

Contre-mesures médicales des agents chimiques de guerre et de terrorisme

Résumé La situation internationale et plus particulièrement le conflit au Moyen-Orient démontrent la réalité et la persistance de la menace constituée par l'utilisation d'agents chimiques toxiques. Le chlore, mais aussi de façon plus préoccupante l'ypérite depuis l'été 2015, sont employés. La possession et l'emploi d'ypérite par les troupes de l'État islamique rendent crédible le recours à ce toxique pour des actions terroristes en Europe. En 2017 et 2018, des neurotoxiques organophosphorés ont été utilisés pour des assassinats. Les contre-mesures médicales sont l'un des piliers essentiels de la défense contre ces menaces. Le développement de nouvelles thérapeutiques est rendu difficile par des contraintes financières et réglementaires. Les recherches menées pour faire face aux intoxications par neurotoxiques organophosphorés et ypérite sont évoquées dans cet article.

Mots-clés Agents chimiques de guerre, contre-mesures médicales, neurotoxiques organophosphorés, bioépurateurs, réactivateurs, ypérite.

Abstract Medical countermeasures against chemical agents of war and terrorism

The international situation and more specifically the war in Iraq and in the Levant clearly demonstrate the real and continuous threat caused by the use of toxic chemicals as means of warfare. Chlorine, but also more worryingly sulfur mustard since the summer of 2015, are used. The fact that the Islamic State possesses and employs sulfur mustard makes the threat from terrorist attacks in Europe with this chemical credible. In 2017 and 2018, organophosphorus nerve agents were used for assassination. Medical countermeasures are one of the essential pillars for the defence against these threats. The development of new therapeutics faces financial and regulatory challenges. Research conducted to face poisoning by nerve agents and sulfur mustard are presented in this article.

Keywords Chemical warfare agents, medical countermeasures, nerve agents, bioscavengers, reactivators, sulfur mustard.

Une situation internationale préoccupante

Depuis 2013, et les conflits au Moyen-Orient, l'usage répété de toxiques chimiques – sarin, chlore, ypérite (figure 1) – par différentes factions en présence souligne la permanence de la menace chimique (usage volontaire de toxiques chimiques dans le but de nuire) malgré l'entrée en vigueur de la Convention d'interdiction des armes chimiques (CIAC) en avril 1997 [1]. La CIAC n'est pas non plus en mesure de contrer toutes les velléités de prolifération. Des neurotoxiques organophosphorés (NOP) ont été par deux fois, en 2017 et 2018, utilisés pour

des assassinats. Le djihadisme global est une autre menace dont la France, tout comme d'autres pays, a souffert. L'élargissement à l'Europe de modes opératoires utilisant différentes substances non conventionnelles (agents chimiques, biologiques ou radionucléides) est une menace crédible.

Face à ces menaces, les contre-mesures médicales (CMM) sont un pilier essentiel de la défense. Elles comprennent des moyens pour le diagnostic, la prophylaxie ou le prétraitement et le traitement des intoxications ou pour la décontamination cutanée. Une CMM thérapeutique ne pourra pas voir le jour avant que plusieurs dizaines à centaines de millions d'euros

