

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE DU DIMÉTHANE SULFONATE D'HI-6 LORS D'UNE INTOXICATION PAR LE VX RUSSE (VR), CHEZ LE MACAQUE CYNOMOLGUS

EFFICACY OF HI-6 DIMETHANESULFONATE IN RUSSIAN-VX (VR)-INTOXICATED CYNOMOLGUS MONKEYS

Par Franck DHOTE¹, Chloé REYMOND¹ et Frédéric DORANDEU¹
(Communication présentée le 23 avril 2015
Manuscrit accepté le 30 mai 2015)

RÉSUMÉ

Dans les armées françaises, le traitement d'urgence des intoxications par les neurotoxiques organophosphorés est l'oxime méthylsulfate de pralidoxime (Contrathion®) associée, dans un autoinjecteur bicompartimenté (AIBC, Ineurope®), au sulfate d'atropine et au chlorhydrate d'avizafone. Le méthylsulfate de pralidoxime ne permet pas la réactivation des cholinestérases inhibées par certains agents neurotoxiques tel que le VX Russe (VR). Nous avons donc évalué l'efficacité d'une autre oxime, le diméthane sulfonate d'HI-6 (HI-6-DMS), face à des doses croissantes de VR. L'utilisation de primates non humains ayant été demandée par l'Agence nationale de sécurité du médicament en raison de la forte variabilité inter-espèces de l'efficacité des oximes, nous avons choisi le cynomolgus pour lequel des données expérimentales étaient déjà disponibles. Une meilleure efficacité de l'AIBC contenant l'HI-6-DMS a été clairement mise en évidence : jusqu'à au moins 5 DL₅₀ de VR, l'HI-6-DMS combiné à l'atropine et à l'avizafone, administrés rapidement après l'apparition des signes cliniques a permis d'éviter le décès et d'améliorer la récupération des animaux intoxiqués.

Mots-clés : organophosphorés, VR, oxime, HI-6, primate.

ABSTRACT

In the French armed forces, the emergency treatment against nerve agent poisoning is the oxime pralidoxime methylsulfate (Contrathion®), included in a bicompartiment autoinjector (AIBC, Ineurope®), combined with atropine sulphate and avizafone chlorhydrate. However, the reactivating potency of pralidoxime methylsulfate is weak against specific nerve agents such as Russian VX (VR). To assess whether the oxime HI-6 dimethylsulfonate (HI-6-DMS) could replace pralidoxime methylsulfate, we tested the efficacy of the combined treatment including HI-6-DMS against increasing doses of VR. Given the strong inter-species variability in the efficacy of oximes, the French regulatory agency (Agence nationale de sécurité du médicament) requested data obtained in non-human primates. The cynomolgus monkey strain was selected since background data from previous studies were available. A better efficacy of HI-6-DMS AIBC was clearly evidenced: up to 5 LD₅₀ of VR, HI-6-DMS combined with atropine and avizafone, administered shortly after the onset of clinical signs allowed a better survival and recovery of intoxicated animals.

Key Words: organophosphate, VR, oxime, HI-6, primate.

(1) Franck DHOTE, Adjoint au chef du département de Toxicologie et risques chimiques
Institut de recherche biomédicale des armées, BP 73, 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex
Tel : +33. 178.65.14.11
franck@dhote.fr

INTRODUCTION

Parmi les composés pouvant être employés comme arme chimique, les neurotoxiques organophosphorés (OP) constituent une préoccupation majeure pour les armées qui doivent faire face au risque d'emploi d'armes non conventionnelles. Au cours des dernières décennies, ces agents ont été utilisés en situation de guerre (Iran-Irak, 1980-1988) (MacIlwain, 1993) ou d'attaques terroristes (Japon, 1994-1995) (Nagao *et al.* 1997 ; Burnat *et al.* 2001) et plus récemment en Syrie, notamment au cours du mois de mai 2013.

Ces composés chimiques sont des inhibiteurs irréversibles des cholinestérases (ChE) – acétylcholinestérases (AChE) et butyrylcholinestérases (BuChE) – par phosphorylation du site actif de l'enzyme (Taylor *et al.* 1995). L'acétylcholine (ACh) s'accumule dans la fente synaptique et produit ses effets biologiques. L'intoxication par NOP induit alors un syndrome d'hypercholinergie qui, à forte dose, évolue vers un arrêt respiratoire dans les minutes qui suivent l'exposition au toxique (Karasova *et al.* 2002 ; Eddleston *et al.* 2008 ; Dorandeu *et al.* 2010).

Les enzymes inhibées peuvent parfois être réactivées par des oximes qui, en se fixant sur l'OP, rompent le complexe qu'il forme avec l'enzyme et permettent de restaurer l'activité catalytique (Vonesch *et al.* 2011). L'oxime actuellement utilisée en France est le méthylsulfate (MS) de pralidoxime (Contrathion®). Pour le traitement d'urgence du combattant, elle est incluse dans un autoinjecteur bicompartimenté (AIBC, Ineurop®), avec le sulfate d'atropine et le chlorhydrate d'avizafone. L'autorisation de mise sur le marché (AMM) de l'AIBC a été obtenue en mars 2008 (Rousseau *et al.* 2009). Toutefois, la pralidoxime ne dispose pas d'une efficacité suffisante pour permettre la réactivation des ChE inhibées par certains OP tels que le VX russe (VR), le tabun ou le cyclosarin (GF) (Lundy *et al.* 1992; Worek *et al.* 2004). Ces limitations sont en partie supprimées avec l'oxime HI-6 (1-2-hydroxy-iminométhyl-1-pyridino-2-oxanopropane). Son efficacité thérapeutique, connue depuis des décennies, a déjà été démontrée dans un grand nombre d'études *in vitro* et *in vivo* (Lallement *et al.* 1997 ; Kuca *et al.* 2009). Ces données ont été majoritairement obtenues sur le dichlorure d'HI-6, alors que l'utilisation d'un nouveau sel est actuellement envisagée par la France et de nombreux pays (Canada, Grande-Bretagne, Allemagne, Pays-Bas), le diméthanesulfonate d'HI-6 (HI-6 DMS). Il possède en particulier une meilleure solubilité, caractéristique particulièrement intéressante dans le cadre de l'emploi envisagé (lyophilisat destiné à être remis en solution avant administration).

