschare commence à se détacher pour la dose de 0.6 mg/kg alors qu'on note une nécrose de coagulation de l'épiderme et du derme profond pour la dose de 60 mg/kg.

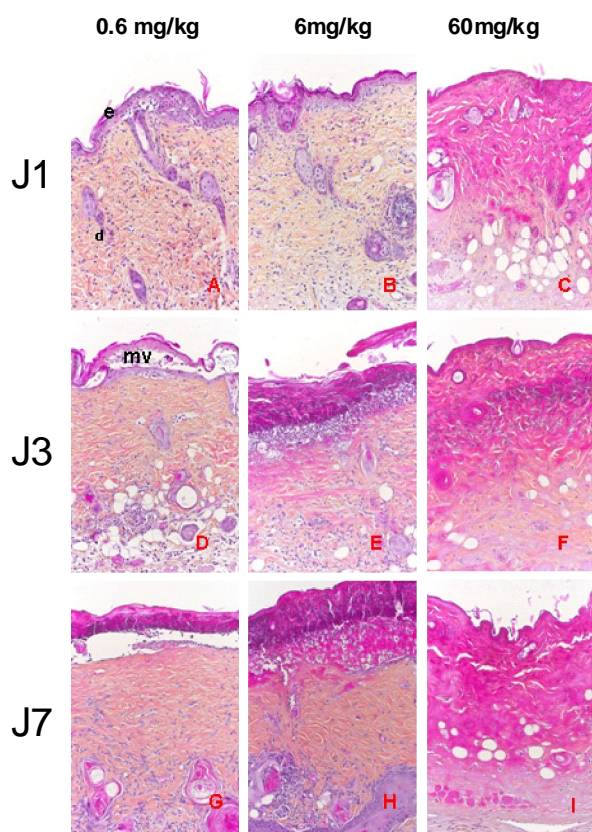


Figure 1 : Evolution microscopique des lésions cutanées induites par l'ypérite chez la souris SKH-1 (n=3 souris par dose et par temps). *e*: épiderme, *d*: derme, *v*: vacuolisation, *mv*: microvésication. Coloration HES, grossissement x200.

3.2 Marqueurs moléculaires

L'expression temporelle des métalloprotéases : MMP-2, -3, -9, -13, de TIMP-1 (inhibiteur des MMP) et d'une protéine de structure de la membrane basale de l'épiderme : la Lamc2 (chaîne $\gamma 2$ de la laminine 5) a été quantifiée. Les résultats sont illustrés dans le tableau I. Pour l'ensemble de la cinétique étudiée, l'exposition à l'ypérite induit une augmentation de l'expression de tous les gènes étudiés mais l'effet dose n'est pas observé.

Parmi les MMPs étudiées, une induction importante de l'expression des MMP-9,-13 et de l'inhibiteur TIMP-1, est notée dès J1 et atteint son maximum à J7. Ces résultats confirment leur rôle régulateur dans la réponse inflammatoire liée à l'ypérite dès J1 après l'exposition et leur implication majeure dans la formation du tissu de granulation à partir de J7. A J3, pour la dose de 0,6 mg/kg, on observe une augmentation importante de l'expression du gène de la LamC2. Ce marqueur de la migration des cellules épithéliales confirme la mise en place du processus cicatriciel observé au niveau des berges de la plaie à cette faible dose.

	Dose mg/kg	Lamc 2	MMP 2	MMP 3	MMP 9	MMP1 3	TIMP 1
J 1	0,6	3	1	2	1	1	6
	6	4	2	1	4	6	9
	60	3	1	1	8	3	3
J 3	0,6	12	2	4	2	1	4
	6	5	1	4	4	4	8
	60	2	1	3	5	3	9
J 7	0,6	3	2	4	2	7	3
	6	5	4	14	10	46	16
	60	3	5	6	8	21	11

Tableau I : Cinétique de l'expression relative des gènes MMP-2, 3, 9, 13, TIPM1 et de la LamC2 dans la peau de souris SKH-1 exposée à l'ypérite. Les résultats sont exprimés par le ratio : peaux ypéritées/ peaux témoins, n = 9 échantillons par dose et par temps.

4. Génotoxicité de l'ypérite

L'ypérite est un agent alkylant puissant capable de réagir avec de nombreuses biomolécules dont l'ADN. Elle y induit notamment la formation d'adduits avec la guanine (Gua-Yp) et l'adénine (Ade-Yp), ainsi que de pontage entre deux guanines (Gua-Yp-Gua)^{9,10}. La formation de ces adduits est en partie responsable de la mort cellulaire dans les tissus exposés à de fortes doses. Ils sont également vraisemblablement impliqués dans l'induction des cancers induits par l'ypérite.

