



HAL
open science

Les biomarqueurs de l'intoxication par l'ypérite

Christophe Piérard, Nicolas Taudon, François Fenaille, Thierry Douki

► **To cite this version:**

Christophe Piérard, Nicolas Taudon, François Fenaille, Thierry Douki. Les biomarqueurs de l'intoxication par l'ypérite. *L'Actualité Chimique*, 2019, 440, pp.19-22. <hal-02565929>

HAL Id: hal-02565929

<https://hal.science/hal-02565929v1>

Submitted on 6 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

LES BIOMARQUEURS DE L'INTOXICATION PAR L'YPERITE

Christophe Piérard¹, Nicolas Taudon², François Fenaille³, Thierry Douki⁴

1 Unité Vésicants, D.TRC, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France.

2 Unité Développements Analytiques et Bioanalyse, D.PRT, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France.

3 Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA, INRA, Université Paris Saclay, MetaboHUB, F-91191 Gif-sur-Yvette, Franc

4 Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC-SyMMES-CIBEST, Grenoble, France

Résumé :

L'ypérite est un toxique de guerre endommageant les yeux, les poumons et la peau. Dans cette dernière, elle induit de graves brûlures qui la classent parmi les agents vésicants. Très réactive, l'ypérite possède des capacités d'alkylation de nombreuses biomolécules. Les produits qui en dérivent peuvent être utilisés, principalement en utilisant des méthodes de chimie analytiques, comme biomarqueurs d'exposition ou d'effet. L'ypérite perturbe également fortement le métabolisme et l'induction de protéines. Ces réponses sont utilisables pour mettre en évidence des effets à plus long terme.

Mots-clés : menace chimique, glutathion, protéines, ADN, métabolomique

Abstract:

Sulfur mustard is a chemical warfare agent that damages the eyes, lungs and skin. In the latter, it induces severe burns that classify it as vesicant agents. Highly reactive, sulfur mustard has the ability to alkylate many biomolecules. The products derived from these reactions can be used, mainly using analytical chemistry methods, as biomarkers of exposure or effect. Sulfur mustard also greatly disrupts metabolism and protein induction. These responses can be used to highlight longer-term effects.

Keywords: chemical threat, glutathione, proteins, DNA, metabolomics

Malgré l'entrée en vigueur de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), ratifiée à l'heure actuelle par 192 pays [1], la menace chimique reste toujours d'actualité comme en témoignent les événements récents au Moyen-Orient. Parmi les agents chimiques de la menace, les vésicants sont des composés persistants qui provoquent des brûlures, des vésications et des nécroses des tissus vivants. Le principal représentant en est l'ypérite dont l'exposition est associée aux conflits armés, à des actions terroristes ou à une exposition accidentelle à d'anciennes munitions chimiques. Bien que les mécanismes d'action biologique de l'ypérite ne soient pas complètement élucidés, un certain nombre de cibles cellulaires sont connues. Ceci rend possible la détermination de biomarqueurs moléculaires qui revêtent un intérêt à plusieurs titres : i) d'un point de vue médico-légal, pour apporter une preuve de la contamination, ii) d'un point de vue diagnostique, iii) d'un point de vue pronostique et iv) pour le développement de stratégies thérapeutiques spécifiques et plus efficaces que les traitements actuels (similaires à ceux des brûlures thermiques). Ces biomarqueurs peuvent être détectés à court ou moyen termes, soit de quelques heures à quelques semaines après l'exposition, ou sur une échelle de plusieurs années.

1. Caractéristiques de l'ypérite

Le bis(2-chloroéthyl) sulfure (**Figure 1**) a été synthétisé dès 1822 par le chimiste Français Despretz. Il fut utilisé sur un champ de bataille pour la première fois à Ypres en Belgique contre les troupes anglaises le 12 juillet 1917, ville dont il tire son nom. L'odeur caractéristique de moutarde ou d'ail associée à l'ypérite lui valut un autre nom : le gaz moutarde. L'ypérite est un liquide huileux incolore à brun en fonction de sa pureté, plus dense que l'eau, émettant rapidement des vapeurs plus denses que l'air. Elle est très peu soluble dans l'eau, mais soluble dans les graisses et les solvants organiques.