Suite au souhait du Service de santé des armées (SSA) de remplacer le MS de pralidoxime dans l'AIBC-Ineurop®, l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) a demandé la production de données relatives à l'efficacité de l'HI-6 sur animal intoxiqué, mettant en évidence la meilleure efficacité de l'HI-6 DMS en comparaison au MS de pralidoxime à la dose choisie pour le nouvel AIBC. De fortes variations d'efficacité des oximes dans la réactivation des ChE ont été mises en évi-

dence en fonction des espèces animales considérées (Worek *et al.* 2002). Pour cette raison, comme pour le développement de l'AIBC-Ineurop®, les expérimentations ont été réalisées chez le primate non humain (PNH) car pour cette espèce, la réponse des ChE inhibées et traitées par les oximes est proche de la réponse observée chez l'homme, contrairement au porc qui nécessite des concentrations plasmatiques d'oximes supérieures pour une efficacité similaire.

Pour parfaitement démontrer l'intérêt du remplacement du MS de pralidoxime par le l'HI-6 DMS, l'efficacité thérapeutique de ce composé a été évaluée face à une intoxication par le VX Russe (VR : diéthylamino-éthyl-O-isobutyl méthylphosphonothioate) (Cuquel *et al.* 2015), un agent contre lequel le MS de pralidoxime est peu efficace. L'évaluation de l'HI-6 DMS a été réalisée au sein d'une association thérapeutique identique à celle qui compose l'AIBC (oxime associée à 2 mg de sulfate d'atropine et 20 mg de chlorhydrate d'avizafone). La voie d'administration du traitement choisie est la voie intramusculaire (i.m.) puisque c'est la voie prévue chez l'homme en cas d'utilisation de l'autoinjecteur. Après avoir évalué la DL₅₀ du VR chez le primate, notre étude a visé à évaluer l'efficacité de l'HI-6 face à des doses croissantes de VR, en prenant en considération l'intensité des signes cliniques, l'activité des ChE sanguines, la vitesse de récupération clinique, mais surtout le taux de survie des animaux intoxiqués.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Évaluation de l'efficacité de l'HI-6 DMS et confirmation de l'efficacité de la dose unitaire de 650 mg chez l'homme

La dose de HI-6 DMS envisagée chez l'homme est de 650 mg. La dose équivalente chez le macaque, de 33 mg/kg a été déterminée par rapport à la surface corporelle de l'animal. Pour les autres molécules, les doses ont déjà été utilisées lors de précédentes études sur l'autoinjecteur actuel : 0,25 mg/kg pour le sulfate d'atropine, et 0,175 mg/kg pour l'avizafone. La comparaison a été effectuée avec une dose de 18 mg/kg de MS de pralidoxime, en équivalent molaire avec l'HI-6 DMS.

L'objectif de cette partie de l'étude visait à démontrer la meilleure efficacité de l'HI-6 DMS par rapport au MS de pralidoxime, tout en limitant au maximum le nombre d'animaux inclus dans l'étude. Il s'agissait aussi de déterminer le niveau d'intoxication maximal pouvant faire l'objet d'un traitement efficace par l'administration d'un seul autoinjecteur.

Animaux

Modèle d'étude

Aucune méthode de substitution n'existe pour la détermination de certains paramètres de la toxicité d'un composé chimique (niveau de toxicité, conséquences lésionnelles tissulaires, etc.). L'étude des mécanismes lésionnels induits par les OP, qui reposent sur des interactions complexes entre plu-

sièurs systèmes, impose le recours à l'expérimentation animale. Étant donné la forte variabilité inter-espèces de l'efficacité des oximes, l'utilisation de PNH a été demandée par l'ANSM en raison de leur proximité phylogénétique avec l'homme. L'espèce *Macaca* a été choisie en raison de données préexistantes dans le domaine des intoxications par neurotoxiques OP et dans celui du traitement par oximes (Lallement *et al.* 1997). De plus, le macaque *cynomolgus* est une espèce fréquemment utilisée lors des études de pharmacologie et toxicologie, et de nombreuses données biologiques sont déjà disponibles. Un total de 18 macaques *cynomolgus* mâles (*Macaca fascicularis*) âgés de trois à cinq ans, pesant environ 5,0 kg ($\pm 0,5$ kg)

(élevage Noveprim-Carmaney, île Maurice) ont été utilisés pour cette étude.

Un dossier sanitaire accompagnait chaque animal réceptionné au service de biologie appliqué de l'IRBA-CRSSA. Il comprenait : le résultat du dernier test de tuberculination, les examens de santé, traitements antiparasitaires, résultats des tests sérologiques réglementaires et l'attestation de fin de quarantaine.

Une période de conditionnement de quatre semaines a été respectée avant l'expérimentation. Pendant toute la durée de l'étude, les animaux ont été hébergés en cage individuelle avec un cycle de lumière de 12 heures, température et hygrométrie étant contrôlées à respectivement 22 °C (± 2 °C) et 55 % (± 10 %). Les animaux disposaient d'eau à volonté, distribuée en biberons renouvelés matin et soir. Concernant l'alimentation, des croquettes étaient distribuées le matin, et des fruits l'après-midi.

L'ensemble des expérimentations a fait l'objet d'un avis favorable après examen par le comité d'éthique de l'établissement qui s'assure que :

- l'utilisation de l'animal de laboratoire est indispensable et parfaitement justifiée ;
- les possibilités et objectifs de réduction, remplacement et raffinement (3R) ont été correctement évalués et appliqués ;
- toutes les mesures nécessaires au bien-être des animaux d'expérimentation sont mises en œuvre.

Le comité d'éthique a été régulièrement informé de l'avancée des expérimentations et des modifications du protocole qui pouvaient avoir un impact sur le bien-être des animaux ou des réponses cliniques ou événements expérimentaux inattendus qui pouvaient révéler ou causer un stress important aux animaux inclus dans le protocole.

L'ensemble des modifications ou affinements du protocole ont été réalisés après avoir requis l'avis d'un vétérinaire qui n'était pas partie prenante du protocole expérimental.

Groupes expérimentaux

Quatre animaux ont été utilisés afin d'évaluer la DL₅₀ du VR, qui n'était pas précisément connue dans cette espèce. La comparaison de l'efficacité des deux oximes a été réalisée à la dose à 5 DL₅₀, avec deux bras expérimentaux : HI-6 DMS (n=4) et MS de pralidoxime (n=3). Pour estimer la dose maximale de VR contre lequel un équivalent autoinjecteur était efficace, nous l'avons également testée chez des animaux intoxiqués après exposition à 8 (n=1) et 15 (n=4) DL₅₀.