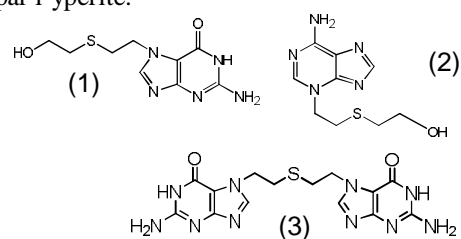


Figure 2 : Structure des adduits de l'ypérite à l'ADN : (1) Gua-Yp (2) Ade-Yp et (3) Gua-Yp-Gua.

4.1 Adduits dans la peau

Le taux d'adduits a été suivi dans l'ADN après exposition à 2, 6 et 60 mg/kg, de 6 h à 21 jours. Dans tous les échantillons, l'ordre d'importance des trois adduits était le suivant Gua-Yp > Gua-Yp-Gua > Ade-Yp. Dans la zone directement exposée, la fréquence des adduits diminue dès 24 h, signe d'une réparation efficace. Cependant, et des adduits sont encore détectables 21 jours après exposition pour les trois doses.

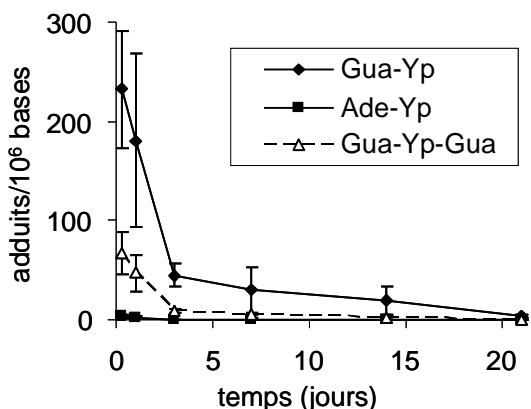


Figure 3 : Variation en fonction du temps du niveau d'adduits dans l'ADN dans la peau de souris SKH-1 exposées à l'ypérite (60 mg/kg)

La diffusion radiale de l'ypérite dans la peau semble très limitée et n'est observée qu'à la plus forte dose. En position immédiatement adjacente, le taux d'adduit est seulement 10% de celui de la zone contaminée. A 2 cm du dépôt, le niveau de dommage à l'ADN est 200 fois plus faible, à la limite de détection.

4.2 Adduits dans les organes internes

A l'inverse de la diffusion limitée dans la peau, un passage efficace de l'ypérite dans la circulation sanguine est mis en évidence. En effet, des adduits sont observés pour les trois doses dans les 5 organes internes étudiés. De façon inattendue, le moins touché est le foie dont le rôle dans la détoxification est pourtant bien établi. L'ADN des poumons et du cerveau et plus endommagé et contient une quantité similaire d'adduits. Les cas du rein et de la rate sont intermédiaires. On note également que contrairement à la peau, le taux d'adduit ne diminue pas voire augmente entre 6h et 1 jour post-traitement. Cela suggère l'existence d'un réservoir d'ypérite entraînant un relargage de la molécule dans l'organisme pendant les premiers temps de la contamination. On observe cependant bien une élimination rapide des dommages après 24 h.

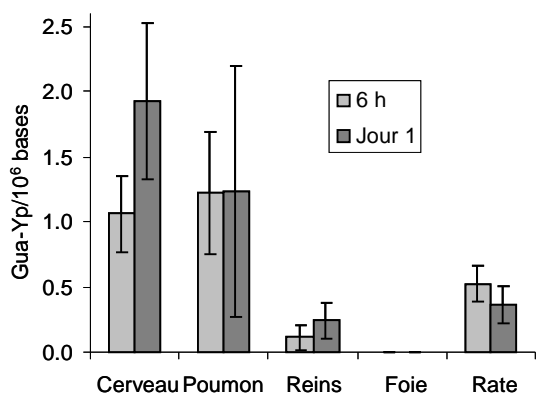


Figure 4 : Niveau d'adduit Gua-Yp dans les organes internes de souris exposées à l'ypérite à une dose de 6 mg/kg.

4.3 Effet de l'ypérite sur la réparation de l'ADN

Les activités de réparation sont dosées à la fin de l'exposition à l'ypérite (temps 4h) et 20h après (temps 24h). Dans la peau, les activités initiales d'excision/resynthèse sont très faibles. On observe cependant une décroissance avec les 2 doses de composé appliquées (0,6 et 6 mg/kg) et pour les 2 temps de mesure (4h et 24h). De façon similaire, les activités glycosylases/AP endonucléases sont également inhibées dans toutes les conditions testées.