L'utilisation de l'ypérite par l'Etat Islamique en août 2015 a réaffirmé le potentiel de ce toxique comme agent de la menace chimique et terroriste, car elle possède la plupart des caractéristiques qui en font un agent d'intérêt pour des terroristes [2] :

- Facilité à se procurer dans d'anciens stocks d'armes (ex-URSS, Irak, Lybie, Syrie) ;
- Facilité à synthétiser à partir d'éthanol, de soufre et de chlore.
- Facilité à disséminer et persistance dans l'environnement qui rendent compliquée l'action des secours et en font une « arme de désorganisation massive ».
- Caractère très insidieux : l'ypérite est presque incolore et inodore lorsqu'elle est pure et ses premiers symptômes n'apparaissent que plusieurs heures après la contamination.
- Absence d'antidote et de traitement spécifique à ce jour.
- Comme tout agent chimique, fort impact psychologique sur les populations, lié aux lésions impressionnantes et visibles durablement.

2. Toxicité et prise en charge

L'ypérite possède une toxicité cutanée, oculaire, pulmonaire et systémique. Elle entraîne de plus des effets à long terme, physiques et psychiques, et possède un pouvoir carcinogène et mutagène. Les effets systémiques de l'ypérite amènent à considérer une personne exposée comme un sujet immunodéprimé. L'ypérite possède malgré tout une létalité relativement faible (1 à 3 %). Sa DL50 chez l'homme est estimée à 100 mg/kg par voie cutanée (l'équivalent d'une cuillère à café pour un homme de 70 kg). L'ypérite est caractérisée par un pouvoir de pénétration très rapide de la barrière cutanée : l'épiderme est traversé en 2 minutes, le derme en 30 minutes. Ainsi, une exposition cutanée peut-elle entraîner des dommages systémiques et dans les organes internes.

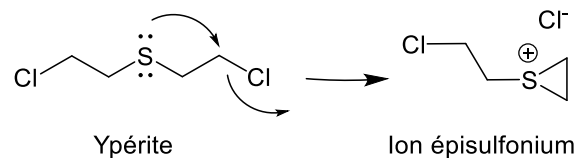
En l'absence d'antidote et de traitement spécifique, la prise en charge actuelle se limite à un traitement symptomatique et à des soins de support, analogues à ceux des brûlures thermiques,

ayant pour objectif une cicatrisation et une récupération fonctionnelle optimales. La guérison des lésions cutanées est particulièrement longue et difficile et des séquelles au niveau des articulations sensibles souvent présentes.

3. Biomarqueurs moléculaires à court et moyen termes

L'ypérite est un agent alkylant bifonctionnel puissant, qui réagit rapidement dans des conditions physiologiques avec de nombreuses molécules nucléophiles, telles que l'eau, le glutathion, l'ADN et les protéines, par l'intermédiaire de l'ion épisulfonium (**Figure 1**). Les transformations chimiques des biomolécules sont des réactions d'addition. Leurs produits sont donc qualifiés d'adduits ou de conjugués dans le cas du glutathion. C'est donc sous des formes transformées qu'il faut rechercher l'ypérite afin de définir des biomarqueurs

Figure 1 : Structure chimique de l'ypérite et de sa forme intermédiaire réactive épisulfonium issue d'une cyclisation intramoléculaire.