Le traitement a systématiquement été administré après l'apparition des premiers signes cliniques de l'intoxication.

Protocole expérimental

L'ensemble du protocole expérimental est résumé sur la figure 1.

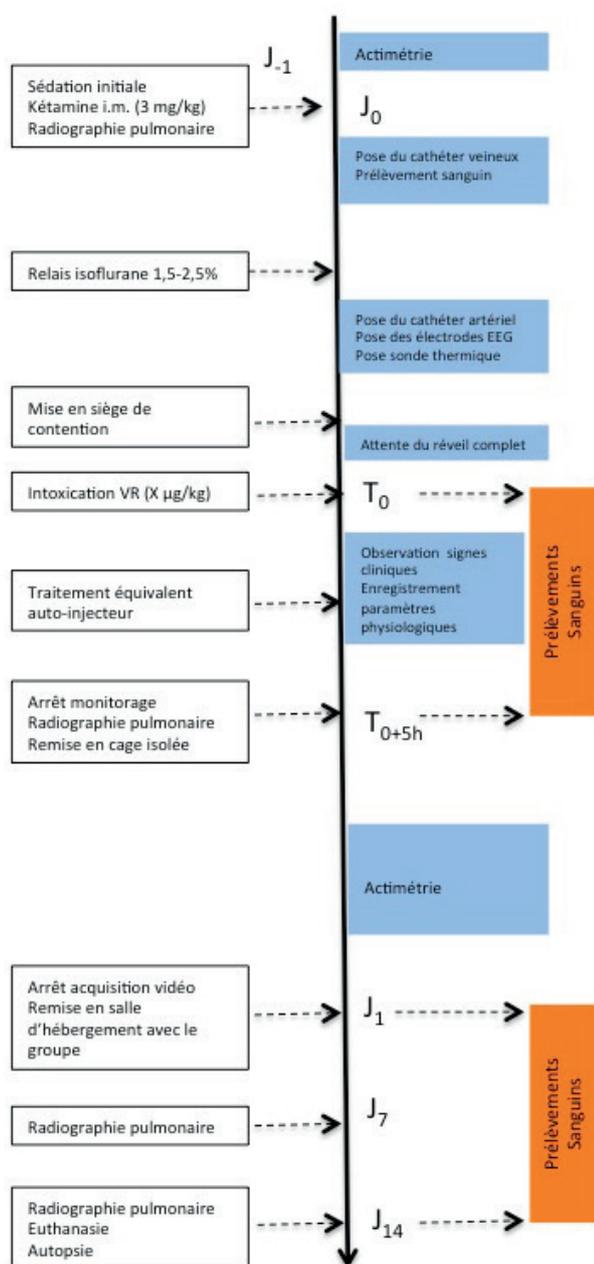


Figure 1 : Chronogramme de l'expérimentation.

Préparation

Le matin de l'intoxication (J₀), vers 8 heures, les animaux ont fait l'objet d'une pesée et d'un prélèvement sanguin après une légère sédation (Kétamine : Imalgène 1000[®], 3 mg/kg, i.m.).

Sous anesthésie gazeuse au masque (Isoflurane 2,5 % – ajustement selon profondeur d'anesthésie – 2 L/min d'O₂ pur), plusieurs équipements ont été mis en place après la réalisation d'une radiographie thoracique (face et profil) :

- cathéter artériel fémoral (cathéter intraveineux 24G, puis cathéter Seldicath 0,9 mm x 6 cm, 20G) afin de permettre ultérieurement la mesure de la pression artérielle et la réalisation de prélèvements sanguins (dosages biochimiques, activités ChE, gaz du sang et bilan hématologique) ;
- voie veineuse radiale permettant l'hydratation de l'animal pendant l'expérimentation (NaCl 0,9 %, 20 mL/h) ;
- sonde de température rectale ;
- électrodes de mesure de l'électrocardiogramme (ECG).

À l'issue de la mise en place de l'ensemble du matériel de monitoring, l'anesthésie gazeuse a été stoppée avant installation de l'animal dans un siège de contention.

Le réveil complet de l'animal a été attendu (évaluation de la réactivité aux stimuli visuels et auditifs, contrôle de la remontée de la température corporelle) avant de procéder à l'administration du toxique. Les paramètres physiologiques de référence ont été enregistrés et un prélèvement sanguin a été réalisé avant l'intoxication.

Administration du toxique et du traitement

L'administration du toxique a été réalisée par la voie intramusculaire dans un volume de 0,8 mL dans le muscle tibial gauche (aiguille 23 G 1" 0,6 x 25 mm) après désinfection avec une compresse imbibée d'alcool à 70°, sans massage ultérieur du site d'injection.

Les différents traitements ont été administrés dans le muscle tibial droit, selon les mêmes modalités que pour l'administration du toxique.

Suivi post-intoxication

Après intoxication, l'animal a été maintenu pendant 5 à 6 heures sur le siège de contention afin de suivre l'évolution des paramètres physiologiques. Des prélèvements sanguins ont été réalisés périodiquement jusqu'à la fin de l'expérimentation. Une anesthésie courte au propofol (Diprivan[®], 1 mL i.v., puis réadministration par 0,5 mL à la demande) a permis de sortir l'animal du siège de contention, de retirer l'ensemble des équipements de monitoring et de réaliser une radiographie thoracique (face et profil) avant de le replacer dans une cage individuelle en salle d'actimétrie jusqu'au lendemain matin. L'animal a ensuite été hébergé à nouveau dans la salle de stabulation avec ses congénères et observé régulièrement pendant 15 jours (prise de nourriture et eau, test de morsure et d'agrippement). Des prises de sang régulières, sur animal sédaté

(Imalgène 1000[®], 3 mg/kg), ont été effectuées pendant cette période (à J₁, J₃₋₄, J₇, J₁₀₋₁₁ et J₁₄), ainsi qu'une radiographie thoracique à J₇ et J₁₄, jour de l'autopsie.

Après cette période de suivi, les animaux ont été euthanasiés (Imalgène 1000[®], 3 mg/kg, i.m., puis pentobarbital, 30 mg/kg, i.v., puis chlorure de potassium KCl, 2 mmol/kg i.v. et exsanguination) pour pratiquer une autopsie (prélèvement d'organes pour examen anatomopathologique, mesure de l'activité ChE tissulaire, recherche de signes de lésions tissulaires macroscopiques ou de signes d'inflammation).

