



Nanoparticules en réseau pour la protection cutanée

Cécile Bignon

► To cite this version:

Cécile Bignon. Nanoparticules en réseau pour la protection cutanée. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. ⟨NNT : 2015NICE4084⟩. ⟨tel-01271303⟩

HAL Id: tel-01271303

<https://theses.hal.science/tel-01271303v1>

Submitted on 9 Feb 2016

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

UNIVERSITE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS UFR Sciences

Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales et Appliquées

T H E S E

pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences

De l'Université Nice-Sophia Antipolis

Discipline : Chimie

Présentée et soutenue par

Cécile Bignon

**NANOPARTICULES EN RESEAU POUR LA
PROTECTION CUTANEE**

Thèse dirigée par le Professeur Frédéric Guittard

Soutenue le 10 novembre 2015 devant le jury composé de :

R. Chilcott	Professeur, University of Hertfordshire, Royaume-Uni	Rapporteur
K.O. Awitor	Professeur, Université d'Auvergne, France	Rapporteur
T. Devers	Maitre de conférences – HDR, Université D'Orléans, France	Examineur
S. Grégoire	Docteur, L'Oréal, France	Examineur
J. Thourot	Docteur, Direction Générale de l'Armement, France	Examineur
F. Guittard	Professeur, Université Nice Sophia-Antipolis, France	Directeur
S. Amigoni	Maitre de conférences – HDR, Université Nice Sophia-Antipolis, France	Co-directeur

« L'essentiel dans la vie c'est de donner le meilleur de soi-même », AF

Avant-propos

First of all, I would like to thank Professor Robert Chilcott for accepting to examine my work as a reporter. Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Komla Oscar Awitor d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que rapporteur.

Une Thèse selon le dictionnaire Larousse est l' « ensemble des travaux présentés, sous forme d'ouvrage, en vue de l'obtention du grade de docteur ; exposé public de cet ouvrage ». En réalité, le mot thèse ne peut pas simplement être résumé à cette définition, chaque thèse est différente et dépend de ce que l'on en fait.

La mienne a débuté il y a trois ans, j'étais tout juste sortie d'une école d'ingénieur en toxicologie. J'ai décidé de développer une double compétence et je me suis embarquée dans l'aventure de la Chimie, je n'ai pas été déçue ! Ces trois dernières années ont été empreintes d'émotions, d'évolutions et de réalisations. Le travail de doctorant, c'est avant tout se remettre en question, accepter la critique, l'échec et savoir en tirer parti pour évoluer et faire évoluer.

Au cours de ces trois dernières années, j'ai réalisé que ce travail de docteur et de « futur manager » (*dixit* Frédéric) n'était pas seulement d'œuvrer à son projet dans son coin. C'est également la création et la gestion de partenariat et la liaison à des entreprises aussi diverses qu'excitantes : Episkin (L'Oréal), un grand merci à Alain Alonso pour votre confiance, au Dr. Christian Pellevoisin pour vos conseils et surtout au Dr. Sébastien Grégoire d'avoir apporté votre opinion tout au long du projet sur RHE et encore maintenant puisque vous avez accepté d'être examinateur de mon jury de thèse. Merci infiniment pour votre implication et vos conseils avisés ! ; ABC Texture : Tifenn j'ai beaucoup apprécié nos nombreux appels, merci d'avoir partagé ton savoir-faire en formulation cosmétique et pour les essais de stabilité ; COTY-Lancaster : merci Marc, Dorothée et Roselyne pour

vosre aide et merci Mylène, ma super ancienne chef pour les tests tox, également merci Carine et Elisabeth. Pour Thierry Devers, j'ai adoré mes brefs passages à Chartres, je suis ravie que tu m'aies fait partager le monde passionnant de la cérine et de la synthèse de nanoparticules, merci aujourd'hui d'avoir accepté d'examiner ce travail. Denis, ton guidage « biologique » a été utile dans ce monde de chimiste. Enfin de notre université : Jean-Pierre Laugier je suis super contente de nos belles images MEB, Dominique & Thierry merci pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire de culture cell pour les tests sur RHE !! Et Charlotte, quel plaisir d'avoir travaillé avec toi ce dernier mois de juin, j'ai beaucoup apprécié ton savoir en écotox et nos échanges !! Enfin, merci à la Direction Générale de l'Armement d'avoir cru en ce projet et de l'avoir soutenu et également au Dr. Julien Thourot d'avoir accepté d'être examinateur de mon jury de thèse.

La thèse est surtout une véritable rencontre qui permet la création d'amitiés durables, Janwa :

كثير اشيا بدي قللك ياهن جنوتي، انت كنت الدعم و ما كنت عرفت اوصل من
دونك. انا اكثر وحدة محظوظة لانو انت كنت رفيقتي ويشكر السما على هالفرصة.
وبتمنى ضل شوفيك كثير حتى لو انا تركت المدينة بللي انت بتحبيها كثير . دايما
فيكي تجي تنزوريني.

Jeanne : ma petite Jeanne, mon deuxième pilier !, merci pour ton soutien, nos longues discussions qui m'ont souvent permis d'y voir plus clair et qui m'ont remotivées et surtout merci pour ton ouverture d'esprit et enfin Elena *vorrei semplicemente ringraziarti per esserci sempre stata, per avermi tanto incoraggiato e sostenuto* !! Je suis également ravie d'avoir rencontré les personnes qui sont passées par le labo : les anciens, Matthieu, non je ne passerai pas à MAC !, Arnaud, on continuera toujours à (secrètement et confidentiellement) parler polymères, Mélanie miss Security je suis ravie d'avoir eu ton exemple, Hervé je ne t'ai pas beaucoup vu mais promis un jour je me mettrai à la chorale ! Ceux qui ont vécu la même chose que moi : Sabri et le Grand Olivier (Monsieur le Docteur, le premier !) bien sûr on y est, on est à la fin !! et enfin tous les (« vieux ») nouveaux arrivants : Claudio, futur Tony Parker, promis la prochaine tarte au citron meringuée est pour toi, Gabriela *meu pequeno sorriso de Hollywood, obrigado por la teres estado estes ultimos meses e me*

teres sempre apoiado, Hernando ang aming opisyal na supplier ng kendi, Caroline (Rose) our (official) american translator, thanks you so much for your help!, Cynthia ma coéquipière de polymère mais également Jessica pour ta bonne humeur quotidienne ! Enfin, merci à l'équipe du 1^{er} pour toutes nos sorties parce qu'il fallait bien se détendre un peu (heureusement que vous étiez là !) : Nat, Guillaume, Matthieu, Rime, Amandine, Lucrezia et Seb (entre autre aussi pour tes leçons et conseils sur la rhéologie !).

La thèse comme le dit Frédéric, c'est l'apprentissage du futur manager. J'ai donc eu la chance au cours de ces trois dernières années d'avoir des stagiaires : du premier qui m'a fait confiance, Jean-Pascal à la dernière qui a juste été exceptionnelle Fanny en passant par Aurélien, Charlotte et Pauline ! En parlant de stagiaire, je ne peux pas t'oublier Océane, stagiaire éclair de Thierry, quand je disais que la thèse c'est la création d'amitiés durables c'est aussi à tous les niveaux, maintenant j'ai un pied à terre à Melun et surtout une alliée dans les forces de l'ordre !

Enfin, Frédéric, j'ai beaucoup apprécié nos longues discussions non scientifiques sur le monde et la vision des choses, j'ai énormément évolué en trois ans et c'est aussi (un peu quand même !) grâce à vous. Sonia, merci pour ta confiance et ton guidage subtile qui m'ont permis d'avancer en toute liberté et de m'approprier chaque évènement de ce projet. Thierry, que tu as pu me faire rire en trois ans, merci d'avoir toujours mangé avec autant d'appétit les gâteaux que j'ai pu faire ! Enfin Guilhem, heureusement que tu es arrivé, un peu de bio ne fait pas de mal à ce labo plein de chimiste ! ☺

On dit qu'on garde le meilleur pour la fin, les personnes les plus importantes dans ma vie : merci à ma famille et particulièrement ma maman d'avoir été là ces trois dernières années (pour la thèse et le reste) et bien évidemment à mes amis les plus proches : Camillouche, Soso, Cédric (de loin ! ^^) et les autres !

Table des matières

Introduction	1
Schéma synoptique	5
Chapitre 1	7
I. Les agents chimiques de guerre	9
1.1. Historique	9
1.2. Réglementation	10
1.3. Propriétés physicochimiques et toxiques des agents chimiques	12
1.1.1. Les agents vésicants	12
1.1.2. Les composés organophosphorés	14
II. La pénétration percutanée	18
2.1. La peau : structure et principales fonctions	18
2.2. L'épiderme : structure et fonction barrière	19
2.3. L'absorption percutanée	21
2.3.1. Mécanisme de l'absorption percutanée	21
2.3.2. Les voies de passage de l'absorption percutanée	22
2.3.3. Cinétique de l'absorption percutanée	24
2.3.4. Les paramètres influençant la pénétration percutanée	26
III. Méthodes de mesure et perméabilité vis-à-vis des agents chimiques de guerre	28
3.1. Méthodes et données in vivo	29
3.2. Méthodes et données in vitro	30
3.2.1. Modèles in vitro	31
3.2.2. Données de pénétration in vitro	35
IV. Les topiques protecteurs cutanés : un moyen de protection et de neutralisation des agents chimiques	36
4.1. Les méthodes de mesure de l'efficacité des TPC	38
4.2. Les crèmes barrière passives	40
4.3. Les aTSP	42
4.3.1. Mécanismes de dégradation	42
4.3.2. Les molécules « actives » à incorporer dans les aTSP	44
V. Objectifs de notre étude	49
Références	51

I.	Synthèse des polymères greffés et optimisation.....	64
1.1.	Le macromère MF8.....	64
1.2.	Le polymère HASE-F-RF8.....	66
1.3.	Greffage des nanoparticules au polymère.....	67
1.4.	Protocole optimisé.....	69
II.	Synthèse de nouveaux composés HASE-F-RF8/NPs.....	70
2.1.	Fonctionnalisation de nouvelles particules.....	70
2.1.1.	Dioxyde de cérium 100 nm.....	70
2.1.2.	Dioxyde de titane enrobé silice.....	71
2.2.	Greffage des nanoparticules de TiO_2 et de Ca^{2+} - CeO_2	73
III.	Amélioration des actifs.....	75
3.1.	Réaction chimique.....	75
3.2.	Caractérisation et analyses des HASE-F-RF8/NPFR8.....	76
3.2.1.	Polymère silice surgreffé (PSi/RF8).....	76
3.2.2.	Polymères cérine (PCe/RF8) et dioxyde de titane (Pti/RF8) surgreffés.....	81
3.3.	Conclusion sur l'amélioration des actifs.....	86
IV.	Conclusion.....	87
	Références.....	89