Hydrolyse et oxydation de l'ypérite

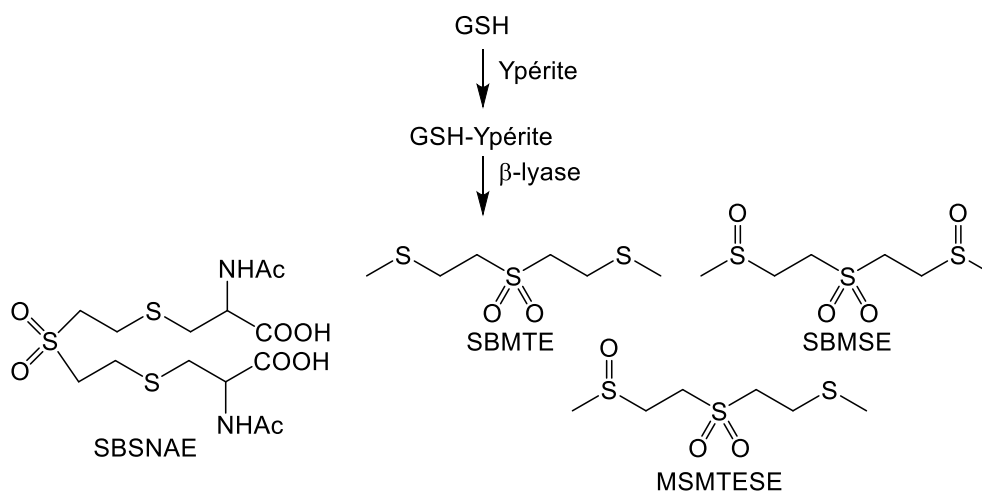
Au contact de la peau et des muqueuses, l'ypérite est hydrolysée en thiodiglycol (TDG), ou bien oxydée, tout d'abord sous forme sulfoxyde (TDGO), puis sous forme sulfone. Le TDG et le TDGO peuvent être quantifiés avec un seuil de détection de 1 ng/mL par chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS), et de 0,1 ng/mL par GC couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS). Bien que ces deux composés soient présents à l'état physiologique, ils peuvent tout de même être utilisés comme biomarqueurs à des fins de dépistage. Ils ne sont détectables que pendant environ une semaine dans les exsudats des phlyctènes et les urines [3]. Une méthode d'analyse rapide faisant appel à la GC-MS avec ionisation chimique, du bis-chloroethyl sulfoxyde (SMO) dans le plasma, en

tant que biomarqueur d'exposition à l'ypérite, a récemment été développée. Elle permet le diagnostic d'une intoxication par l'ypérite en moins de 15 minutes, y compris pendant la phase asymptomatique [4]. Des essais ont été également menés pour quantifier l'ypérite dans les cheveux [5].

Conjugués au glutathion

Une des cibles privilégiées de l'ypérite dans l'organisme est le glutathion. Ce tripeptide joue un rôle majeur de protection des cellules contre le stress oxydant et contre les molécules et métabolites électrophiles. La diminution très importante de la quantité de glutathion causée par l'ypérite est un des mécanismes conduisant à la mort cellulaire et la dégradation des tissus touchés. L'ypérite s'additionne sur le groupement thiol du glutathion.