Produits chimiques

Le VR, 95 % de pureté, synthétisé par le centre Délégation générale pour l'armement – Maîtrise NRBC (DGA-MNRBC, Vert-le-Petit, France), a été utilisé sans autre purification. Il a été dilué dans une solution saline isotonique avant administration par voie i.m. dans un volume constant de 0,8 mL.

Le sulfate d'atropine et le chlorhydrate d'avizafone provenaient de chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) et Neosystem (Strasbourg, France) respectivement. Ces deux substances, ainsi que l'oxime HI-6 DMS et le MS de pralidoxime, ont été administrés par voie i.m. dans un volume de 0,5 mL après dissolution dans de l'eau pour préparation injectable (p.p.i.).

Suivi des paramètres physiologiques et biologiques

Évolution de l'activité locomotrice (Actimétrie)

Vingt quatre heures avant l'expérimentation, l'animal a été placé dans une salle disposant d'un équipement permettant de mesurer son niveau d'activité locomotrice (actimétrie). Un ensemble vidéo infrarouge relié à un ordinateur équipé du logiciel Vigiprimate[®] a permis de mesurer et d'analyser les mouvements/déplacements de l'animal dans sa cage d'hébergement.

Pour chaque animal, les données actimétriques de référence ont été obtenues par un enregistrement de l'activité de l'animal la veille de l'intoxication. L'animal étant isolé dans cette pièce, un enrichissement de l'environnement a été mis en place grâce à une radio FM en fonctionnement la journée, et à la fourniture d'une bouteille plastique contenant du miel et des raisins secs.

Chaque type de mouvement a été quantifié en fonction de son amplitude (grand ou moyen, en fonction du nombre de pixels impliqués) et de sa durée. Les enregistrements ont été réalisés puis comparés pendant des périodes de deux heures : le matin, l'après-midi, ainsi que la nuit, avant et après intoxication. Pour l'analyse, chaque type de mouvement a été quantifié par période de 15 minutes.

Monitoring des paramètres cliniques et physiologiques

Les signes cliniques de l'intoxication (tremblements, convulsions, difficultés respiratoires, mydriase/myosis, coma...) ont été observés et enregistrés avant l'intoxication, pendant les cinq heures qui ont suivi l'intoxication, puis les jours suivants. Le

jour de l'intoxication, les paramètres physiologiques ont été suivis grâce à un système d'acquisition et d'enregistrement : température, pression artérielle, fréquence cardiaque et respiratoire, et ECG. Les données chiffrées ont aussi fait l'objet d'un relevé manuel régulier.

Paramètres sanguins

Les paramètres hématologiques et biochimiques courants ont été mesurés au laboratoire d'analyse biologique de notre institut, suite à des prélèvements sanguins réalisés lors de la quarantaine, puis de manière répétée jusqu'à la fin de l'expérimentation (J₁₄) (figure 1). Le dosage sanguin de l'HI-6 DMS a été réalisé au laboratoire de bioanalyse de l'Institut de médecine tropicale du Service de santé (IMTSSA), afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ce composé (résultats non présentés).

Dosages des cholinestérases sanguines

Les échantillons sanguins ont été collectés sur tubes héparinate de lithium. Pour l'activité ChE totale, 10 µL de sang total ont été dilués au 1/100 dans de l'eau ppi. L'échantillon a ensuite été centrifugé afin de récupérer le plasma qui permettra de doser l'activité BChE (dilution au 1/3 dans de l'eau ppi). Le culot globulaire a enfin été lavé et ramené au volume initial avec une solution saline 0,9 %. L'hématocrite a été mesuré et 10 µL du culot globulaire ont été prélevés et dilués au 1/100 dans de l'eau ppi afin de doser l'activité AChE. L'activité cholinestérasique a été analysée par le laboratoire d'analyse biologique de l'IRBA-CRSSA selon la méthode décrite par Worek *et al.* (1999) avec des volumes adaptés afin d'automatiser la technique sur l'analyseur hématologique (Hitachi 912, Roche diagnostic®).

Évaluation du développement de l'œdème pulmonaire

Des radiographies thoraciques ont été effectuées avant et après intoxication le jour J (J₀), ainsi qu'à J₇ et J₁₄ à l'aide de plaques radiographiques numériques. Les images numérisées ont ensuite été traitées par un système d'analyse (image J®) afin de détecter le développement d'œdème pulmonaire par quantification des niveaux de gris dans les zones thoraciques d'intérêt.

Histopathologie

À J₁₄ (± 1 jour), l'autopsie a été réalisée, et différents organes ont été prélevés en vue d'études anatomopathologiques : poumons, cœur, diaphragme, foie, muscle du côté de l'injection du toxique, muscle du côté de l'injection du traitement, biceps, et cerveau (cervelet, pont-bulbe, mésencéphale, hémicerveau). Ils ont été immédiatement plongés dans du formol tamponné 4 % M/V (Labonord®). Un changement de formol a eu lieu 24 heures après le prélèvement. Les échantillons ont ensuite été inclus en blocs de paraffine. Les blocs ont alors été adressés à la société Covance (Porcheville, France) où ils ont été traités pour réalisation de coupes avant coloration à l'hémalum-éosine (HE) afin de permettre une analyse anatomopathologique.

RÉSULTATS – DISCUSSION

Seuls les résultats principaux de cette expérimentation sont présentés dans cette communication.

Détermination du niveau de toxicité du VR chez le macaque *cynomolgus*

La DL₅₀ du VR chez le primate n'étant pas connue précisément, la dose de toxique utilisée a été évaluée après une première approche bibliographique relative à la DL₅₀ de différents NOP chez plusieurs espèces de mammifères, en fonction de la voie d'exposition. Cette approche a conduit à choisir une dose initiale de 9 µg/kg. La méthode *up and down* avec pas géométrique de 1,15 a permis de limiter à quatre le nombre d'animaux nécessaires pour évaluer la DL₅₀ du VR à 8 µg/kg (un animal survivant et trois décès constatés).

Étude des taux de survie après intoxication par des doses croissantes de VR et traitement par un autoinjecteur

Les taux de survie des animaux inclus dans les différents groupes expérimentaux sont présentés dans le **tableau 1**.