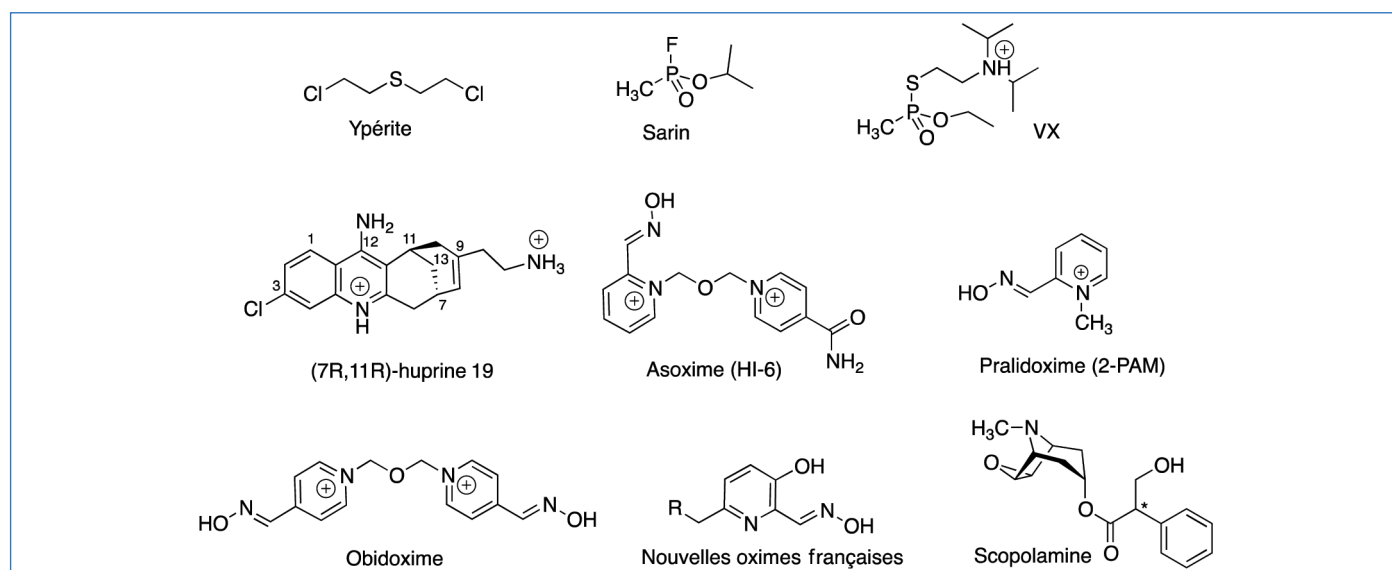


Figure 1 - Structures chimiques de diverses molécules mentionnées.

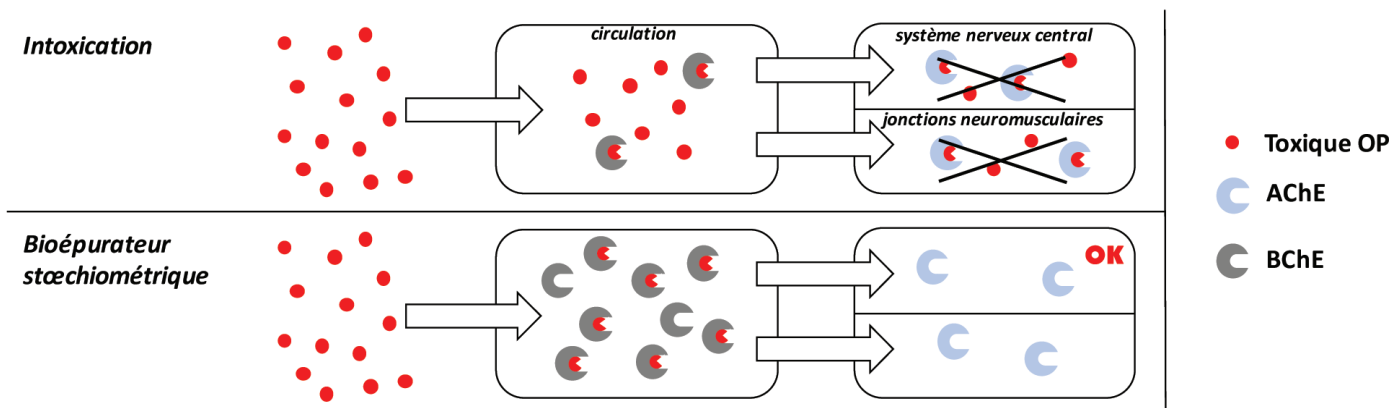


Figure 2 - Stratégie générale des bioépurateurs (AChE : acétylcholinestérase ; BChE : butyrylcholinestérase). Lors d'une intoxication, la quantité de BChE circulant dans le sang n'est pas suffisante pour neutraliser toutes les molécules de toxique organophosphoré. Ce dernier se distribue dans l'organisme et inhibe l'AChE provoquant la crise cholinergique. L'injection d'un excès de BChE dans la circulation permet de neutraliser rapidement la totalité des molécules d'organophosphorés avant que ceux-ci ne puissent atteindre l'AChE tissulaire.