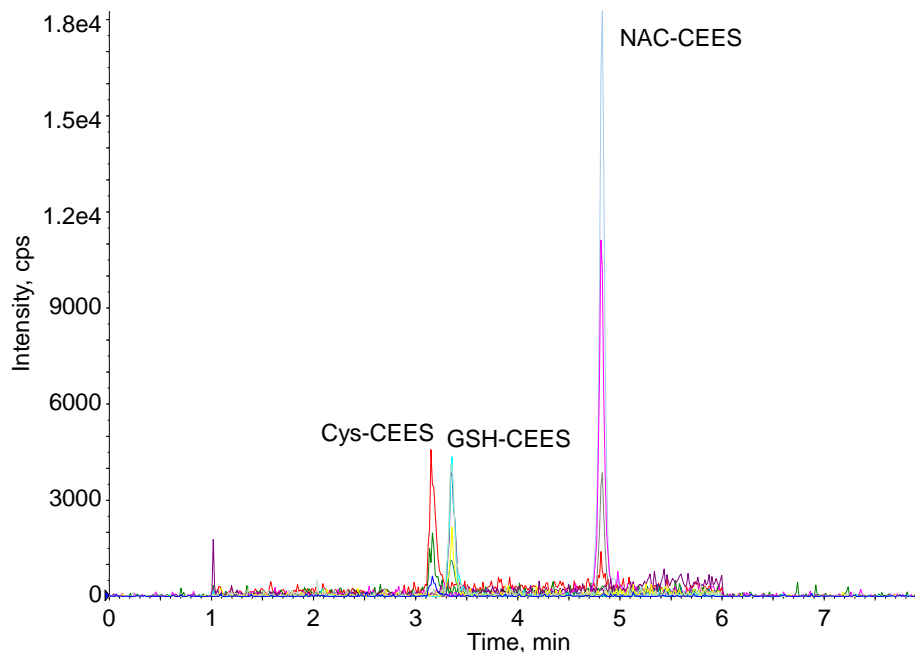
Figure 2 : Devenir des conjugués de l'ypérite avec le glutathion après action de la β -lyase, adduits d'ADN et oxydation.



Plutôt que de doser le conjugué GSH-glutathion initialement formé, des méthodes ont été développées pour cibler ses produits d'oxydation et de coupure par la β -lyase. Cette réaction enzymatique conduit à 4 produits différents : SBSNAE, SBMTE, MSMTESE et SBMSE (**Figure 2**). Une méthode d'analyse rapide donne accès simultanément à 7 métabolites de l'ypérite, dont les 3 métabolites de la β -lyase (SBMTE, MSMTSE et SBMSE), ainsi qu'au TDG et TDGO. Cette méthode fait appel à la chromatographie liquide ultra-haute performance

(UHPLC) couplée à la MS/MS [6]. L'intérêt de ces marqueurs urinaires est leur précocité d'apparition, permettant ainsi une détection rapide de l'intoxication. Le SBMTE présente un pic de concentration 4 heures après exposition (entre 8 et 10 heures pour le SBMSE et le MSMTSE), puis une décroissance régulière. Les métabolites de la β -lyase peuvent être détectés dans les urines au maximum pendant 10 jours après intoxication, pendant une semaine dans le sang et 6 jours dans les exsudats de phlyctènes [3].

Figure 3 : Chromatogrammes obtenus lors de la détection par HPLC-MS/MS de 100 fmol des adduits du CEES au glutathion, à la cystéine et à la N-acétylcystéine. Le détection est réalisée en mode « multiple Reaction Monitoring » dans lequel seules les intensités de quelques fragments des ions moléculaires sont suivis, apportant ainsi sensibilité et spécificité.

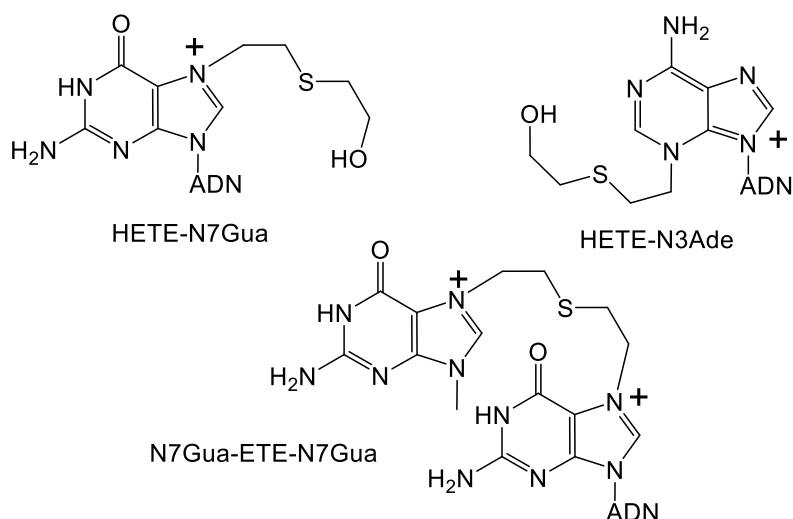


Un adduit spécifique d'intérêt, mais thermolabile, est issu de la réaction de 2 molécules de glutathion et du dérivé sulfone de l'ypérite. Il peut être dosé par HPLC-MS [7]. Des développements sont en cours dans nos équipes pour détecter les adduits du CEES au glutathion, à la cystéine et à la N-acétylcystéine par HPLC-MS/MS (Figure 3)