Dose VR	Traitement	Taux de survie
2 DL50	1 AI HI-6	2/2 (100%)
5 DL50	1 AI HI-6	4/4 (100%)
	1 AI Pralidoxime	1/3 (33%)
8 DL50	1 AI HI-6	1/1 (100%)
15 DL50	1 AI HI-6	2/4 (50%)

Tableau 1 : Taux de survie après traitement des animaux intoxiqués par des doses croissantes de VX. Le nombre d'animaux survivants est rapporté au nombre initial d'animaux inclus dans chaque groupe expérimental, après une exposition à 2, 5, 8 ou 15 DL₅₀ de VR, et traitement par un équivalent autoinjecteur composé de 33 mg/kg de HI-6 DMS (AI HI-6) ou de 18 mg/kg MS de pralidoxime (AI Pralidoxime), associés à 0,25 mg/kg de sulfate d'atropine et à 0,175 mg/kg d'avizafone.

Évaluation de l'efficacité de l'HI-6 DMS face à une intoxication par 2 DL₅₀ de VR

Les deux animaux intoxiqués par une dose de 2 DL₅₀ de VR (16 µg/kg) ont été traités avec un équivalent autoinjecteur HI-6 DMS dès l'apparition des premiers signes d'intoxication, soit à To+2 min pour l'un et à To+8 min pour l'autre. Les deux primates ont survécu, après avoir développé des crises convulsives de faible intensité, démontrant l'efficacité d'un seul autoinjecteur contenant l'HI-6 DMS pour ce niveau d'exposition. Toutefois, le délai variable d'apparition des signes cliniques paraissait pouvoir entraîner des difficultés de comparaison entre les individus. La dose d'intoxication a ainsi été augmentée.

Évaluation de l'efficacité de l'HI-6 DMS par rapport à la pralidoxime face à une intoxication par une dose de 5 DL₅₀ de VR

Afin de standardiser le protocole de traitement, les animaux ont tous reçu leurs traitements respectifs cinq minutes après l'intoxication, après l'apparition des premiers signes cliniques d'intoxication.

Les quatre primates traités avec un équivalent autoinjecteur HI-6 ont survécu à l'intoxication alors qu'un seul, sur les trois traités avec un équivalent autoinjecteur Pralidoxime, a survécu. En considérant ce simple paramètre du taux de mortalité, ces résultats démontrent clairement l'intérêt de l'utilisation de l'oxime HI-6 DMS dont l'efficacité s'est révélée largement supérieure à celle du MS de pralidoxime.

Évaluation de l'efficacité de l'HI-6 DMS face à une intoxication par des doses de 8 à 15 DL₅₀ de VR

L'animal intoxiqué par 8 DL₅₀ de VR et traité avec un autoinjecteur à To+8 min, après l'apparition des signes cliniques d'intoxication, a survécu.

Parmi les quatre primates intoxiqués avec une dose de 120 µg/kg de VR (soit environ 15 DL₅₀) puis traités avec un équivalent autoinjecteur HI-6 DMS à To+5 min, seulement deux animaux ont survécu. Deux autres sont morts en cours d'expérimentation, à To+ 35 min et To+ 1h post-intoxication, indiquant la limite d'efficacité du traitement unitaire appliqué. La DL₅₀ du VR étant particulièrement basse, il est tout à fait envisageable que des personnes puissent être exposées à de

fortes doses de VR, supérieures à 10-15 fois la DL₅₀. Il apparaît donc nécessaire d'envisager par la suite la mise en place de protocoles de traitement faisant appel à l'administration répétée ou simultanée de plusieurs autoinjecteurs rapidement après l'apparition des signes cliniques de l'intoxication.

Étude de l'évolution des signes cliniques après intoxication et traitement

La comparaison de l'efficacité des deux traitements évalués n'est possible que dans le groupe des animaux exposés à 5 DL₅₀ de VR. Cette comparaison reste toutefois difficile puisque dans le groupe des animaux ayant reçu un équivalent autoinjecteur contenant le MS de pralidoxime, un seul animal a survécu. Dans tous les cas, lors d'une exposition à une dose de 5 DL₅₀ de VR, les signes cliniques ont pu être observés dès To+2 min. L'administration d'un équivalent autoinjecteur contenant l'HI-6 DMS n'a pas permis de stopper immédiatement les crises convulsives, mais on observe une diminution de l'intensité des signes d'intoxication à partir de 15 à 20 min après l'exposition (**figure 2**). Chez la totalité de ces animaux, les signes cliniques caractéristiques de l'intoxication par les neurotoxiques OP (convulsions, tremblements, difficultés respiratoires) n'étaient plus apparents 90 min après l'intoxication. L'administration d'un équivalent autoinjecteur contenant la pralidoxime s'est montrée beaucoup moins efficace puisque chez le seul animal survivant, les signes cliniques ont régressé seulement 180 min après le traitement, avec une persistance de tremblements et de difficultés respiratoires durant plus de cinq heures (résultat non présenté).