ne soient investies pour une molécule totalement nouvelle. Si les grandes firmes pharmaceutiques sont prêtes à investir dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques pour contrer les effets de maladies fréquentes, aucune ne se risque à miser sur le marché des antidotes plus ou moins spécifiques des agents classiques de la menace chimique évoqués dans cet article. Le frein est double : économique tout d'abord, mais également réglementaire. Des solutions sont actuellement explorées aux niveaux national et européen – Projets de recherche et développement structurants pour la compétitivité (PSPC), Coopération structurée permanente (CSP), European Defence Industrial Development Programme (EDIDP). L'analyse des leviers possibles a aussi fait l'objet de travaux récents [2-3]. Dans ce contexte, une approche pragmatique, qui peut être rentable dans certains cas, est la recherche d'efficacité de molécules déjà sur le marché pour d'autres indications. C'est une approche résolument prise outre-Atlantique et pour laquelle nous donnerons quelques exemples.

Cet article a pour objet de rappeler les principales CMM thérapeutiques envisageables pour réduire les conséquences d'une libération intentionnelle ou accidentelle de toxiques chimiques de guerre. Nous avons choisi de considérer uniquement les neurotoxiques organophosphorés (NOP) et le vésicant ypérite (voir aussi l'article de Piérard *et coll.* dans ce numéro). Nous ne traiterons pas des agents cyanés pour lesquels des antidotes efficaces existent en France, réduisant l'intérêt porté à la recherche de nouvelles molécules, ni des agents suffocants (chlore, phosgène) pour lesquels il n'existe malheureusement plus aucune recherche active hexagonale malgré l'absence de thérapeutiques efficaces.

Face aux agents neurotoxiques organophosphorés

La toxicité des NOP résulte de leur capacité à inhiber de façon irréversible l'acétylcholinestérase (AChE) par liaison covalente avec la sérine catalytique de l'enzyme. L'hydrolyse spontanée de l'adduit est si lente que l'on considère cette réaction comme irréversible. L'AChE est présente dans l'espace intersynaptique des jonctions neuromusculaires, dans le système nerveux périphérique et le système nerveux central. Elle catalyse l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine et son rôle est indispensable pour mettre fin à la transmission du signal nerveux. Après inhibition, l'accumulation du neurotransmetteur dans la fente synaptique et l'activation continue des récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine entraînent les premiers symptômes cholinergiques

à type de myosis (contraction des pupilles), de fasciculations (secousses brèves souvent groupées de faisceaux musculaires, visibles sous la peau, spontanées ou déclenchées), d'augmentation des sécrétions et de contraction de la musculature lisse. Le décès intervient généralement dans un tableau d'hypoxie multifactorielle (paralysie des muscles respiratoires, dépression des centres respiratoires, bronchoconstriction et augmentation des sécrétions dans les voies aériennes).

Deux principales stratégies d'action étiologique sont donc envisageables pour lutter contre les conséquences d'une intoxication : empêcher le toxique de rejoindre ses cibles synaptiques grâce à des molécules le piégeant (bioépurateurs) [4] ; et réactiver le plus vite possible les enzymes inhibées dans les différents compartiments de l'organisme (sang et organes dont ceux composant le système nerveux central).

Piéger les NOP : les bioépurateurs

Lorsqu'une molécule d'enzyme bioépuratrice n'est capable d'inactiver qu'une seule molécule de NOP par simple fixation covalente irréversible, on parle de bioépurateur stœchiométrique (figure 2). Lorsque le bioépurateur peut hydrolyser plusieurs molécules de NOP, il s'agit alors de bioépurateurs catalytiques.

Deux stratégies complémentaires sont envisageables : l'administration prophylactique et l'administration thérapeutique. Cette dernière s'est montrée parfaitement active lors d'intoxications percutanées par des agents de type VX (figure 1) qui circulent plus longtemps dans le sang avant hydrolyse. C'est la stratégie que nous pensons la plus pertinente.