Adduits à l'ADN

L'ADN est également une cible majeure de l'ypérite. Ce sont en particulier les bases puriques (adénine et guanine) qui sont les plus réactives en formant des adduits avec l'ypérite. Ces composés, qui sont liés à l'agent génotoxique, sont des marqueurs beaucoup plus spécifiques que par exemple les produits d'oxydation. Ce sont également des marqueurs d'effets puisqu'une voie de cytotoxicité de l'ypérite implique une sur-activation de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) en réponse aux dommages de l'ADN conduisant à une perturbation du métabolisme énergétique cellulaire. Les adduits sont également impliqués dans les propriétés mutagènes et cancérigènes de l'ypérite. La N⁷-hydroxyéthylthioéthylguanine (HETE-N7Gua) est le plus abondant des différents adduits de l'ypérite dans l'ADN (**Figure 4**) [8,9]. Si des approches par immunodétection ont été proposées pour quantifier ces adduits [10], l'analyse par HPLC-MS/MS de l'ADN hydrolysé en monomères s'impose comme un outil plus spécifique et sensible [8,11].

Figure 4 : Structures chimiques des adduits de l'ypérite et de l'ADN. En haut, 2 monoadduits sur bases puriques : HETE-N7Gua : N7-hydroxyéthylthioéthyl-guanine et HETE-N3Ade : N3-hydroxyéthylthioéthyl-adénine. En bas, biadduit entre les N7 de 2 guanines : N7Gua-ETE-N7Gua : bis(N7guanine-éthyl)sulfide.



Cette approche a été utilisée chez l'animal exposé à l'ypérite de façon topique. Il a été montré que la cinétique de formation dans la peau des adduits d'ADN et d'ypérite est dose-dépendante et corrélée avec l'apparence des cellules en apoptose. Ces adduits étaient encore détectables

dans la peau 21 jours après exposition [8], et entre 14 et 30 jours dans le sang et les urines [3]. La quantification de ces adduits dans plusieurs organes internes a aussi permis de confirmer la diffusion rapide de l'ypérite à travers la peau [11]. Le cerveau et les poumons sont ainsi les organes ayant la plus forte concentration d'adduits. La persistance des adduits de l'ADN n'est pas la même dans les différents organes, le poumon est l'organe affichant la plus longue persistance.

Adduits aux protéines

Comme l'ADN, les protéines contiennent des sites nucléophiles qui sont susceptibles de réagir avec l'ypérite. Les protéines de la circulation sanguines sont particulièrement intéressantes pour un dosage peu invasif de biomarqueurs. Plusieurs méthodologies ont ainsi été développées.

L'hémoglobine humaine est une première cible étudiée. Elle comporte 46 sites potentiels d'alkylation. Toutefois, en raison de sa structure quaternaire, seuls 10 sites subissent une alkylation. L'adduit de l'ypérite sur la valine N terminale [12] est quantifié en libérant les différents acides aminés de l'hémoglobine par une dégradation modifiée d'Edman puis par analyse par GC-MS ou GC-MS/MS. L'alkylation de la valine N-terminale ne représentant au maximum que 2 % des alkylations, une autre méthode a été mise au point pour détecter l'ensemble des alkylations après digestion de l'hémoglobine par la pronase E. L'intérêt des adduits ypérite-hémoglobine est leur facilité d'accès, car un simple prélèvement de sang périphérique est suffisant. Il s'agit d'un biomarqueur sensible car 25 % de l'ypérite arrivant dans le sang se lie à l'hémoglobine. D'autre part, l'adduit ypérite-hémoglobine est le biomarqueur présentant la plus grande persistance parmi les biomarqueurs sanguins et urinaires de l'ypérite car il peut être détecté pendant toute la durée de vie de l'hématie, c'est-à-dire 120 jours [3].