I.	Innocuité cutanée des polymères greffés et nanoparticules.....	93
1.1.	Test du relargage au rouge neutre.....	95
1.2.	Test HET-CAM.....	96
1.3.	Conclusion des tests de toxicité cutanée.....	99
II.	Etude de l'écotoxicité des nanoparticules et polymères greffés.....	100
2.1.	Principe du test et protocole.....	101
2.2.	Ecotoxicité des nanoparticules.....	101
2.3.	Ecotoxicité des polymères.....	103
2.4.	Conclusion du test environnemental.....	105
	Références.....	107

I.	Formulation et sélection des crèmes à tester.....	113
1.1.	Méthode de formulation	113
1.2.	Méthode d'analyse des formules.....	114
1.2.1.	Choix de la méthode de dépôt des formules.....	114
1.2.2.	Aspect visuel et microscopique des formules.....	115
1.3.	Sélection des formules à base de polymère greffé silice	116
1.4.	Sélection des formules à base de polymère greffé cérine	117
1.5.	Sélection des formules à base de polymère greffé titane	117
1.6.	Sélection des formules à base de mélange de polymères PSi/PCe	118
1.7.	Etude de la mouillabilité des dépôts de topiques.....	118
1.8.	Conclusion	119
II.	Screening in vitro sur membranes siliconées vis-à-vis du paraoxon	120
2.1.	Effet des ingrédients sur la pénétration du paraoxon	120
2.2.	Sélection des formules à base de polymère greffé silice	121
2.3.	Sélection des formules à base de polymère greffé cérine	122
2.4.	Etude du potentiel synergique des nanoparticules	124
2.5.	Conclusion	125
III.	Formulation en grande quantité.....	127
3.1.	Formulation.....	127
3.1.1.	Formule 1 : F1	127
3.1.2.	Formule 2 : F2	127
3.2.	Observations en microscopie.....	128
3.3.	Stabilité et étude rhéologique des formules F1 et F2.....	130
3.3.1.	Principe et définition de la rhéologie.....	130
3.3.2.	Etude des crèmes à T0	132
3.3.3.	Vieillissement accéléré de F1	134
3.3.4.	Vieillissement accéléré de F2	138
3.3.5.	Conclusion.....	141
3.4.	Rugosité et épaisseur des dépôts de formules	141
3.5.	Mouillabilité des formules	142
3.5.1.	Effet dose	143
3.5.2.	Effet temps.....	144
3.5.3.	Effet vieillissement	144
3.5.4.	Effet séchage	145
IV.	Conclusion	146
	Références	147

I.	Etape 1 : Etude détaillée des TPC candidats sur membranes artificielles	153
1.1.	Formule 1 : F1	153
1.1.1.	Part d'activité des nanoparticules sur l'efficacité	153
1.1.2.	Effet dose de la quantité de dépôt	154
1.2.	Formule 2 : F2	156
1.2.1.	Impact de la formulation sur l'efficacité	156
1.2.2.	Part d'activité des nanoparticules sur l'efficacité	157
1.2.3.	Effet dose des actifs/nanoparticules sur l'efficacité	158
1.2.4.	Comparaison de l'efficacité de F2 à des formules préexistantes	160
1.3.	Comparaison de l'efficacité des formules Base1 et Base2 : effet du PVP	161
1.4.	Comparaison de l'efficacité des formules F1 vs F2	163
1.5.	Influence de différents facteurs sur l'efficacité de la crème	163
1.5.1.	Influence du temps d'exposition.....	163
1.5.2.	Résistance à l'occlusion.....	165
1.5.3.	Influence du vieillissement sur l'efficacité.....	166
1.6.	Effet membrane sur l'efficacité.....	168
II.	Etape 2 : Validation de l'efficacité des formules sur explant in vitro de peau humaine	169
2.1.	Protocole	169
2.2.	Résultats.....	170
2.3.	Comparaison des TPC candidats à des crèmes préexistantes	172
2.4.	Comparaison des résultats sur membranes artificielles et peaux humaines	172
III.	Conclusion	174
	Références	175

I.	Etude 1 : perméabilité des modèles RHE	180
1.1.	Perméabilité des épidermes à la caféine	181
1.2.	Perméabilité des épidermes au paraoxon	182
1.3.	Effet des mèches sur la pénétration du paraoxon	186
II.	Etude 2 : capacité des RHE à identifier des TPC candidats	188
III.	Conclusion	190
	Références	192

Conclusion générale et perspectives	195
Annexes	201

Liste des figures

Figure 1-1 : Dessin ancien illustrant l'utilisation de bombes suffocantes pour l'abordage de navires par les marins	9
Figure 1-2 : Photos d'attaques au cours de la Première guerre mondiale par des gaz de chlore par les Anglais (Loos, 1915, A), de lacrymogènes (B) et de phosgènes (Carnoy 1916, C) par les Allemands	10
Figure 1-3 : Tests de brulure au gaz moutarde sur l'avant-bras d'un soldat.....	13
Figure 1-4 : Mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les OP.	17
Figure 1-5 : Représentation schématisée des couches cutanées	19
Figure 1-6 : Représentation schématisée des couches épidermiques	20
Figure 1-7 : L'absorption cutanée.....	21
Figure 1-8 : Les différentes voies de passage des molécules au travers de la couche cornée	23
Figure 1-9 : Représentation schématisée de la matrice lipidique (gauche) et observation microscopique (droite)	23
Figure 1-10 : Cinétique de pénétration en conditions infinies (gauche) et finies (droite).....	25
Figure 1-11 : Schéma hiérarchique des méthodes utilisées pour évaluer l'absorption percutanée des molécules.	28
Figure 1-12 : Constitution et principe d'une cellule de diffusion (A) ; Graphique de la cinétique de passage (B).	31
Figure 1-13 : Les différentes cellules de diffusion.....	34
Figure 1-14 : Dégradation du VX par hydrolyse dans l'eau aux différents pH (A), hydrolyse par un peroxyde (B) et par chlorination oxydative (C).	43
Figure 1-15 : Mécanisme complet de dégradation du VX (A) et du POX (B) par la soude (NaOH).	43
Figure 1-16 : Mécanisme de dégradation des agents chimiques de guerre par les nanoparticules.....	47
Figure 1-17 : Craquellement des dépôts de polymère au séchage.....	49
Figure 2-1 : Polymère HASE-F-RF8 greffé (gauche) et schéma des interactions possibles lors de la formation du réseau 3D en solution aqueuse basique (droite).	61
Figure 2-2 : Mesure de l'angle de contact à l'interface liquide/solide/vapeur (modèle de Young).	62
Figure 2-3 : Modèles et équations de Wenzel et Cassie-Baxter.....	63
Figure 2-4 : Comportement parahydrophobe des pétales de rose (A) et superhydrophobe des feuilles de lotus (B)	63
Figure 2-5 : Schéma global de synthèse des actifs greffés.....	65
Figure 2-6 : Réaction de synthèse du macromère MF8.	66

Figure 2-7 : Réaction de synthèse du polymère.....	66
Figure 2-8 : Greffage des nanoparticules fonctionnalisées au polymère HASE-F-RF8.....	67
Figure 2-9 : Analyses IR du greffage des nanoparticules au cours du temps.....	68
Figure 2-10 : Schéma de l'optimisation de la synthèse des actifs greffés.....	69
Figure 2-11 : Analyse IR des particules de dioxyde de cérium 10nm (gauche) et 100nm (droite).	71
Figure 2-12 : Analyse IR des particules de dioxyde de titane.....	72
Figure 2-13 : Fonctionnalisation des nanoparticules de dioxyde de titane révélée à la ninhydrine.	72
Figure 2-14 : Analyse IR du polymère greffé dioxyde de titane.	73
Figure 2-15 : Analyse IR du polymère greffé dioxyde de cerium dopée calcium.	74
Figure 2-16 : Réaction de surgreffage des nanoparticules greffées au polymère HASE-F-RF8.....	75
Figure 2-17 : Potentiel zêta des suspensions de polymères, polymères greffés silice et homologues surgreffés.....	76
Figure 2-18 : Etude de stabilité du polymère silice surgreffé.	77
Figure 2-19 : Etude en écoulement des polymères greffés silice (●) et surgreffés (◆).	78
Figure 2-20 : Mouillabilité des polymères greffés silice (●) et surgreffés (▪) en fonction de la quantité déposée.	78
Figure 2-21 : Clichés MEB des polymères silice greffés et surgreffés.	80
Figure 2-22 : Mouillabilité des polymères greffés (◆) et surgreffés (●) dioxyde de cérium et dioxyde de titane.	81
Figure 2-23 : Rugosité des polymères greffés et surgreffés dioxyde de cérium et dioxyde de titane.....	82
Figure 2-24 : Image AFM (gauche) et MEB (droite) des polymères greffés et surgreffés dioxyde de cérium et dioxyde de titane.	84
Figure 2-25 : Etude en écoulement des polymères greffés (●) et surgreffés (◆) dioxyde de cérium (A) et dioxyde de titane (B).	84
Figure 2-26 : Image MEB des tranches des polymères greffés (gauche) et surgreffés (droite) dioxyde de cérium (A), dioxyde de titane (B)	85
Figure 2-27 : Diagramme du coût de 10 g de polymère HASE-F-RF8/NPs	87
Figure 3-1 : Cytotoxicité du contrôle positif SDS.....	95
Figure 3-2 : Cytotoxicité des échantillons.	96
Figure 3-3 : Tests HET-CAM et mise en évidence de la MCA.	97
Figure 3-4 : EC50 des nanoparticules de silice et du polymère greffé16.	100
Figure 3-5 : Accumulation des nanoparticules à 72h.	102
Figure 3-6 : Ecotoxicité des polymères.....	104
Figure 3-7 : Etude en écoulement des polymères testés.	104