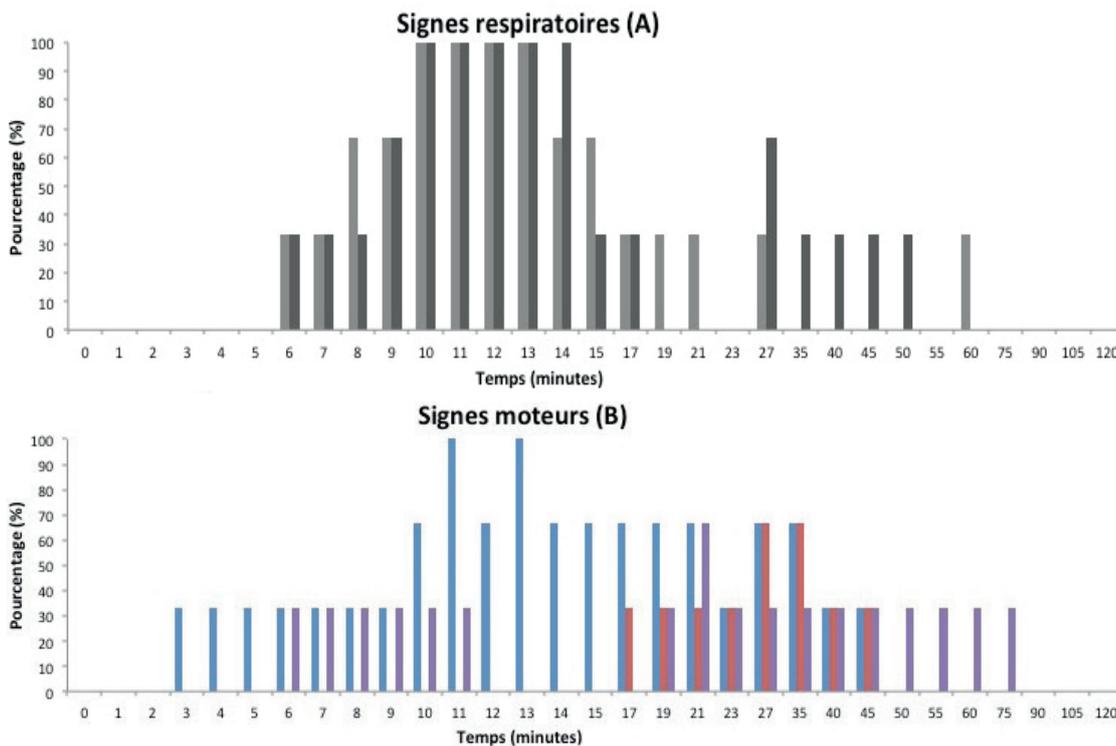


Figure 2 : Évolution des signes respiratoires (A) et moteurs (B) après intoxication chez les animaux intoxiqués par 5 DL₅₀ de VR et traités par un autoinjecteur contenant l'HI-6 DMS (n=4). Pourcentage des animaux exprimant (A) des signes respiratoires (respiration forte (gris clair) et renversement de la tête (gris foncé)) et (B) des signes moteurs (fasciculations-tremblements (bleu), clonies-convulsions (rouge) et hype-rextension de la tête (violet)).

Étude de l'évolution de l'activité des cholinestérases sanguines après intoxication et traitement

En raison de la forte dispersion des valeurs d'activité enzymatique, liée à la faible taille des effectifs des groupes expérimentaux et à de fortes variations interindividuelles, les résultats issus de moyennes de chaque groupe ne sont pas exploitables. Afin d'illustrer l'évolution du taux d'inhibition des ChE sanguines, la **figure 3** présente les données obtenues après intoxication par 5 DL₅₀ de VR, et traitement avec l'équivalent d'un autoinjecteur contenant la pralidoxime (A) chez le seul animal ayant survécu vs un équivalent autoinjecteur contenant l'oxime HI-6 DMS (B) chez un animal choisi pour illustrer les résultats obtenus. On note une nette différence entre les deux profils d'activité des ChE sanguines. En effet, environ 5 min

après l'administration des 5 DL₅₀ de VR, le taux d'inhibition atteint 80 à 95 % chez tous les animaux intoxiqués. Après traitement par l'autoinjecteur contenant l'HI-6 DMS à T₀+5min, les ChE sont très rapidement réactivées et particulièrement les AChEs qui passent de 92 % d'inhibition à une réactivation totale à T₀+10min (99 % à 69 % pour les BuChEs, 95 % à 33 % pour les ChEs). On note toutefois une réinhibition progressive des différentes enzymes étudiées, sans que le taux d'inhibition ne dépasse 70 % en fin d'expérimentation. Après traitement avec l'autoinjecteur contenant la pralidoxime, on peut observer une légère baisse de l'inhibition à T₀+10 min. Cette diminution de l'inhibition est très fugace puisqu'elle augmente à nouveau dès T₀+15min et atteint un maximum d'environ 90 % d'inhibition à T₀+30 min. L'inhibition reste ensuite élevée (entre 80 et 90 %) jusqu'à la fin de l'expérimentation.