L'adduit de l'albumine est le second biomarqueur d'intérêt de l'ypérite, puisque 20 % de la dose d'exposition se lie à l'albumine. Contrairement à l'hémoglobine, l'albumine n'a qu'un

seul résidu susceptible d'être alkylé par l'ypérite : la cystéine 34. La plupart des techniques analytiques utilisent la dégradation de l'albumine sérique humaine par la pronase, afin de former le tripeptide alkylé à l'ypérite HETE-Cys-Pro-Phe qui est ensuite dosé par HPLC-MS/MS ou par UHPLC-MS-MS [13]. La méthionine 329 a été récemment identifiée comme un autre site d'alkylation de la sérum albumine humaine par l'ypérite ; cependant, sa persistance *in vitro* et *in vivo* est limitée à 5 jours [14].

L'alkylation d'autres protéines par l'ypérite a aussi été étudiée. Ainsi, des adduits obtenus par réaction de l'ypérite avec les acides aspartiques et glutamiques contenus dans l'ensemble des protéines sanguines peuvent être mis en évidence jusqu'à 45 jours après exposition chez l'animal [7]. Par ailleurs, il a été montré que l'ypérite réagit fortement avec la kératine, souvent l'une des premières molécules avec laquelle elle entre en contact. La kératine est capable de réagir avec 20 % de la dose d'exposition. Les adduits peuvent être mis en évidence par spectrométrie de masse ou Western blot [15].

4. Biomarqueurs à plus long terme

De nombreuses tentatives ont été entreprises sur des victimes iraniennes du conflit avec l'Irak dans les années 80, afin de caractériser des biomarqueurs à long terme d'une intoxication par l'ypérite, en lien avec une atteinte générale, pulmonaire ou oculaire. En particulier, une grande étude de cohorte « Sardasht-Iran Cohort Study » (ICS) a concerné 500 personnes, dont 372 exposées en 1986, soit 20 ans avant leur inclusion dans l'étude. 93 paramètres biologiques ont été recueillis sur chaque sujet. Trois cytokines ont été trouvées fortement modifiées chez les sujets intoxiqués, dont l'interleukine 8. Elles pourraient permettre de dépister la persistance d'effets généraux à long terme et orienter ainsi vers une prise en charge spécifique. De plus, l'immunoglobuline A salivaire se trouve significativement augmentée dans la salive contaminée. Cependant, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques de l'ypérite.

Une autre étude iranienne [16] a été conduite chez 84 victimes intoxiquées en 1986. Après extraction d'ARN à partir d'échantillons de sérum et PCR quantitative, il a été montré que certains microARN, qui régulent de nombreuses voies métaboliques, peuvent être des biomarqueurs des complications à long terme de l'ypérite. Parmi ceux-ci, le miR-143-3p semble être le plus pertinent chez des patients modérément ou sévèrement intoxiqués. Le miR-148a-3p semble quant à lui spécifique des séquelles respiratoires à long terme. D'autres paramètres en lien avec une atteinte pulmonaire, mais non spécifiques de l'ypérite ont été modifiés, dont les IgM et IgG4 sériques, la métalloprotéinase-1 (atteinte sévère) et 2 (atteinte moyenne), le Fas-ligand.