Figure 4-1 : Méthodes d'étalements des formules : étalement à la spatule en silicone (A) et méthode du doigt de gant (B).....	115
Figure 4-2 : Processus des objectifs de formulation.	115
Figure 4-3 : Observations microscopiques des dépôts de formules.	115
Figure 4-4 : Craquèlement des polymères silice (A) et cérine (B) après séchage complet.	117
Figure 4-5 : Mouillabilité des formules sélectionnées.	119
Figure 4-6 : Schéma envisagé pour le screening des formules.	120
Figure 4-7 : Effet des ingrédients sur la pénétration du paraoxon (quantité = 50mg/cm ²).....	121
Figure 4-8 : Efficacité des formules à base de SiO ₂ à T6h vis-à-vis de la pénétration du paraoxon (TPC = 50mg/cm ²).	121
Figure 4-9 : Efficacité des formules à base de CeO ₂ à T6h vis-à-vis de la pénétration paraoxon.....	123
Figure 4-10 : Influence des nanoparticules sur l'efficacité à T6h.....	124
Figure 4-11 : Efficacité des formules mélangées à T6h.....	125
Figure 4-12 : Images MEB de dépôts de F1.....	129
Figure 4-13 : Images MEB de dépôts de F2 sur verre.....	129
Figure 4-14 : Profil rhéologique des fluides types.....	130
Figure 4-15 : Expérience d'écoulement pour les formules initiales.....	132
Figure 4-16 : Balayage en amplitude à fréquence fixe 1 Hz. (A) Evolution des modules élastiques et visqueux. (B) Evolution du facteur d'amortissement.....	133
Figure 4-17 : Balayage en fréquence à amplitude fixe 1Pa.	134
Figure 4-18 : Evolution visuelle de F1 (A) et du pH (B) au cours du vieillissement accéléré.....	135
Figure 4-19 : Evolution de la viscosité de F1 au cours du vieillissement.....	135
Figure 4-20 : Balayage en amplitude à fréquence fixe 1Hz de F1 au cours du vieillissement : évolution du facteur d'amortissement.....	136
Figure 4-21 : Observation visuelle de F2.	138
Figure 4-22 : Evolution du pH de F2 au cours du vieillissement accéléré.....	138
Figure 4-23 : Evolution de la viscosité de F2 au cours du vieillissement.....	139
Figure 4-24 : Balayage en amplitude à fréquence fixe 1Hz de F2 au cours du vieillissement : évolution du facteur d'amortissement.....	139
Figure 4-25 : Rugosité des dépôts de F1.	142
Figure 4-26 : Homogénéité du dépôt de F2 à 27mg/cm ² par profilométrie.	142
Figure 4-27 : Mouillabilité : effet dose.	143
Figure 4-28 : Mouillabilité : effet temps.....	144
Figure 4-29 : Mouillabilité : effet vieillissement.....	145
Figure 4-30 : Mouillabilité : effet séchage.....	145

Figure 5-1: Les différentes membranes utilisées.	152
Figure 5-2 : Effet de la formulation sur l'efficacité de F2.	156
Figure 5-3 : Pénétration du paraoxon sur membranes siliconées.	157
Figure 5-4 : Pénétration du paraoxon au travers des bases.....	161
Figure 5-5 : Efficacité des crèmes à 24h.	164
Figure 5-6 : Efficacité des crèmes en conditions occlusives.	165
Figure 5-7 : Efficacité des formules au cours du vieillissement de la crème.	167
Figure 5-8 : Efficacité des formules sur peaux humaines.....	170
Figure 5-9 : Répartition du paraoxon à la fin de l'expérience	171
Figure 6-1 : Composition du modèle de pénétration pour les RHE.	181
Figure 6-2 : Perméabilité des RHE à la caféine.....	182
Figure 6-3 : Perméabilité des RHE au paraoxon.	183
Figure 6-4 : Répartition du paraoxon à 24h.	184
Figure 6-5 : Effet des mèches sur la pénétration du paraoxon au travers des modèles RHE SkinEthic (A) et EpiSkin (B).	186
Figure 6-6 : Effet des mèches sur la mouillabilité du paraoxon.	186
Figure 6-7 : Effet des mèches sur la répartition du paraoxon à 24h.	187
Figure 6-8 : Protocole application des TPC candidats et du paraoxon.....	188
Figure 6-9 : Pénétration du paraoxon aux travers des crèmes sur EpiSkin 1.07cm ²	189
Figure 6-10 : Pénétration du paraoxon aux travers des TPC + mèches sur membranes siliconées.....	189
Figure 6-11 : Schéma de l'outil application alternatif aux mèches pour EpiSkin.....	191

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Propriétés physicochimiques et toxicité des Ypérites.....	13
Tableau 1-2 : Propriétés physicochimiques et toxicité des principaux NOP.....	15
Tableau 1-3 : Propriétés physicochimiques des principaux POP	16
Tableau 1-4 : Différence structurale et folliculaire selon l'espèce utilisée pour les méthodes d'absorption percutanées.....	29
Tableau 1-5 : Comparaison de la composition en lipide de l'épiderme (en % total de lipides).....	29
Tableau 1-6 : Pénétration cutanée des POP selon les espèces	30
Tableau 1-7 : Les différentes méthodes de détection des toxiques	32
Tableau 1-8 : Les différents types de membranes biologiques.....	32
Tableau 1-9 : Pénétration cutanée des OP selon les explants utilisés	35
Tableau 1-10 : Liste des TPC commerciaux et leur preuve d'efficacité.....	36
Tableau 1-11 : Paramètres étudiés dans les tests <i>in vivo</i> chez l'animal.....	39
Tableau 1-12 : Topiques protecteurs cutanés et leur efficacité contre les agents OP	41
Tableau 1-13 : Topiques protecteurs cutanés et leur efficacité contre les agents vésicants	41
Tableau 1-14 : Variation de la demi-vie des agents selon les conditions d'hydrolyse.....	42
Tableau 2-1 : Angles de contact des polymères greffés (10mg/cm ²) à l'huile (4,9µL).....	74
Tableau 2-2 : Analyses élémentaires des composés avant et après greffage.....	76
Tableau 2-3 : Analyses élémentaires des composés avant et après greffage.....	81
Tableau 2-4 : Récapitulatif des synthèses de polymères greffés.	87
Tableau 3-1 : Résultats de la réponse de la MCA à l'application des échantillons testés.....	98
Tableau 3-2 : Ecotoxicité des nanoparticules.....	101
Tableau 4-1 : Liste des ingrédients utilisés pour la formulation et leurs propriétés	114
Tableau 4-2 : Formulation du PSi.	116
Tableau 4-3 : Formulation du PCe.	117
Tableau 4-4 : Formulations à base de mélanges.....	118
Tableau 4-5 : Composition de F1.....	127
Tableau 4-6 : Composition de F2.....	128
Tableau 4-7: Balayage en fréquence (amplitude fixe 1Pa) de F1.....	137
Tableau 4-8 : Balayage en fréquence (amplitude fixe 1Pa) de F2.....	140
Tableau 5-1 : Comparaison de l'efficacité de F1 et sa base	154
Tableau 5-2 : Effet dose de l'efficacité de F1.	155

Tableau 5-3 : Efficacité de MF2 et F2 contre la pénétration du paraoxon.	157
Tableau 5-4 : Effet des nanoparticules et du greffage sur l'efficacité des polymères.	157
Tableau 5-5 : Effet dose de la quantité de nanoparticules de cérine dans la crème sur l'efficacité ..	158
Tableau 5-6 : Effet dose de l'efficacité de F2.	159
Tableau 5-7 : Calcul des quantités de NPs contenues dans le dépôt en fonction des concentrations dans les crèmes et des quantités déposées.	160
Tableau 5-8 : Comparaison de l'efficacité en fonction du type d'intégration des NPs de CeO ₂	161
Tableau 5-9 : Comparaison de l'efficacité des bases	162
Tableau 5-10 : Comparaison de l'efficacité des formules F1 et F2	163
Tableau 5-11 : Efficacité des formules selon le temps d'exposition (15mg/cm ²).	164
Tableau 5-12 : Efficacité des formules en conditions occlusives et non occlusives.....	166
Tableau 5-13 : Evolution de l'efficacité des formules au cours du vieillissement accéléré.	168
Tableau 5-14 : Comparaison des ratios de protection (PR) entre les deux membranes.	168
Tableau 5-15 : Caractéristiques des peaux humaines.	170
Tableau 5-16 : Efficacité des formules sur peaux humaines.....	170
Tableau 5-17 : Comparaison de l'efficacité des nouveaux TPC à des crèmes existantes	172
Tableau 5-18 : Comparaison de l'efficacité des nouveaux TPC à des crèmes existantes	172
Tableau 5-19 : Comparaison de l'efficacité des nouveaux TPC entre les différents modèles	173
Tableau 6-1 : Pénétration de la caféine.	182
Tableau 6-2 : Pénétration du paraoxon.	183
Tableau 6-3 : Facteur de différence entre les RHE et explants.	184
Tableau 6-4 : Effet des mèches sur la pénétration du paraoxon.	186
Tableau 6-5 : Effet des formules sur la perméabilité des RHE EpiSkin.....	189
Tableau 6-6 : Effet des mèches sur la protection des formules.	190

Glossaire

%Q0	Pourcentage de la dose initiale de toxique déposée
Ach	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Acrylate d'éthyle
AF	2,2,2-trifluoroéthyle méthacrylate
AFM	Atomic force microscopy
Ag-7	Anti-gas n°7
AM	Acide méthacrylique
ATS	(3-aminopropyl)triéthoxysilane
aTSP	Active topical skin protectant
ChE	Cholinestérase
CLP	Chlorpromazine
COP	Composé organophosphoré
CV	Coefficient de variation
DCC	N,N-dicyclohexylcarbodiimide
DL50	Dose létale tuant 50% de la population
DM	Dispositif médical
E	Ratio E de l'efficacité
EC50	Concentration efficace médiane (concentration immobilisant 50% de la population de Daphnies dans les tests d'écotoxicité)
ECVAM	European center for the validation of alternative methods
EPI	Equipement de protection individuelle
FD	Facteur de différence
G'	Module de stockage ou composante élastique
G''	Module de perte ou composante visqueuse
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Sarin cyclohexylique
HASE	Hydrophobically Alkali-Soluble Emulsions

HASE-F-RF8	Polymère fluoré sélectionné pour ce projet
HASE-F-RF8/NPs	Polymère greffé avec des nanoparticules (SiO ₂ , CeO ₂ ou TiO ₂)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HD	Ypérite au soufre
HET-CAM	Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane
HN-3	Ypérite à l'azote
IC50	Concentration inhibitrice 50% (concentration tuant 50% de la population cellulaire dans le test NRR)
IR	Infrarouge
J _{max}	Flux maximum
LD	Ligne directrice
MCA	Membrane chorio-allantoidienne
MEB	Microscopie électronique à balayage
MF8	Macromère ou macromonomère
MR	Milieu récepteur
nd	Non détecté
NOP	Neurotoxique organophosphoré
NRR	Test de relargage au rouge neutre (Neutral Red Release)
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OP	Organophosphoré
PCe	Polymère HASE-F-RF8 greffé avec des nanoparticules de cérine
PCe/RF8	Polymère HASE-F-RF8/Ce (PCe) surgreffé avec l'acide fluoré RF8
PEG	Polyéthylène glycol
PEGMM	Polyéthylène glycol méthyl méthacrylate
PFPE	Perfluoropolyéther
PIE	Perte insensible en eau
POP	Pesticide organophosphoré
POX	Paraoxon
PR	Protective ratio ou ratio de protection
PSi	Polymère HASE-F-RF8 greffé avec des nanoparticules de silice
PSi/RF8	Polymère HASE-F-RF8/Si (PSi) surgreffé avec l'acide fluoré RF8
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PTi	Polymère HASE-F-RF8 greffé avec des nanoparticules de titane
PTi/RF8	Polymère HASE-F-RF8/Ti (PTi) surgreffé avec l'acide fluoré RF8