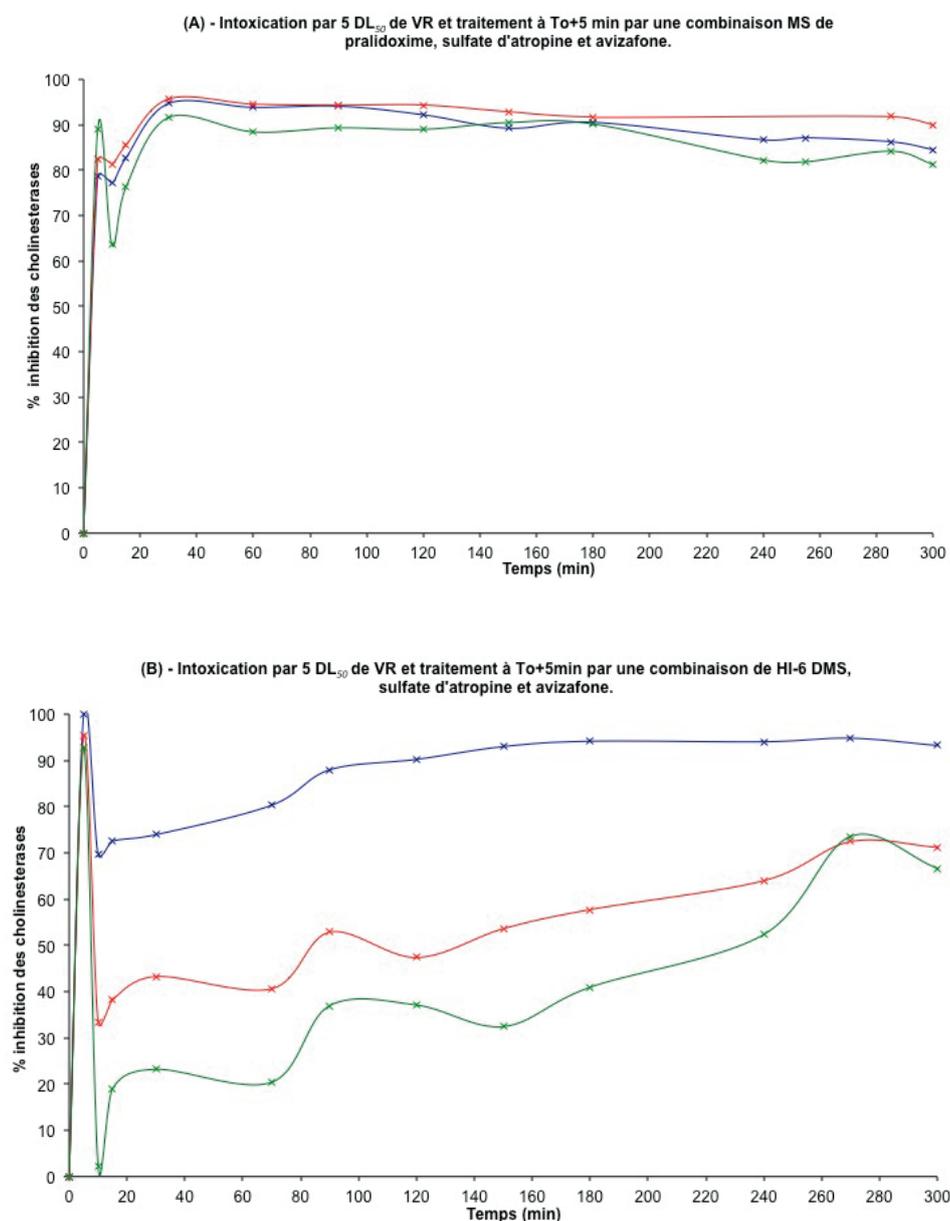


Figure 3 : Évolution du pourcentage d'inhibition des cholinestérases totales (rouge), acétylcholinestérases (vert) et butyrylcholinestérases (bleu) après intoxication par 5 DL₅₀ de VR et traitement avec un équivalent autoinjecteur contenant la pralidoxime (A) ou l'HI-6 DMS (B). Le traitement à T₀+5min par l'autoinjecteur contenant l'HI-6 DMS, permet une réactivation importante et très rapide des cholinestérases sanguines, alors que le traitement par l'autoinjecteur contenant le MS de pralidoxime ne conduit qu'à une diminution minimale et fugace de l'inhibition.

Étude de l'évolution de l'activité locomotrice après intoxication et traitement

La **figure 4** présente les résultats de l'évolution de l'intensité de l'activité locomotrice durant la journée et la nuit précédant l'intoxication, puis durant la journée et la nuit suivant l'intoxication. On constate là encore des profils différents chez les animaux ayant reçu le MS de pralidoxime (A) ou l'HI-6 DMS (B) puisque la reprise d'activité locomotrice dans l'après-midi suivant l'intoxication est plus importante dans le groupe des animaux traités par l'HI-6. De même, on détecte une importante agitation cyclique nocturne chez l'animal traité par le MS de pralidoxime, que l'on ne retrouve pas dans le groupe des animaux traités par l'HI-6 DMS.

Histopathologie

Deux semaines après l'exposition au VR et l'application des traitements évalués, un phénomène de légère nécrose musculaire, fibrose et inflammation a pu être mis en évidence à proximité du point d'injection du traitement chez les animaux ayant reçu l'HI-6 DMS. Une inflammation du péricarde, une hémorragie endocardique et une nécrose des muscles papillaires a été détectée chez l'animal intoxiqué par 5DL₅₀ de VR et traité par le MS de pralidoxime. Ces anomalies myocardiques n'ont pas été retrouvées chez les animaux ayant reçu le traitement par l'HI-6 DMS. Concernant les lésions cérébrales, chez les animaux intoxiqués par 5 DL₅₀ de VR, seule une infiltration par des cellules mononucléées a été mise en évidence chez l'animal traité par le MS de pralidoxime. Aucune anomalie

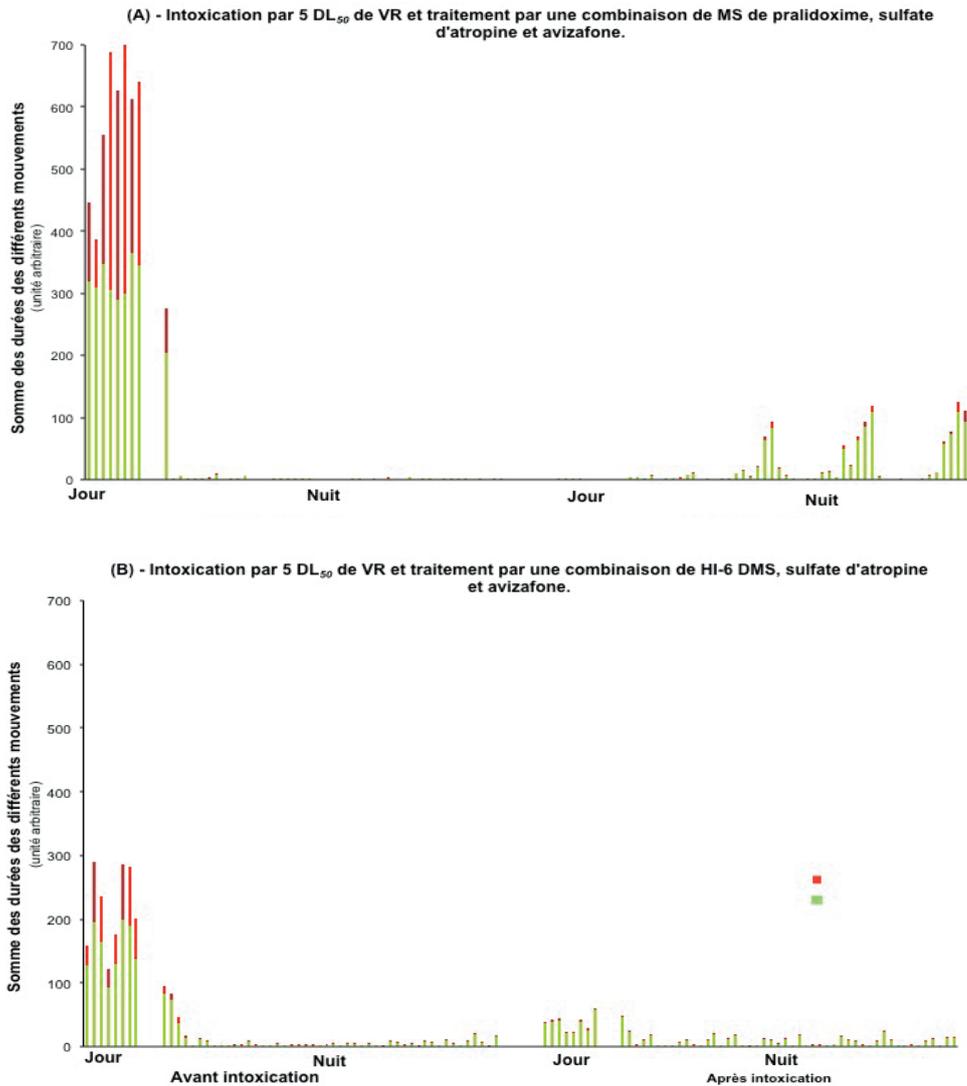


Figure 4 : Activité motrice des animaux avant et après intoxication et traitement avec un équivalent autoinjecteur contenant le MS de pralidoxime (n=1) (A) ou l'HI-6 DMS (n=4) (B). L'activité motrice évaluée par une quantification des mouvements détectés par analyse des images vidéo infrarouge est présentée par périodes cumulées de 15 minutes. Les mouvements sont représentés selon leur faible (vert) ou grande (rouge) amplitude. Le traitement par l'HI-6 DMS permet une meilleure reprise d'activité dans la demi-journée qui suit l'intoxication et limite l'agitation nocturne au cours de la nuit suivante.