Les sélectines sont des glycoprotéines appartenant à la famille des lectines. Elles sont exprimées par les leucocytes (L-sélectines), les plaquettes (P-sélectines) et les cellules endothéliales (E-sélectines et P-sélectines). Les concentrations sériques de L-sélectine et de P-sélectine sont diminuées, tandis que la E-sélectine est augmentée chez les personnes exposées à l'ypérite. La diminution de P-sélectine et de L-sélectine favorise la survenue d'une atteinte oculaire. Les sélectines sont donc des biomarqueurs prédictifs de possibles complications oculaires. Leur dosage régulier pourrait donc permettre de planifier une surveillance ophtalmologique adaptée au risque du patient [17].

Les analyses protéomiques ou métabolomiques pourraient également permettre de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet consécutivement à une intoxication par l'ypérite. Ces approches sont basées sur l'analyse comparative de jeux de données très conséquents puisque souvent obtenus à grande échelle. En effet, l'analyse métabolomique consiste en l'analyse de l'ensemble des molécules organiques de petites tailles (<1500 Da), ou métabolites, présents dans un système biologique donné (cellule, tissu, organisme). Elle vise à une meilleure compréhension de ces systèmes biologiques en mettant en évidence des interrelations métaboliques - via le suivi de plusieurs centaines de descripteurs

moléculaires - qui n'auraient pu être détectés par des approches biochimiques conventionnelles. Une telle abondance d'information pourrait également permettre de constituer des profils d'évolution (péjorative dans le cas de l'ypérite) de ces composés, de préciser ainsi voire même de prédire l'origine de l'atteinte, et potentiellement de mettre en évidence des biomarqueurs « long terme » d'une exposition à l'ypérite. Quelques études récentes soulignent de façon assez préliminaire l'intérêt de ces approches pour diagnostiquer des patients exposés à de l'ypérite par rapport à des individus sains, avec notamment un impact notable et durable sur le métabolisme des acides aminés [18,19].

5. Conclusion

Plus de 100 ans après sa première utilisation au cours de la 1^{ère} guerre mondiale, l'ypérite demeure un agent de la menace terroriste et de guerre chimique. La recherche de biomarqueurs spécifiques et rémanents s'est montrée particulièrement active ces dernières années. De nombreuses méthodes ont ainsi été mises au point pour quantifier de produits de dégradation de diverses biomolécules. De nouvelles pistes restent à explorer. Les données montrant l'impact persistant de l'ypérite sur certaines protéines cutanées comme la laminine-5 [20] ou la métalloprotéinase-9 (MMP-9) [21] pourrait ouvrir la voie à de nouveaux types de biomarqueurs. L'évolution des techniques va permettre l'accès à de nouvelles informations. Ainsi, des méthodes de séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing ou NGS) sont récemment apparues, qui permettent de détecter non seulement les adduits d'ADN, mais également les mutations, les variations structurelles de chromosomes, ainsi que les aberrations épigénétiques après intoxication par l'ypérite [22]. Le recours à des méthodes de protéomique ou de génomique commence également à se développer. Un dernier point à mentionner est l'apport probable des techniques de métabolomique sur les effets d'une

molécule touchant un grand nombre de cibles cellulaires et susceptible de perturber de nombreuses voies métaboliques à plus long terme.