PVP	Polyvinylpyrrolidone
$Q_{\max}$	Dose retrouvée à la fin de l'expérience
RF8	Acide 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoro-undecanoïque
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
SC	<i>Stratum corneum</i> ou couche cornée
SERPACWA	Skin-Exposure Reduction Paste Against Chemical Warfare Agents
SG	<i>Stratum granulosum</i> ou couche granuleuse
SP	Sérum physiologique
$\tan \delta$	Facteur d'amortissement ou de perte
TGD	Soman épaissi
TPC	Topique protecteur cutané
TSP	Topical skin protectant
UE	Union Européenne
VR	VX russe
VX	S-[2-(diisopropylamino)éthyl]méthylphosphonothioate d'O-éthyle
λ	Temps de latence

INTRODUCTION

Les agents chimiques de guerre ou leurs dérivés pesticides sont des molécules toxiques qui provoquent une incapacité temporaire ou des dommages permanents sur les êtres humains et les animaux. Les agriculteurs et militaires sont les plus exposés à ces substances. Les équipements de protection individuelle ont été développés dans le but de protéger l'organisme du contact avec ces produits. Cependant, ces équipements limitent les mouvements des personnels intervenants et ne sont pas efficaces à 100%. C'est pourquoi des dispositifs protecteurs comme les crèmes barrières ou topiques protecteurs cutanés ont été développés en complément. Ces topiques protecteurs cutanés sont des formules qui confèrent une barrière entre la peau et le toxique. Ils doivent respecter certaines conditions : être faciles d'utilisation, résistants à l'environnement extérieur, ne pas gêner l'utilisateur et être tolérés. La première génération de topiques protecteurs se compose de polymères perfluorés conférant une protection efficace contre la pénétration des agents chimiques de guerre. Une deuxième génération de topique a ensuite vu le jour, les aTSP pour « active Topical Skin Protectant » dans lesquels ont été incorporées des molécules organiques ou inorganiques actives en vue d'associer protection et décontamination pour réduire le temps d'action dans le cas d'une contamination. Des actifs très prometteurs comme les nanoparticules ont déjà été intégrés dans des aTSP en raison de leur capacité d'adsorption et/ou dégradation des agents chimiques.

Une approche récemment développée au laboratoire a été l'association covalente de nanoparticules avec des polymères perfluorés de type HASE (Hydrophobically Alkali-Soluble Emulsions). Cette association prometteuse permet d'allier à la fois les propriétés de répulsion (faible mouillabilité) des polymères perfluorés et les propriétés d'absorption et/ou de dégradation des nanoparticules. Egalement, le greffage covalent des nanoparticules à des macromolécules permet de diminuer l'impact écologique des nanoparticules. Enfin, l'utilisation de polymères perfluorés HASE permet de conserver la surface active des objets nanométriques en les dispersant de manière homogène et individuelle. En effet, les polymères HASE sont des polymères modificateurs de rhéologie, ils possèdent des chaînes longues hydrophobes et des fonctions acides. En milieu neutre ou basique, les fonctions acides sont ionisées et induisent des répulsions électrostatiques entre les chaînes de polymère. De plus, les longues chaînes hydrocarbonées ou fluorées créent des interactions hydrophobes. L'ensemble provoque le déploiement des chaînes de polymères dans l'eau et une augmentation du volume hydrodynamique. Ces phénomènes permettent la formation d'un réseau structuré ou gel tridimensionnel qui déploie les nanoparticules dans le solvant.

Ces nouveaux composés ont montré une efficacité contre la pénétration du paraoxon (un pesticide modèle). Cependant, ils ne sont pas utilisables tels quels. En effet, les dépôts de solutions de polymères-nanoparticules ne sont pas filmogènes ce qui impacte donc l'homogénéité des dépôts

en surface et la reproductibilité des résultats d'efficacité. Il est donc nécessaire d'intégrer ces nanocomposites dans des formules stables permettant une dispersion homogène des nanoparticules et des dépôts filmogènes en surface. Afin de valider ces nouvelles formules et les progrès qu'elles permettent d'obtenir en termes de protection, des tests d'efficacité doivent être réalisés. Les tests d'efficacité peuvent être des tests *in vivo* ou *in vitro*. Dans les deux cas, le modèle le plus utilisé est le porc pour sa similarité avec la peau humaine. Les tests biologiques s'inscrivent en général dans une démarche respectant la règle des « 3R » (reduce, refine, replace) visant à limiter l'utilisation des animaux et à développer des modèles alternatifs pertinents *in vitro*. Ces derniers objectifs constituent les points clés de cette thèse.

Dans le **premier chapitre**, un état de l'art sur les agents chimiques de guerre, leur moyen de pénétration, les topiques protecteurs cutanés et les méthodes *in vivo* et *in vitro* utilisées pour mesurer la pénétration et l'efficacité des crèmes candidates permettra d'introduire la problématique des agents toxiques à la fois dans les domaines civils et militaires et l'intérêt du développement de nouvelles formules protectrices à base de nanoparticules greffées à des polymères HASE fluorés.

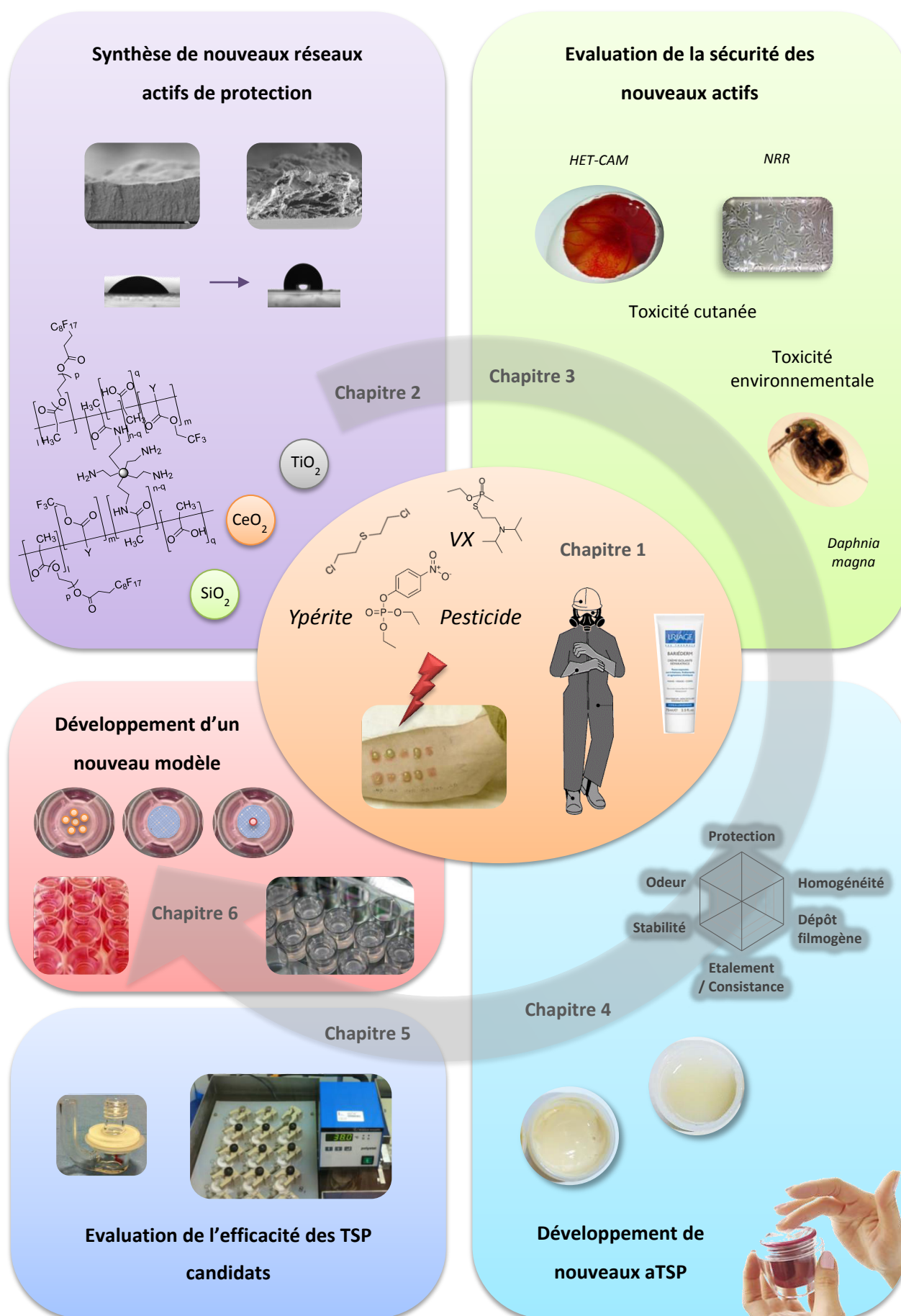
Dans le but d'une production industrielle, la synthèse de ces polymères doit être optimisée. Egalement, les propriétés de répulsion des polymères semblent jouer un rôle important dans l'efficacité des topiques, il serait intéressant de modifier ces polymères pour en augmenter leur oléophobie. Ces étapes seront développées dans le **chapitre 2**.

En vue d'une utilisation par des civils ou des militaires et d'une application à plus large échelle (développement cosmétique) la compatibilité entre ces nanocomposites innovants et la peau humaine doit être validée. De plus, par anticipation d'un éventuel rejet dans l'environnement, l'étude écotoxique de ces nouveaux composés doit être évaluée. Ces études sont réalisées dans le **chapitre 3**.

Ces polymères ont ensuite été introduits dans des formulations afin de former des dépôts filmogènes et donc une barrière efficace contre la pénétration du paraoxon. La sélection des formules efficaces et leurs études de surface et de stabilité sont développées dans le **chapitre 4**. Le **chapitre 5** constitue ensuite une étude détaillée des formules les plus efficaces.