Dans la catégorie des bioépurateurs stœchiométriques, le candidat certainement le plus étudié est la butyrylcholinestérase (BChE), une enzyme proche de l'AChE qui réagit de manière similaire avec les NOP [5]. De nombreuses études ont montré l'efficacité de cette approche *in vivo* sur différents modèles animaux [6] et l'innocuité de l'injection de fortes doses de BChE [7]. Les doses importantes d'enzyme nécessaires (de l'ordre de 200 mg) représentent un défi conséquent, tant du point de vue de la production que de la purification. Initialement l'enzyme a été isolée à partir de stocks périmés de plasma humain ou de fraction de Cohn-IV. Le coût reste prohibitif (de l'ordre de 5 à 10 000 dollars la dose de 200 mg). Plusieurs doses pouvant être nécessaires suivant le degré d'intoxication, le coût peut largement dépasser celui des chimiothérapies anticancéreuses les plus onéreuses. De nombreux projets de développement de moyens de production de doses à coût raisonnable (< 500 €) ont vu le jour, mais aucune

solution viable n'a encore été identifiée. C'est sur ce point que doivent se concentrer les efforts et l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) est en pointe sur différents secteurs clés comme les études structurales, qui ont permis de caractériser l'interaction moléculaire entre la BChE humaine et les NOP, l'optimisation de la procédure de purification de la BChE humaine pour en diminuer le coût par le développement d'une résine d'affinité à base d'un dérivé d'huprine (*figure 1*), en collaboration avec les chimistes organiciens de l'Université de Rouen (Hupresin®, société Chemfo-rose) [8-9], l'évaluation de systèmes de production semi-industriels (lapin transgénique, production bactérienne) ou l'étude de variants auto-régénérables de BChE. La stratégie de bioépurateur à double composant – le bioépurateur et une oxime réactivatrice capable de prévenir son inhibition définitive [10] – est un moyen intéressant pour potentialiser la BChE humaine, y compris ses variants auto-régénérables.

Les bioépurateurs catalytiques présentent l'avantage de nécessiter des doses thérapeutiques théoriquement plus faibles (de l'ordre de dix fois moins), mais la mise à disposition pour le clinicien de solutions thérapeutiques à base de bioépurateurs catalytiques n'est pas concevable avant au moins dix ans. La paraoxonase I humaine a été longtemps considérée comme le candidat le plus sérieux, mais aucun variant n'est capable d'hydrolyser les NOP de type VX et sa production est un défi biotechnologique [11]. Une approche de type vaccinal basée sur un vecteur permettant une expression transitoire du bioépurateur sur une période de quelques semaines est envisageable et doit être explorée. Des enzymes bactériennes capables d'hydrolyser les NOP sont étudiées depuis plusieurs années et l'évolution dirigée a permis d'isoler des formes efficaces sur les énantiomères les plus toxiques des agents V et G [12-13]. Néanmoins, la nature bactérienne de ces enzymes risque d'être un frein pour un possible traitement par injection chez l'homme. Pour parvenir à une efficacité large spectre, il sera nécessaire d'administrer des cocktails d'enzymes et la position de l'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM) n'est pas encore connue.

Retrouver une activité enzymatique fonctionnelle : les réactivateurs

Il n'existe pas actuellement de réactivateur de cholinestérases disposant d'un spectre d'action large. La pralidoxime, actuellement utilisée largement dans le monde et en France en particulier, ne présente pas le meilleur spectre face aux NOP de la menace. L'obidoxime (*figure 1*), actuellement utilisée en Allemagne notamment, pourrait être une solution intéressante au problème de couverture de l'ensemble du spectre des NOP. Pour une utilisation en France, il conviendra d'étudier plus précisément le statut réglementaire et cette action ne sera pas portée par le seul laboratoire, rendant ainsi nécessaire la prise en compte par l'État. En acquérir à court terme permettrait d'attendre la mise à disposition d'une autre oxime, le HI-6 (*figure 1*), qui présente une supériorité indéniable sur la pralidoxime (*figure 1*), mais est moins efficace, voire inefficace sur certains agents (pesticides organophosphorés, tabun en particulier) [14-15]. Il est envisagé en dotation pour un traitement par perfusion, et dans un second temps, comme remplacement de la pralidoxime dans l'auto-injecteur Ineurope® (utilisé pour l'auto-traitement d'urgence du personnel militaire exposé), très probablement en collaboration avec les nations alliées ayant également investi sur ce réactivateur