Bibliographie

- [1] 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 (CIAC), éditée par l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC).
- [2] Rouche E. *Les biomarqueurs d'exposition à l'ypérite : connaissances actuelles et applications*, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Claude Bernard – Lyon 1, **2016**.
- [3] Xu H., Nie Z., Zhang Y., Li C., Yue L. *et al.* Four sulfur mustard exposure cases : Overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring. *Toxicol. Rep.*, **2014**, *1*, p.533.
- [4] Manandhar E., Pay A., Veress A.L., Logue B.A. Rapid analysis of sulfur mustard oxide in plasma using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry for diagnosis of sulfur mustard exposure. *J. Chromatogr. A* **2018**, 1572, p. 106.
- [5] Spiandore M., Piram A., Lacoste A., Josse D., Doumenq P. Hair analysis as a useful procedure for detection of vapour exposure to chemical warfare agents : simulation of sulphur mustard with methyl salicylate: sorption of a sulphur mustard simulant on hair. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, p.67.
- [6] Li C., Chen J., Liu Q., Xie J., Li H. Simultaneous quantification of seven plasma metabolites of sulfur mustard by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2013**, 917-918, p. 100.
- [7] Orlova O.I., Savel'eva E.I., Khlebnikova N.S. Methods for the detection of sulfur mustard metabolites in biological materials: an analytical review. *J. Anal. Chem.* **2013**, *68*, p.4.
- [8] Batal M., Boudry I., Mouret S., Wartelle J., Emorine S. *et al.* Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2013**, *273*, p. 644.
- [9] Batal M., Rebelo-Moreira S., Hamon N., Bayle P.A., Mouret S. *et al.* A guanine-ethylthioethyl-glutathione adduct as a major DNA lesion in the skin and in organs of mice exposed to sulfur mustard. *Toxicol. Lett.*, **2015**, *233*, p. 1.
- [10] Kehe K., Schrettl V., Thiermann H., Steinritz D. Modified immunoblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. *Chem. Biol. Interact.*, **2013**, *206*, p.523.
- [11] Batal M., Boudry I., Mouret S., Cléry-Barraud C., Wartelle J. *et al.* DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2014**, *278*, p. 39.

- [12] Black R.M., Harrison J.M., Read R.W. Biological fate of Sulphur mustard: in vitro alkylation of human haemoglobin by Sulphur mustard. *Xenobiotica*, **1997**, *27*, p.11.
- [13] Liu C.C., Liang L.H., Xiang Y., Yu H.L., Zhou S.K. *et al.* An improved method for retrospective quantification of sulfur mustard exposure by detection of its albumin adduct using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *23*, p.7037.
- [14] Siegert M., Gandor F., Kranawetvogl A., Börner H., Thiermann H. *et al.* Methionine³²⁹ in human serum albumin: a novel target for alkylation by sulfur mustard. *Drug Test. Anal.* **2018**, Nov 23. doi: 10.1002/dta.2548.
- [15] Dillman J.F., McGary K.L., Schlager J.J. Sulfur mustard induces the formation of keratin aggregates in human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *193*, p.228.
- [16] Gharbi S., Khateri S., Reza Soroush M., Shamsara M., Naeli P. *et al.* MicroRNA expression in serum samples of sulfur mustard veterans as a diagnostic gateway to improve care. *Plos One*, **2018**, March 22, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194530>.
- [17] Yaraee R., Ghazanfari T., Faghihzadeh S., Mostafaie A., Soroush M.R. *et al.* Alterations in the serum levels of soluble L, P and E-selectin 20 years after sulfur mustard exposure : Sardasht-Iran Cohort study. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, p.1477.
- [18] Nobakht, B. Fatemeh; Oskouie, Afsaneh Arefi; Rezaei-Tavirani, Mostafa; et al. NMR spectroscopy-based metabolomic study of serum in sulfur mustard exposed patients with lung disease. *Biomarkers* **2017**, *22*, p 413
- [19] Zamani, Zahra; Ghanei, Mostafa; Panahi, Yunus; et al. Serum Metabolomic profiling of sulphur mustard-exposed individuals using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *1*, p 77
- [20] Jin X., Ray R., Leng Y., Ray P. Molecular determination of laminin-5 degradation: a biomarker for mustard gas exposure diagnosis and its mechanism of action. *Exp. Dermatol.*, **2007**, *17*, p.49.
- [21] Shakerjian M.P., Bhatt P., Gordon M.K., Chang Y.C., Casbohm S. *et al.* Preferential expression of matrix metalloproteinase-9 in mouse skin after sulfur mustard exposure. *J. Appl. Toxicol.* **2006**, *26*, p.239.
- [22] Panahi Y., Fattahi A., Zarei A., Ghasemzadeh N., Mohammadpoor A. et al. Next-generation sequencing approaches for the study of genome and epigenome toxicity induced by sulfur mustard. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, p. 3443