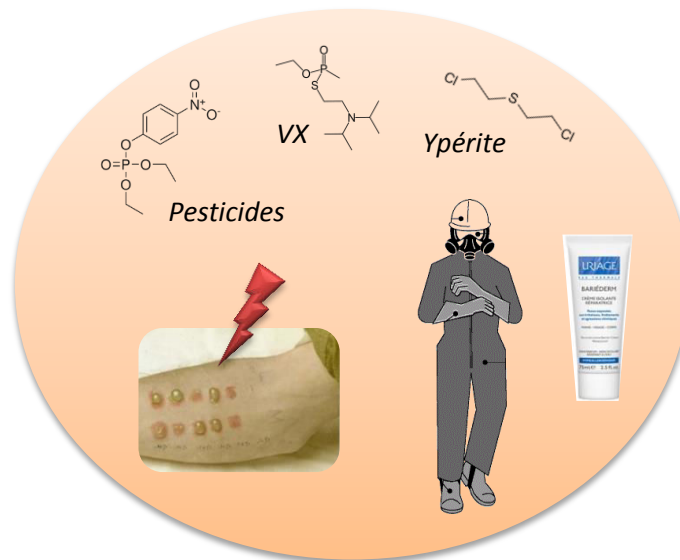
De plus, au cours de cette thèse j'ai pu expérimenter de près la difficulté de l'accès aux explants de peaux de cochon (nécessite un certain savoir-faire et du matériel spécifique) et humaines (le peu de donneur disponible rend la production faible, longue et très couteuse). En vue de valider l'efficacité protectrice des nouvelles crèmes candidates sur des modèles représentatifs de la peau humaine, disponibles et faciles à mettre en œuvre, un nouveau modèle d'efficacité utilisant des épidermes humains reconstruits a été développé et constitue le **chapitre 6**.

Le schéma synoptique suivant permet de visualiser l'ensemble de ce manuscrit.



CHAPITRE 1

Etat de l'art sur les topiques protecteurs cutanés vis-à-vis d'agents chimiques de guerre et leurs méthodes d'évaluation



I. LES AGENTS CHIMIQUES DE GUERRE

Un produit chimique toxique est défini comme : « tout produit chimique qui, par son action chimique sur des processus biologiques, peut provoquer chez les êtres humains ou les animaux la mort, une incapacité temporaire ou des dommages permanents. Cela comprend tous les produits chimiques de ce type, quels qu'en soient l'origine ou le mode de fabrication, qu'ils soient obtenus dans des installations, dans des munitions ou ailleurs »¹.

Une arme chimique est de ce fait un produit chimique toxique destiné à être utilisé en tant que « munition et dispositif spécifiquement conçu pour provoquer la mort ou d'autres dommages » dans les camps adverses¹.

1.1. HISTORIQUE

L'utilisation d'armes chimiques remonte à l'Antiquité^{2,3} bien que le terme « arme chimique » ne convienne qu'aux molécules chimiques d'après 1925. L'emploi de fumée ou l'empoisonnement des cours d'eau et des puits pouvaient déjà à cette époque changer le cours des guerres. C'est ainsi que durant la guerre de la ligue Amphictyonique contre la cité de Crissa près de Delphes (VII^{ème} siècle avant Jésus-Christ (JC)) l'empoisonnement des eaux du Pleistos avec des racines d'ellébore en raison de leurs effets purgatifs a permis la prise de la cité. De nombreuses tentatives de déstabilisation à l'aide de fumées sulfureuses et suffocantes ont été réalisées. Certaines fonctionnèrent (siège d'Ambrasie 187 avant JC, Kallinikos et son feu Grégeois 673 (Figure 1-1), etc.) et d'autres échouèrent en raison des conditions climatiques non prévues (guerre du Péloponnèse 428-424 avant JC).

Au cours du Moyen-Âge, de nombreuses bombes et gaz à partir d'arsenic, de mercure, de soufre, etc. alliés à des plantes toxiques ont été utilisés à la fois contre les ennemis mais également contre les populations civiles elles-mêmes (guerre de Trente ans).



Figure 1-1 : Dessin ancien illustrant l'utilisation de bombes suffocantes pour l'abordage de navires par les marins.²

Au cours des guerres du XIX^{ème}, malgré quelques tentatives d'utilisation, l'emploi d'armes chimiques relevait plus de l'utopie, la plupart des tentatives de recherches furent repoussées et interdites par les dirigeants.

C'est au début du XX^{ème} siècle que leur emploi fut considéré comme potentiellement efficace. De nombreux dérivés chlorés, bromés et soufrés ayant des effets lacrymogènes et suffocants furent mis au point par les Allemands, suivis des Anglais puis des Français durant la Première Guerre Mondiale (Figure 1-2). Tout d'abord critiqués en raison de leur instabilité, de leur mise en œuvre mais également de leur dépendance par rapport aux conditions climatiques comme la température ou le vent, ils furent rapidement améliorés et complétés par de meilleurs moyens de dispersion. L'année 1917 marque un tournant de l'histoire des armes chimiques avec l'apparition de nouvelles molécules bien plus agressives comme l'Ypérite. S'ensuit alors un véritable engouement et une recherche active sur ces nouveaux produits chimiques. Des molécules attaquant directement le système nerveux telles que le sarin, le tabun ou encore le soman furent mises au point. Après la Seconde Guerre Mondiale, une nouvelle catégorie d'agent développée tout d'abord par les Anglais vit le jour : les agents neurotoxiques V, bien plus stables et plus toxiques que le sarin dont le plus connu est le VX (la version américaine).



Figure 1-2 : Photos d'attaques au cours de la Première guerre mondiale par des gaz de chlore par les Anglais (Loos, 1915, A), de lacrymogènes (B) et de phosgènes (Carnoy 1916, C) par les Allemands.²

1.2. REGLEMENTATION

L'utilisation d'armes chimiques quelle qu'elle soit a toujours été vivement critiquée par l'opinion publique. Déjà en 1675 un traité signé entre l'Allemagne et la France interdisait l'utilisation de balles empoisonnées. En 1874, la Convention de Bruxelles interdisait l'emploi de poison ou d'armes empoisonnées. En 1899, cet accord fut complété au cours de la première conférence internationale de la paix à La Haye par l'interdiction de l'emploi de projectiles chargés de gaz toxique. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, ces accords n'ont malheureusement pas empêché l'utilisation massive de ces armes chimiques⁴. C'est ainsi qu'après la Première Guerre Mondiale, s'ouvre à Genève sous l'égide de la Société des Nations (qui deviendra plus tard l'Organisation des

Nations Unis) une conférence qui aboutit en juin 1925 au Protocole de Genève⁵ prohibant l'emploi à la guerre de gaz asphyxiants, toxiques ou similaires et de moyens bactériologiques. Cependant, ce dernier ne constituait qu'un engagement moral des signataires à ne plus utiliser les armes chimiques et biologiques. Il fallut attendre le milieu de la guerre froide, pour que l'évolution des mentalités et la réelle menace des armes chimiques, dite de destruction massive, ne fassent réagir les gouvernements et aboutissent en 1993 à la signature de la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimique (CIAC) à Paris¹. Le 14 janvier 1993, 117 pays signent déjà la Convention, suivis dans les années suivantes par 51 autres pays ; depuis les années 2000, 22 pays comme le Liban et l'Iraq et pour finir la Syrie viennent compléter la liste des membres de la Convention. De nos jours, seuls 4 pays n'ont pas signé la convention : le Soudan du Sud, l'Angola, l'Égypte et la Corée du Nord. Cette convention est bien plus complète que les précédents traités et accords car elle interdit à la fois **l'utilisation, la mise au point, la fabrication, l'acquisition, le stockage ou le transfert d'armes chimiques mais oblige également leur destruction et le démantèlement des usines de production.**

La question des armes chimiques semble donc résolue même s'il reste quelques points à régler comme :

- le respect et la ratification de la convention dans les pays signataires (par exemple l'état d'Israël a signé la convention en 1993 et ne l'a toujours pas ratifié)
- il faut ensuite répertorier et récupérer les stocks d'armes chimiques. Cela reste facilement réalisable en ce qui concerne des productions à des fins militaires mais il devient plus difficile de détecter une production clandestine à des fins terroristes. Les attaques terroristes de la secte Aum Shinrikyo de 1994 (Matsumo)⁶ et 1995 (métro de Tokyo)⁷ confirment les craintes de l'utilisation terroriste de ces armes.
- enfin le démantèlement et la destruction des armes restent compliqués. Le premier obus datant de la Première Guerre Mondiale fut détruit de manière sécurisée et sans danger pour l'environnement en France en 2005⁸. En effet, bien que le projet ait été confié à la Direction Générale de L'Armement (DGA) en 1997, la création d'une installation spécialisée et sécurisée appelée SECOIA (Site d'Élimination des Chargements d'Objets Identifiés Anciens) pour le démantèlement ou la destruction de ces armes est longue et coûteuse (budget estimé à 100 millions d'euros). De plus dans ce cadre, même en dehors du champ de bataille ou d'attaques terroristes, le risque lié à l'exposition de telles substances reste élevé pour les manipulateurs.

Depuis quelques années se pose également un autre problème lié à des dérivés de ces armes chimiques : les pesticides. Ces molécules sont synthétisées à des fins agroalimentaires pour protéger les récoltes des insectes ou d'autres invasifs. Cependant, avec l'arrivée des pesticides de nombreuses

maladies sont apparues directement liées à leur utilisation (comme par exemple des cancers et des désordres neurologiques qui font des pesticides des substances CMR ou potentiellement CMR (pour les nouvelles molécules)⁹. L'exposition peut être directe (ingestion, inhalation, contact cutané)⁹⁻¹¹ ou indirecte (résidus contenus dans les aliments)¹¹, ainsi l'utilisation des pesticides pose un véritable problème de santé publique^{10,11}. Ceux-ci sont d'ailleurs fortement réglementés en Europe¹² et leur liste positive est disponible sur le site du Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire¹³.

1.3. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES ET TOXIQUES DES AGENTS CHIMIQUES

Les armes chimiques se différencient en deux grandes catégories : les agents vésicants, ce sont les plus anciens, ils ont été mis au point pour la plupart avant ou au cours de la Première guerre mondiale ; et les agents neurotoxiques, plus récents, découverts peu avant la Seconde guerre mondiale qui ont été rapidement utilisés comme armes chimiques mais également développés en tant que pesticides. Outre ces agents, d'autres molécules comme les agents neutralisants (gaz lacrymogènes) ou hémotoxiques (à base de cyanure) existent. Ici ne seront développés que les agents vésicants et neurotoxiques militaires et pesticides civils.