Contre-mesures médicales face aux neurotoxiques organophosphorés

En complément de la prise en charge symptomatique :

À court terme (< 5 ans)

- Obtention d'un stock minimal de BChE humaine pour une utilisation thérapeutique
- Constitution d'un stock de précaution d'obidoxime en complément de l'oxime (pralidoxime) actuellement en dotation
- Mise en service d'une préparation pour injection intraveineuse de diméthanesulfonate de HI-6
- Constitution d'un stock de scopolamine

À moyen terme (5-15 ans)

- Développement de BChE recombinante humaine aux propriétés optimisées pour avoir des caractéristiques pharmacocinétiques proches de celles des enzymes purifiées du sang
- Mise en service d'un nouvel auto-injecteur contenant le HI-6

À long terme (> 15 ans)

- Développement et utilisation de :
 - Nouveaux réactivateurs de ChE, au spectre plus large et capables de traverser la barrière hémato-encéphalique pour une réactivation centrale
 - Bioépurateurs pseudo-catalytiques
 - Bioépurateurs catalytiques

(Allemagne, Canada, Grande-Bretagne, Pays-Bas). Cependant, ni le HI-6 ni l'obidoxime n'ont une action permettant de restaurer le fonctionnement du système nerveux central, et il est nécessaire d'identifier de nouveaux réactivateurs alliant à la fois un large spectre d'action et l'activité centrale recherchée. Dans le cadre d'un effort international, la France se situe à la pointe de la conception de nouvelles oximes aux propriétés recherchées (*figure 1*), grâce à la constitution d'un consortium comprenant des chercheurs du département de Toxicologie et Risques chimiques de l'IRBA et des équipes civiles (Universités de Rouen et de Strasbourg et CEA Grenoble). Compte tenu de l'historique du développement du HI-6, l'arrivée sur le marché d'une nouvelle molécule n'est pas envisageable avant au moins une quinzaine d'années. En parallèle, la recherche à l'étranger dans ce domaine étant assez active, il ne faudra pas exclure la possibilité de se rapprocher d'équipes qui auraient identifié un réactivateur à fort potentiel, ceci afin d'en accélérer le développement et d'en bénéficier. Dans tous les cas, l'arrivée d'un nouveau réactivateur sur le marché ne sera sans doute pas possible sans une large coopération internationale.

Autres voies de traitement des intoxications

Certaines intoxications sévères par NOP, pour lesquelles les oximes réactivatrices sont peu efficaces, vont nécessiter des protocoles de traitement particuliers avec usage d'un antimuscarinique, la scopolamine (*figure 1*), seule ou en complément d'atropine [16]. La molécule est actuellement en phase de développement avancé aux États-Unis. Les protocoles de traitement devront donc être proposés sur la base des données animales obtenues au cours des dernières décennies. Étendre les indications d'une molécule thérapeutique déjà sur le marché est aussi la stratégie pour disposer de thérapies pour lutter contre les crises épileptiques provoquées par les NOP et contre les atteintes neurologiques accompagnant un état de mal épileptique mal contrôlé. Même s'il semble exister quelques différences d'efficacité des molécules entre état de

mal épileptique provoqué par les organophosphorés et ceux d'autres origines, la solution sera trouvée dans l'arsenal existant ou en voie de développement, la kétamine par exemple [17]. Les coûts associés à des extensions d'autorisation de mise sur le marché ne sauraient toutefois pas être minimisés. Très récemment, la Biomedical Advanced Research and Development Authority (BARDA) américaine a signé un contrat initial de trois millions de dollars avec une société pour développer une autre molécule, le tézampanel, contrat qui pourra être étendu à près de 90 millions de dollars sur cinq ans.