De façon remarquable, alors que les activités glycosylases/AP endonucléase ne sont pas significativement modifiées dans les autres tissus testés (rein, poumon, cerveau), les activités excision/resynthèse sont inhibées dans le cerveau et le rein. Les résultats sont plus complexes au niveau des poumons, où on observe une stimulation des activités Réparation par Excision de Nucléotides à 4h uniquement.

Ceci révèle un impact du composé au niveau d'organes distants et confirme la diffusion rapide de l'Ypérite dans l'organisme. Le mécanisme responsable de l'inhibition des voies de réparation n'est pas identifié ce jour. On peut supposer que les activités sont « consommées » afin de limiter l'impact génotoxique du composé.

5. Essais de nouvelles stratégies thérapeutiques

La déterision ou l'élimination des tissus nécrotiques est une composante essentielle de la prise en charge médicale des brûlures. Quatre ou 24h après exposition à deux doses d'ypérite liquide (6 et 60 mg/kg), la peau de dos des souris SKH-a été détergée à l'aide d'un système hydrochirurgical haute pression (le VersajetTM). Un suivi macroscopique des lésions cutanées a été effectué à J2, J3, J4 et J7 puis les animaux ont été séquentiellement sacrifiés à J3 et J7 pour réaliser un dosage des adduits dans la peau et dans les organes internes. Les résultats sont en cours d'analyse.

6. Conclusions

Le projet ToxYp a apporté de nombreuses données originales sur la problématique de l'exposition cutanée à l'ypérite. Nous avons pu montrer que parmi les méthodes non invasives testées, le suivi de la fonction barrière était un outil simple et potentiellement utilisable sur le terrain, pour évaluer la sévérité des lésions induites par l'ypérite. Les biomarqueurs moléculaires ont par ailleurs clairement mis en évidence un rôle majeur de l'inflammation dans les premiers jours suivant l'exposition (J1 et J3). Nos résultats ont également souligné une surexpression de la MMP-9 et de la MMP-13 fortement impliquées dans la régulation du processus inflammatoire à J1 et dans la formation du tissu de granulation à J7.

En ce qui concerne l'aspect génotoxicité, les développements analytiques réalisés dans le cadre de

ToxYp ont permis la première étude précise de la formation des adduits à l'ADN chez l'animal. Les deux résultats majeurs sont la faible diffusion radiale de l'ypérite dans la peau, et son passage efficace dans les organes internes. Le cerveau, non protégé par la barrière hémato-encéphalique comme c'est le cas pour de nombreux toxiques, est un organe-cible important. Nous avons pu également montrer que l'ypérite avait un effet négatif sur plusieurs activités de réparation de l'ADN, renforçant ainsi l'impact génotoxique de cette molécule.

Références

- (1) Wattana, M.; Bey, T. M. Prehospital Disaster Medicine 2009.
- (2) Kehe, K.; Balszuweit, F.; Steinritz, D.; Thiermann, H. Toxicology 2009, 263, 12-19.
- (3) Cullumbine, H. British Journal of Dermatology 1946, 58, 291-294.
- (4) Kehe, K.; Balszuweit, F.; Emmeler, J.; Kreppel, H.; Jochum, M.; Thiermann, H. Eplasty 2008, 8, e32.
- (5) Kehe, K.; Szinicz, L. Toxicology 2005, 214, 198-209.
- (6) Hosseini-Khalili, A.; Haines, D. D.; Modirian, E.; Soroush, M.; Khateri, S.; Joshi, R.; Zendehtdel, K.; Ghanei, M.; Giardina, C. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2009, 678, 1-6.
- (7) Vallet, V.; Poyot, T.; Cléry-Barraud, C.; Coulon, D.; Sentenac, C.; Peinnequin, A.; Boudry, I. Cutaneous and Ocular Toxicology 2011, 31, 38-47.
- (8) Batal, M.; Boudry, I.; Cléry-Barraud, C.; Mouret, S.; Douki, T. Toxicological and Environmental Chemistry 2012, in revision.
- (9) Brookes, P.; Lawley, P. D. Biochemical Journal 1960, 77, 478-484.
- (10) Fidder, A.; Moes, G. W. H.; Scheffer, A. G.; Vanderschans, G. P.; Baan, R. A.; Dejong, L. P. A.; Benschop, H. P. Chemical Research in Toxicology 1994, 7, 199-204.