1.1.1. Les agents vésicants

Le plus connu des agents vésicants est le gaz moutarde ou Ypérite (utilisé pour la première fois dans la région d'Ypres en Allemagne en 1917). Cette Ypérite au soufre possédant l'odeur caractéristique de la moutarde (d'où son nom) a été dérivée en Ypérite à l'azote ayant l'avantage d'être inodore à l'état pur. D'autres agents vésicants comme la Lewisite et l'oxime phosgène furent synthétisés mais jamais utilisés en tant que tels sur un champ de bataille et ne seront pas développés ici. Les propriétés physicochimiques des Ypérites sont décrites dans le Tableau 1-1.

Le gaz moutarde tout comme l'Ypérite à l'azote attaque tous les tissus avec lesquels ils rentrent en contact. Les pulvérisations ou aérosols ont été la manière la plus répandue de diffuser ces agents chimiques. Par contact oculaire, les premiers signes toxiques d'une contamination au gaz moutarde sont l'apparition de photophobie, d'irritations et de blépharospasmes (contraction involontaire et répété des paupières). Par contact avec les voies respiratoires, des œdèmes et ulcérations pulmonaires sont à redouter. Enfin, par voie cutanée, l'apparition de cloques et de graves brûlures seront les premiers symptômes (Figure 1-3). Dans l'ensemble, la cause de ces symptômes vient de la nécrose et du décollement des tissus épithéliaux induite par les Ypérites.^{14,15}

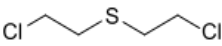
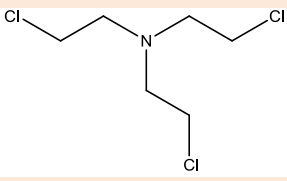


Figure 1-3 : Tests de brulure au gaz moutarde sur l'avant-bras d'un soldat.

Photographie du National Museum of Health and Medecin.¹⁶

De plus, en raison de leur lipophilie ils ont une grande capacité de pénétration et sont très persistants. Ils passent tous les types de tissus et même le caoutchouc et sont volatiles, il est donc nécessaire de se protéger avec des équipements adéquats. Ils peuvent donc également rapidement traverser les tissus épithéliaux, se retrouver dans le sang et induire des effets toxiques systémiques se traduisant par des nausées, vomissements, fièvre ou malaises.^{14,15}

Tableau 1-1 : Propriétés physicochimiques et toxicité des Ypérites.^{14,15}

Propriétés	Ypérite au soufre (HD ou gaz moutarde)	Ypérite à l'azote (HN-3)
Numéro CAS	505-60-2	555-77-1
Formule chimique	$S(CH_2-CH_2-Cl)_2$	$N(CH_2-CH_2-Cl)_3$
Structure		
Masse moléculaire	159 g.mol ⁻¹	204 g.mol ⁻¹
Etat physique (25°C)	Liquide huileux incolore ou jaunâtre	Liquide huileux incolore à jaune brunâtre
Odeur	Odeur de moutarde	Inodore à l'état pur à odeur de poisson ou savon si impure
Pression de vapeur (25°C)	0,11 mmHg	0,01 mmHg
Solubilité	partiellement soluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques	faible dans l'eau, soluble dans les solvants organiques
DL50 percutanée liquide	1400 mg/70kg	1400 mg/70kg
DL50 percutanée vapeur	10 000 mg.min.m ³	10 000 mg.min.m ³

La toxicité de ces agents dépend de l'humidité relative et de la température, plus il fait chaud et humide plus les Ypérites seront toxiques car elles pénétreront mieux dans l'organisme (en augmentant la température d'environ 10°C pour une humidité relative de 46-48%, la pénétration est presque doublée : de 0.18 à 0.3mg/cm²/min)¹⁴. Les effets à long terme suite à des expositions aiguës (étude sur des vétérans de guerre et des animaux) sont de l'immunodéficience favorisant les infections secondaires et certains effets génotoxiques, mutagènes et carcinogènes. Suite à une exposition cutanée longue chez le rat (exposition aigue de 0,1mg/m³ pendant 6,5h puis 2,5µg/m³ pendant les semaines suivantes) des tumeurs cutanées ont été diagnostiquées.^{14,15}

Le mécanisme d'action du gaz moutarde (et plus généralement les Ypérites à l'azote) n'est pas encore totalement connu. Leur effet alkylant, c'est à dire qu'ils vont ajouter des groupements alkyles aux molécules auxquelles ils se lient a été démontré. Leurs principales cibles sont l'ADN, la glutathionne et les thiols. En se liant à l'ADN ils provoquent des mutations et aberrations chromosomiques induisant des effets génotoxiques, mutagènes et carcinogènes¹⁴. La déplétion en thiols provoque une augmentation du calcium intracellulaire conduisant principalement à l'apoptose des cellules. La déplétion en glutathionne induit la libération d'espèces réactives de l'oxygène et la peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Les enzymes sont relarguées dans le cytosol ce qui induit également un apoptose cellulaire¹⁴. L'ensemble aboutissant macroscopiquement à une grande inflammation des tissus.

1.1.2. Les composés organophosphorés (COPs)

Les COP se décrivent en tant que neurotoxiques organophosphorés (fin militaire) (NOPs) et pesticides organophosphorés (fin civile) (POPs).

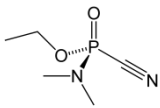
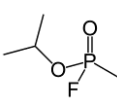
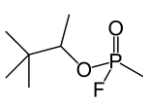
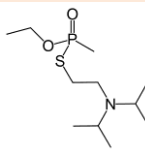
- Les neurotoxiques organophosphorés

Les NOPs se distinguent en deux catégories : les agents G (tabun (GA), sarin (GB) et soman (GD)), fortement volatils dont les deux voies principales de contact sont l'inhalation et le contact cutané ; et les agents V, toxiques surtout par voie cutanée car peu volatils dont le plus connu est le VX. Les expositions à ces agents ont principalement eu lieu sur le champ de bataille ou dans le cas d'attaques terroristes (sarin).^{6,7} Les propriétés physicochimiques des NOPs sont décrites dans le Tableau 1-2.

Les symptômes d'une intoxication aiguë aux NOPs sont les suivants : sécrétions excessives pulmonaires, salivaires, oculaires et intestinales, forte transpiration, myosis, spasmes bronchiques, troubles moteurs gastro-intestinaux, bradycardie, fasciculations musculaires (trouble musculaire

involontaire), spasmes, faiblesse, paralysie, perte de conscience, convulsions, dépression du système respiratoire central jusqu'à la mort de l'individu.^{17,18}

Tableau 1-2 : Propriétés physicochimiques et toxicité des principaux NOPs.^{15,17}

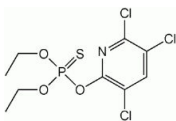
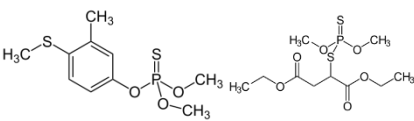
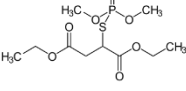
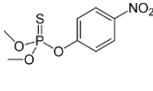
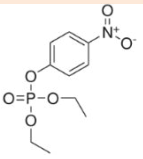
Propriétés	Tabun (GA)	Sarin (GB)	Soman (GD)	VX
Numéro CAS	77-81-6	107-44-8	96-64-0	50782-69-9
Formule chimique	$C_5H_{11}N_2O_2P$	$C_4H_{10}FO_2P$	$C_7H_{16}FO_2P$	$C_{11}H_{26}NO_2PS$
Structure				
Masse moléculaire	162 g.mol ⁻¹	140 g.mol ⁻¹	182 g.mol ⁻¹	267 g.mol ⁻¹
Etat physique (25°C)	Liquide incolore à marron	Liquide incolore	Liquide incolore	Liquide incolore
Odeur	Faiblement fruitée (amande amère) à inodore	Inodore	Odeur fruitée	Inodore
Solubilité dans l'eau	72 g.L ⁻¹ à 25°C	Miscible	20,9 g.L ⁻¹ à 25°C	29,9 g.L ⁻¹ à 25°C
Pression de vapeur (25°C)	5,70.10 ⁻² mmHg	2,48 mmHg	0,4 mmHg	8,78.10 ⁻⁴ mmHg
Volatilité (mg.m³)	5,0.10 ⁻²	1,9.10 ⁴	3,9.10 ³	nulle
DL₅₀ percutanée liquide	1500 mg/70kg	1700 mg/70kg	350 mg/70kg	5 mg/70kg
DL₅₀ percutanée vapeur	15000 mg.min.m ³	12000 mg.min.m ³	3000 mg.min.m ³	150 mg.min.m ³

- Les pesticides organophosphorés

Les POPs ont été développés en même temps que la recherche sur les nouveaux NOPs vers le milieu de la Guerre froide. Ceux-ci ont vu leur essor en pleine expansion du fait de l'interdiction de certains pesticides organochlorés comme le DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane) lipophile, hautement bioaccumulable et toxique pour la faune, la flore et même la santé humaine¹⁹. Les plus connus sont le Chlorpyrifos, le Fenthion, le Malathion ainsi que le Parathion et son métabolite le Paraoxon¹⁰. Leur degré de toxicité est également lié à la composition de leur formulation qui peut augmenter la toxicité intrinsèque de la molécule. Ces agents sont toxiques par inhalation et contact cutané mais également fortement toxiques par ingestion (prise volontaire). Les propriétés physicochimiques des principaux POPs sont décrites dans le Tableau 1-3.

Les premiers symptômes d'une intoxication aux POPs sont des troubles respiratoires, oculaires, vomissements, malaises. Ces substances classées comme CMR peuvent également provoquer des cancers et même la mort de l'individu dans des cas extrêmes d'exposition (protection insuffisante de l'individu, intoxication volontaire, surexposition, etc.).