Face à l'ypérite

L'ypérite, ou sulfure d'éthyle dichloré, est une molécule très réactive (figure 1). Elle réagit avec de très nombreuses biomolécules et possède des propriétés radiomimétiques. Face aux lésions provoquées par l'ypérite, aucun antidote n'existe et le traitement reste donc actuellement purement symptomatique malgré plusieurs décennies de recherche active. La tâche est ardue et même les États-Unis, disposant pourtant d'équipes de recherche en nombre – du département de la Défense, ou civiles *via* les incitations fortes du programme Counter-ACT soutenu par la BARDA – envisagent préférentiellement de soutenir le développement de molécules déjà existantes en étendant leurs indications thérapeutiques. C'est le cas pour la silibinine (commercialisée en France sous le nom de Legalon®) [18]. Cette spécialité devra impérativement être évaluée dans des modèles précliniques de brûlures cutanées par l'ypérite pour confirmer qu'elle réponde aux besoins, d'autant plus qu'elle présente également une certaine efficacité pour les lésions oculaires [19], face auxquelles nous sommes démunis. Le très faible intérêt porté à la physiopathologie des atteintes oculaires et aux contre-mesures destinées non seulement à traiter les effets aigus mais surtout à juguler l'évolution péjorative à moyen et long termes est une situation particulièrement préoccupante. L'œil est en effet l'un des organes les plus communément touchés lors des expositions à l'ypérite et en cas d'attentat dans un lieu public, le nombre de victimes présentant des lésions, même mineures, sera très certainement important.

En France, le CEA, en lien avec l'IRBA, vient d'initier des travaux visant notamment à identifier des biomarqueurs d'atteintes et d'évolutions péjoratives. Il faudrait que d'autres équipes investissent ce champ. Enfin, les lésions des voies aériennes provoquées par l'inhalation d'ypérite pourraient bénéficier du r-tPA (« recombinant tissue plasminogen activator »), activateur tissulaire du plasminogène en administration intratrachéale [20], utilisée actuellement comme médicament thrombolytique. Là aussi, ces études effectuées sur les rongeurs ne permettent pas encore d'évaluer ce qui serait nécessaire pour une utilisation chez l'homme. Des recherches sur des modèles précliniques plus proches de l'homme semblent donc indispensables pour affiner les conditions d'utilisation (critères d'administration, posologie et durée de traitement).

Des défis à relever

À l'heure actuelle, le constat brutal est que bien peu de molécules identifiées par la recherche française et internationale (TRL* 1-3 à 4) prendront place dans l'arsenal thérapeutique des intoxications chimiques à moyen ou long terme. La recherche physiopathologique et thérapeutique reste toutefois le seul rempart pour éviter la « surprise stratégique »

causée par l'emploi d'armes chimiques nouvelles ou oubliées. Les verrous les plus importants restent sans nul doute réglementaires et financiers malgré l'efficacité de la recherche française face à certaines intoxications. Le ministère des Armées pourrait œuvrer pour structurer la recherche en rendant ces thématiques attractives dans un contexte économique contraint. La nouvelle Agence de l'innovation de défense, tout comme l'Agence nationale de la recherche (ANR), détiennent une partie au moins des leviers économiques. L'amélioration de la prise en charge des effets à moyen ou long terme des intoxications nécessite également des investissements en recherche.

* L'échelle TRL (« technology readiness level ») évalue le niveau de maturité d'une technologie jusqu'à son intégration dans un système complet et son industrialisation. Elle va de 1 à 9 (www.cea.fr/multimedia/documents/infographies/defis-du-cea-infographie-echelle-trl.pdf).

[1] Décret n° 97-325 du 8 avril 1997 portant publication de la Convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques et sur leur destruction (ensemble trois annexes), faite à Paris le 13 janvier 1993.

[2] Johnson M.L., Belin J., Dorandeu F., Guille M., Strengthening the cost effectiveness of medical countermeasure development against rare biological threats: the Ebola outbreak, *Pharmaceut. Med.*, **2017**, *31*, p. 423.