n'a été relevée chez les animaux traités par l'HI-6 DMS, à l'exception d'une légère activation gliale chez deux animaux intoxiqués par 8 et 15 DL₅₀ de VR.

Œdème pulmonaire

L'observation des radiographies thoraciques a permis de visualiser l'apparition systématique d'un œdème pulmonaire chez tous les animaux intoxiqués, quels que soient la dose de toxique administrée et le traitement appliqué. Les signes d'opacification pulmonaire interstitielle et alvéolaire tendaient à régresser sept jours après l'intoxication, et sont apparus normalisés le 14^e jour (données non présentées).

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette première phase d'expérimentations ont permis de montrer le manque d'efficacité du MS de pralidoxime face à une intoxication par le VR, et la nette supériorité de l'HI-6-DMS dans la même combinaison avec le sulfate d'atropine et le chlorhydrate d'avizafone. Cette combinaison thérapeutique a en effet permis d'éviter le décès des

animaux intoxiqués par des doses de VX allant jusqu'à au moins 5 DL₅₀, malgré la ré-inhibition progressive des ChE. Ces éléments montrent la possibilité d'apporter une solution efficace au problème du traitement des intoxications par le VR en remplaçant le MS de pralidoxime par l'HI-6 DMS, en développant un autoinjecteur de nouvelle génération (AIBC NG®). Les schémas thérapeutiques mis en œuvre durant ces expérimentations sont réalistes et adaptés sur le plan opérationnel puisque l'administration du traitement évalué a été systématiquement réalisée après l'apparition des premiers signes d'intoxication. Le protocole mis en œuvre simule ainsi l'utilisation du traitement d'urgence en conditions opérationnelles par un combattant intoxiqué qui s'injecterait le contenu de l'AIBC rapidement après l'apparition des premiers signes d'intoxication. Des études complémentaires, non décrites dans ce document, ont été initiées afin de rechercher l'intérêt potentiel de l'administration simultanée ou successive de deux ou trois autoinjecteurs face à de plus fortes doses de VR. Des expérimentations visant à évaluer l'intérêt d'un traitement relais (post-traitement d'urgence par autoinjecteur) par administration d'HI-6 DMS par voie veineuse ont été entamées

BIBLIOGRAPHIE

- Burnat P, Renaudeau C, Ceppa F, Gidenne S, Vaillant C, Almeras D, *et al.* L'attentat au sarin dans le métro de Tokyo. *Med Armees.* 2001; 29: 33-40.
- Cuquel AC, Dorandeu F, Ceppa F, Renard C, Burnat P. The VR, the Russian version of the nerve agent VX. *Ann. Pharm. Fr.* 2015; Jan 12. pii: S0003-4509(14)00135-7.
- Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1980; 20 : 441-62.
- Dorandeu F, Baud F, Danel V, Gazin V, Belmahdi F. 2010. Groupe de travail PIRATOX-PIRATOM de l'Afssaps. Fiche Piratox n°4 : « Organophosphorés : neurotoxiques de guerre et pesticides » [en ligne]. Disponible sur : <[http://www.afssaps.fr/Dossiers-thematiques/Biotox-Piratox-Piratome/Fiches-Piratox-Piratome-de-prise-en-charge-therapeutique/\(offset\)/4](http://www.afssaps.fr/Dossiers-thematiques/Biotox-Piratox-Piratome/Fiches-Piratox-Piratome-de-prise-en-charge-therapeutique/(offset)/4)>
- Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008; 371:597-607.
- Karasova Leikin JB, Thomas RG, Walter FG, Klein R, Meislin HW. A review of nerve agent exposure for the critical care physician. *Crit Care Med.* 2002; 30:23 ; 46-54.
- Kuca K, Musilek K, Jun D, Pohanka M, Zdarova Karasova J, Novotny L *et al.* Could oxime HI-6 really be considered as "broad-spectrum" antidote ? *J Appl Biomed.* 2009 ; 7:143-9.
- Lallement G, Clarencon D, Brochier G, Baubichon D, Galonnier M, Blanchet G, Mestries JC. Efficacy of atropine/pralidoxime/diazepam or atropine/Hi-6/prodiazepam in primates intoxicated by soman. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 56(2):325-32.
- Lundy, P.M., Hansen, A.S., Hand, B.T., Boulet, C.A. Comparison of several oximes against poisoning by soman, tabun and GF. *Toxicology* 1992 ; 72, 99-105.
- MacIlwain, C. Study proves Iraq used nerve gas. *Nature* 1993; 363: 3.
- Nagao, M., Takatori, T., Matsuda, Y., Nakajima, M., Iwase, H., Iwadate, K. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 144: 198-203.
- Rousseau JM, Besse Bardot I, Franck L, Libert N, Lallement G, Clair P. Interest of Ineuropo syringe for nerve agent intoxication. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2009; 28 (5): 482-8.
- Taylor P, Radic Z, Hosca NA, Camp S, Marchot P, Berman HA. Structural basis for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol Lett.* 1995 ; 82-83, 453-8.
- Vonesch M-A, Nachon F, Burnat P. Actions et efficacité des différents oximes dans le traitement de l'intoxication par les neurotoxiques organophosphorés. *Med Armees* 2011; 39(5): 445-452.
- Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 1999 Oct; 288(1-2):73-90.
- Worek F, Reiter G, Eyer P, Szinicz L. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol.* 2002 ; 76, 523-29.
- Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem Pharmacol.* 2004 ; 68, 2237-48.