Tableau 1-3 : Propriétés physicochimiques des principaux POPs.^{18,20}

Propriétés	Chlorpyrifos	Fenthion	Malathion	Parathion	Paraoxon (POX)
Numéro CAS	2921-88-2	55-38-9	121-75-5	56-38-2	311-45-5
Formule chimique	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	$C_{10}H_{14}NO_6P$
Structure					
Masse moléculaire	351 g.mol ⁻¹	278 g.mol ⁻¹	330 g.mol ⁻¹	291 g.mol ⁻¹	275 g.mol ⁻¹
Etat physique (25°C)	solide cristallin de couleur ambre	liquide huileux incolore	liquide transparent marron jaune	liquide huileux jaune pâle	liquide huileux jaune pâle
Odeur	acre et pénétrante	ail	ail	~ phénol	faible odeur
Densité liquide	mg/L à 20°C	1.25mg/L à 20°C	1,23 mg/L à 20°C	1,26 mg/L à 20°C	1,27 mg/L à 20°C
Solubilité dans l'eau	2 g.L ⁻¹ à 25°C	0.055g.L ⁻¹ à 20°C	0,145 g.L ⁻¹ à 25°C	0,02 g.L ⁻¹ à 25°C	2,4 g.L ⁻¹ à 25°C
Pression de vapeur	7,6.10 ⁻⁶ mmHg à 20°C	négligeable	4.10 ⁻⁵ mmHg à 20°C	3,8.10 ⁻⁵ mmHg à 20°C	1,1.10 ⁻⁶ mmHg à 20°C
Log K _{ow}	4.7	-	2,36	3,83	1,98
DL ₅₀ oral (rat)	941 mg/kg	255 mg/kg	885 mg/kg	3mg/kg	-
DL ₅₀ percutanée (lapin)	-	330 mg/kg	4 g/kg	6.8 mg/kg	-
Autorisation	autorisé dans la composition de formulation spécifiques, pas d'épandage possible	interdit depuis 2004 en Europe	interdit depuis 2008 en Europe	interdit depuis 2003 en Europe	interdit depuis 2003 en Europe

- Mécanisme d'action des COP

Le mécanisme d'action des NOPs et POPs est le même : ils phosphorylent et inhibent les cholinestérases (ChE) (Figure 1-4).

Ces enzymes sont responsables au niveau des synapses et jonctions neuromusculaires du clivage de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine (ACh) afin de permettre leur recyclage et un retour à l'état de repos du neurone présynaptique. Ainsi l'accumulation de neurotransmetteur bloque le système nerveux central ou périphérique selon la voie d'exposition dans un état excité, la conduction nerveuse ne pouvant plus se faire. Les COPs peuvent aussi agir sur les ChE présentes dans les globules rouges de la circulation sanguine, cependant il n'y a de corrélation entre effet toxique et action systémique qu'à hauteur d'un taux d'inhibition de 80%. D'autres enzymes de détoxification comme les carboxylesterases et A-esterases peuvent être inhibées.^{10,17}

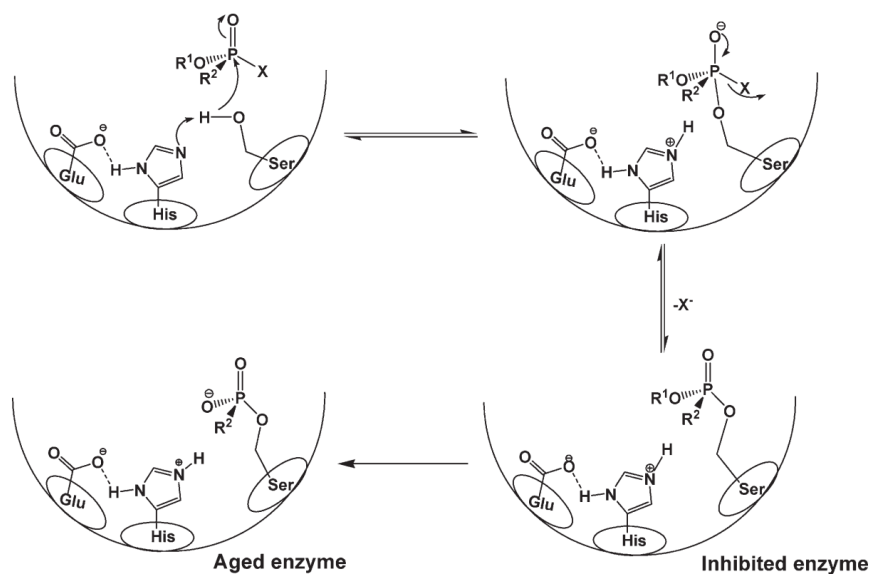


Figure 1-4 : Mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les OP.²¹

La toxicité des COP dépend essentiellement de la voie d'exposition (contact cutané, inhalation ou ingestion) du type d'exposition (aigüe ou chronique) mais également du degré de toxicité intrinsèque des agents. Les NOPs visent les ChE humaines tandis que les POPs ont pour cible des ChE spécifiques aux organismes nuisibles pour l'homme et les cultures agricoles (insectes, plantes, champignons, etc.). Cependant, des inhibitions non spécifiques entre ces POPs et les ChE humaines sont responsables de graves effets secondaires^{9,11}. Par contact cutané il est à noter que leur degré de toxicité est directement lié à leur capacité à pénétrer la barrière cutanée. La pénétration du VX par rapport à celle du paraoxon est 530 fois plus élevée sur peau d'oreille de cochon excisée (flux maximal de pénétration respectif : $5,3 \pm 1\%Q_0/h$ vs $0,01 \pm 0,01\%Q_0/h$)^{22,23} et 5-6 fois plus élevée sur peau abdominale humaine excisée^{22,24} (flux maximal de pénétration respectif : $0,5 \pm 0,3\%Q_0/h$ vs $0,09 \pm 0,01\%Q_0/h$). Le VX pénétrant plus facilement la barrière cutanée est bien plus toxique que le POX par contact cutané.

II. LA PENETRATION PERCUTANEE

Parmi les voies d'exposition aux agents chimiques de guerre et pesticides, une des principales voies d'entrée est le contact cutané. La peau est une enveloppe protectrice permettant la séparation entre les organes (l'intérieur) et les agressions environnementales (l'extérieur). Sa perméabilité à un agent toxique est dépendante de son anatomie, de sa fonction barrière, de ses paramètres intrinsèques et des paramètres physicochimiques de la molécule. Lorsque l'on veut étudier une molécule toxique par contact cutané on étudie donc sa capacité à pénétrer la barrière cutanée.

2.1. LA PEAU : STRUCTURE ET PRINCIPALES FONCTIONS

La peau est un organe important d'environ 2m² pour un homme de 70kg et correspond à environ 15-20% de sa masse corporelle. En perpétuelle interaction avec l'environnement, elle fait office de barrière physique entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme. Bien que semi-perméable, elle permet de contenir les fluides corporels comme le sang et la lymphe et limite la perte en eau de l'organisme. Elle est composée de 3 couches distinctes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1-5). Brièvement, l'**épiderme** et particulièrement sa première couche le *stratum corneum* (SC) (Figure 1-6) confère sa fonction barrière à la peau contre les agressions environnementales (physiques, chimiques, pathogènes ou photobiologiques). Le **derme**, tissu conjonctif nourricier sert de support aux vaisseaux sanguins et nerfs. Il forme l'essentiel de l'épaisseur cutanée et héberge de petits organes autonomes que sont les annexes de la peau (poils, glandes, etc) permettant la thermorégulation de l'organisme. Le derme est composé d'une charpente de fibres d'élastine, de collagène et de réticuline lui conférant ses propriétés biomécaniques, élastiques et de résistance. Les fibres baignent dans une substance fondamentale et du gel colloïdal amorphe. Les fibroblastes sont responsables de la production de collagène et de substance fondamentale. La cohésion entre derme et épiderme est assurée par la membrane basale, feutrage de collagène IV lié aux kératinocytes épidermiques par des hémidesmosomes. L'**hypoderme** contient les adipocytes mais également des vaisseaux sanguins et des nerfs. Les adipocytes jouent le rôle d'isolant thermique et mécanique ainsi que de réserve énergétique.²⁵

Outre sa principale fonction barrière, ses propriétés biomécaniques, élastiques et de résistance, sa fonction de thermorégulation, la peau a également un rôle immunitaire avec les cellules dendritiques de Langerhans (épiderme, Figure 1-6), ossidificateur et androgénique puisqu'elle est le siège de production de vitamine D nécessaire à l'absorption de calcium dans les intestins et de la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone active.

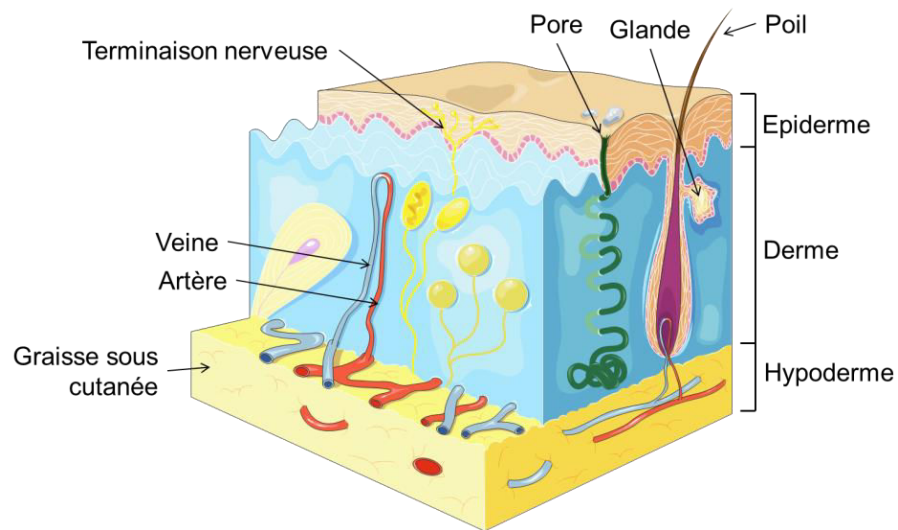


Figure 1-5 : Représentation schématique des couches cutanées (schéma modifié de Servier Medical Art²⁶)

2.2. L'ÉPIDERME : STRUCTURE ET FONCTION BARRIÈRE

L'épiderme est un épithélium de revêtement pavimenteux (les cellules de sa couche superficielle sont plates), pluristratifié et complètement avasculaire. Il protège le derme qui bien que résistant mécaniquement est hydrophile et n'a pas de fonction barrière. Il est composé de 4 couches jointives (Figure 1-6) dont l'épaisseur varie selon le site anatomique : de 0,6mm environ au niveau des mains, il peut atteindre 1,2mm sur la plante des pieds ou n'être que de 0,05-0,08mm au niveau du visage. La première couche la plus à l'extérieure forme la couche cornée (épiderme mort ou stratum corneum) et les trois couches plus profondes l'épiderme vivant. Au niveau de la plante des pieds et la paume des mains une couche supplémentaire, la couche claire, est présente entre l'épiderme vivant et la couche cornée.^{25,27,28}

L'épiderme est constitué en grande majorité de **kératinocytes** (80% de la population cellulaire) (Figure 1-6). Ces cellules sont produites à partir de la couche la plus profonde de l'épiderme (la couche basale) et migrent vers la surface. Au cours de cette migration, les kératinocytes se différencient, perdent ensuite leur capacité de division puis vont mourir au niveau de la couche cornée sous forme de cellules anucléées se desquamant appelées **cornéocytes**. Leur cycle de migration de la lame basale vers la couche cornée dure entre 5 et 30 jours selon le site anatomique. Au contraire, la différenciation terminale des kératinocytes en cornéocytes est très courte (24h) ce qui permet une réparation rapide des dommages superficiels causés à l'épiderme. L'épiderme contient également les mélanocytes, cellules dendritiques responsables de la synthèse de mélanines

conférant des propriétés de photoprotection à la peau ; les cellules de Langerhans (fonction immunitaire) et les cellules de Merkel (propriétés sensorielles).^{25,27,28}