[3] Johnson M.L., Contre-mesures médicales contre les risques NRBC: quelles solutions pour un développement facilité dans une économie de marché?, Doctorat d'université en économie, Université Paris II Panthéon Assas, **2018**.

[4] Masson P., Nachon F., Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning, *J. Neurochem.*, **2017**, *142 Suppl 2*, p. 26.

[5] Lockridge O., Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses, *Pharmacol. Ther.*, **2015**, *148*, p. 34.

[6] Saxena A. et al., Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX, *Biochem. Pharmacol.*, **2011**, *81*, p. 164.

[7] Genovese R.F. et al., Safety of administration of human butyrylcholinesterase and its conjugates with soman or VX in rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2010**, *106*, p. 428.

[8] Brazzolotto X. et al., Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huPrine-based affinity purification and crystal structure, *FEBS J.*, **2012**, *279*, p. 2905.

[9] Schopfer L.M., Lockridge O., David E., Hinrichs S.H., Purification of human butyrylcholinesterase from frozen Cohn fraction IV-4 by ion exchange and Hupresin affinity chromatography, *PLoS One*, **2019**, *14*, e0209795.

[10] Wille T., von der Wellen J., Thiermann H., Worek F., Pseudocatalytic scavenging of the nerve agent VX with human blood components and the oximes obidoxime and HI-6, *Arch. Toxicol.*, **2016**, *91*, p. 1309.

[11] Furlong C.E., Marsillach J., Jarvik G.P., Costa L.G., Paraoxonases-1, -2 and -3: what are their functions?, *Chem. Biol. Interact.*, **2016**, *259(Pt B)*, p. 61.

[12] Goldsmith M. et al., Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro, *Arch. Toxicol.*, **2016**, *90*, p. 2711.

[13] Wille T. et al., Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: intraosseous versus intravenous injection, *Toxicol. Lett.*, **2016**, *258*, p. 198.

[14] Lundy P.M., Hamilton M.G., Sawyer T.W., Mikler J., Comparative protective effects of HI-6 and MMB-4 against organophosphorus nerve agent poisoning, *Toxicology*, **2011**, *285*, p. 90.

[15] Reymond C. et al., Superior efficacy of HI-6 dimethanesulfonate over pralidoxime methylsulfate against Russian VX poisoning in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), *Toxicology*, **2018**, *410*, p. 96.

[16] Koplovitz I., Schulz S., Perspectives on the use of scopolamine as an adjunct treatment to enhance survival following organophosphorus nerve agent poisoning, *Mil. Med.*, **2010**, *175*, p. 878.

[17] Dorandeu F., Ketamine for the treatment of (super) refractory status epilepticus? Not quite yet, *Expert Rev. Neurother.*, **2017**, *17*, p. 419.

[18] Tewari-Singh N., Agarwal R., Mustard vesicating agent-induced toxicity in the skin tissue and silibinin as a potential countermeasure, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2016**, *1374*, p. 184.

[19] Tewari-Singh N. et al., Silibinin, dexamethasone, and doxycycline as potential therapeutic agents for treating vesicant-inflicted ocular injuries, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2012**, *264*, p. 23.

[20] White C.W., Rancourt R.C., Veress L.A., Sulfur mustard inhalation: mechanisms of injury, alteration of coagulation, and fibrinolytic therapy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2016**, *1378*, p. 87.

Frédéric DORANDEU*

professeur agrégé du Val-de-Grâce, chef de la division Défense NRBC, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) et École du Val-de-Grâce.

Florian NACHON,

docteur d'université, HDR, chef du département de Toxicologie et risques chimiques, IRBA.

Xavier BRAZZOLOTTO,

docteur d'université, chef de l'unité Neurotoxiques, département de Toxicologie et risques chimiques, IRBA.

José DIAS,

docteur d'université, unité Neurotoxiques, département de Toxicologie et risques chimiques, IRBA.

* frederic.dorandeu@intradef.gouv.fr