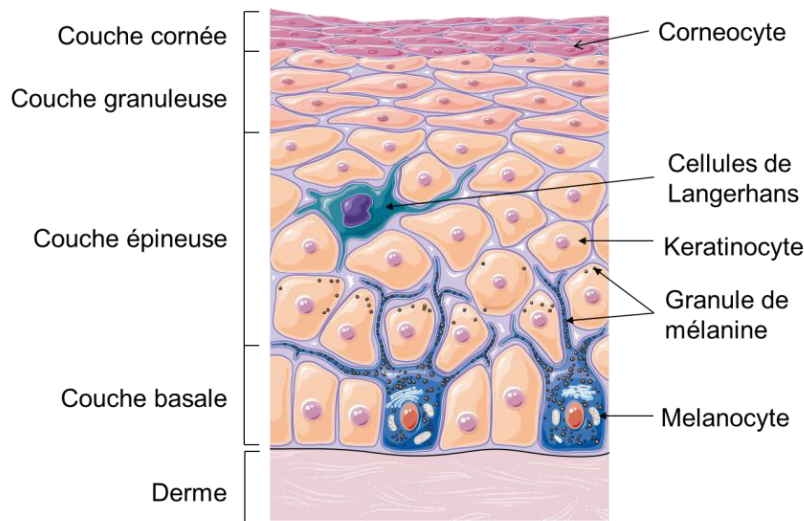


Figure 1-6 : Représentation schématique des couches épidermiques (schéma modifié de Servier Medical Art²⁶)

La fonction barrière de la peau est principalement conférée par la **couche cornée** et particulièrement la couche compacte située en dessous de la couche desquamante (la plus externe), qui comme son nom l'indique est le lieu où les cornéocytes se détachent de la peau et qui permettent le renouvellement de l'épiderme.

La couche cornée peut être comparée à un mur de briques que sont les **cornéocytes** et dont le mortier est la **matrice lipidique extracellulaire** assurant l'imperméabilité de l'épiderme (Figure 1-6). Cette matrice de lipide est composée essentiellement de céramides, d'acides gras libres et de cholestérol. Son arrangement en bicouches lipidiques orientées permet de créer un filtre hydrophobe très serré. Elle est synthétisée dans les sous-couches épidermiques par les kératinocytes dans les corps lamellaires d'Odland, et libérée dans l'espace intercellulaire lors de la mort des kératinocytes à l'interface des couches granuleuses et cornées. Les cornéocytes, contenant eux essentiellement une protéine, la kératine, protéine très résistante plutôt hydrophile qui permet une résistance aux agents chimiques.

Sur la couche cornée se trouve le **film hydrolipidique** issu de la kératinisation épidermique (desquamation des cornéocytes) qui peut se comparer à une émulsion eau dans huile. La phase aqueuse contient diverses substances minérales (sels et ions) ou organiques (urée, acides aminées et métabolites du glucose) et est responsable du pH acide de la peau (pH 5-6). La phase lipidique est le sébum contenant principalement des triglycérides, des cires et squalènes. Ce film hydrolipidique de

par son acidité et sa composition en lipide confère à la fois une protection contre la pénétration de substances exogènes et la croissance de germes pathogènes et permet également de limiter la perte en eau de l'épiderme.^{25,27,28}

2.3. L'ABSORPTION PERCUTANEE

Avant qu'une molécule ne rentre dans l'organisme et induisent des effets toxiques, il faut donc qu'elle passe la barrière cutanée (principalement la couche cornée et secondairement le film hydrolipidique).

2.3.1. Mécanisme de l'absorption percutanée

L'absorption percutanée concerne l'absorption de substances exogènes au travers de l'épiderme jusque dans le plasma. C'est un phénomène de diffusion passive qui s'exerce au niveau de chacune des couches de la peau (Figure 1-7).

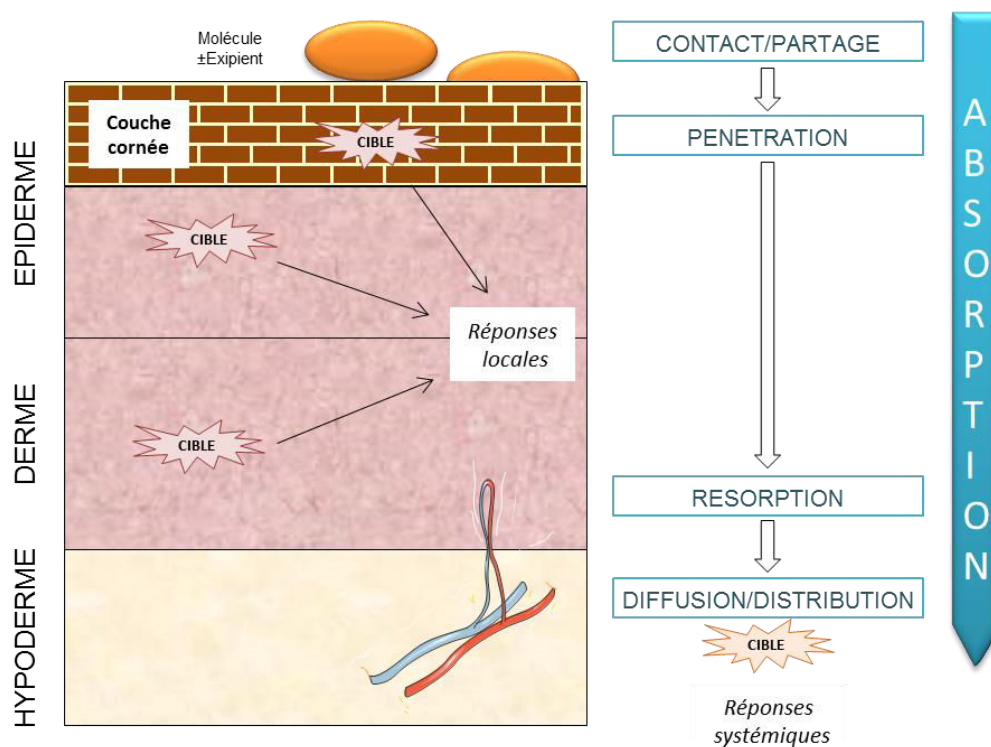


Figure 1-7 : L'absorption cutanée.

Elle se divise en trois étapes²⁹ :

- 1- La molécule doit d'abord quitter son excipient et se disperser dans le film hydrolipidique ou sur la couche cornée, c'est la phase de contact. La pénétration du produit est facilitée en fonction du partage au niveau de l'interface substance/couche cornée lié à la nature physicochimique de la molécule (hydrophilie/lipophilie).
- 2- Elle doit ensuite traverser la couche cornée, c'est la phase de pénétration ou diffusion. Elle diffuse ensuite dans toute les couche l'épiderme vivant, le derme et les annexes au cours de laquelle il peut y avoir stockage ou transformation métabolique (appelé biotransformation cutanée). Cette phase est l'étape la plus lente et limitante.
- 3- Au niveau du derme, les molécules entrent en contact avec le système vasculaire capillaire ou lymphatique et peuvent emprunter la voie systémique, c'est la phase de résorption ou continuer également à pénétrer l'hypoderme et les tissus sous-cutanés.

Chaque étape se caractérise par une vitesse propre dépendante des caractéristiques physicochimiques de la molécule/excipient des tissus cutanés, la vitesse du processus global dépendant surtout de l'étape la plus lente et limitante à savoir la phase de pénétration à travers la couche cornée.

2.3.2. Les voies de passage de l'absorption percutanée

La diffusion des molécules de l'extérieur vers l'intérieur de l'épiderme au travers de la couche cornée est une diffusion de type passive puisqu'elle ne nécessite pas d'énergie. Elle peut se faire selon **trois voies principales** (Figure 1-8) ^{25,27,28} :

- ⇒ La voie transcellulaire, qui correspond à une diffusion à travers les cornéocytes et la matrice extracellulaire lipidique.
- ⇒ La voie intercellulaire, longue et tortueuse du fait de l'arrangement en brique de la couche cornée qui correspond à un passage entre les cornéocytes dans le mortier lipidique. L'arrangement compact de la matrice lipidique permet d'exclure le passage de molécules supérieures à 500 Da (Figure 1-9).
- ⇒ La voie transfolliculaire, le long des poils et glandes sébacées et sudoripares est une voie favorisant la pénétration des molécules dans certaines régions du corps uniquement.

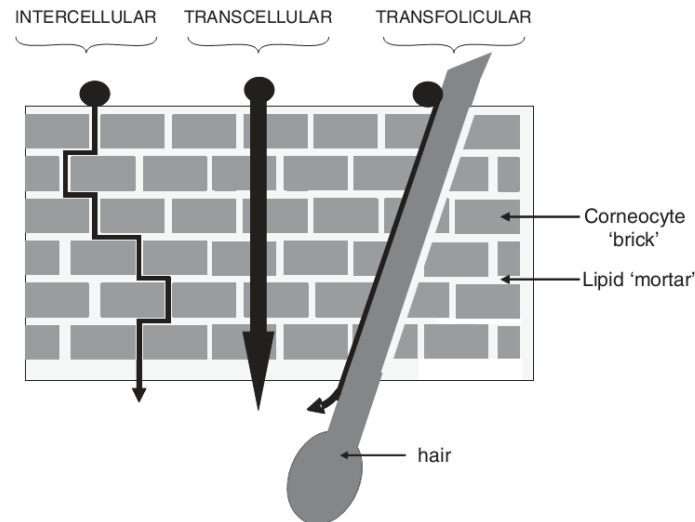


Figure 1-8 : Les différentes voies de passage des molécules au travers de la couche cornée.²⁵

En fonction de la nature physicochimique de la molécule et en raison de la nature de la couche cornée, on peut résumer de la manière schématique suivante le passage des molécules :

Une substance hydrophile, de par la nature hydrophobe de la couche cornée ne pénétrera pas facilement la barrière cutanée tant que l'intégrité de la couche cornée est conservée (en effet dans l'autre sens la couche cornée permet de limiter la perte en eau de l'organisme).

Une substance lipophile aura une grande affinité pour les lipides de la couche cornée et préférera donc le passage intercellulaire au travers de la matrice lipidique.

Les substances à la fois hydrophiles et lipophiles pénétreront elles, plus facilement puisqu'elles peuvent emprunter toutes les voies de diffusion.^{25,27,28}

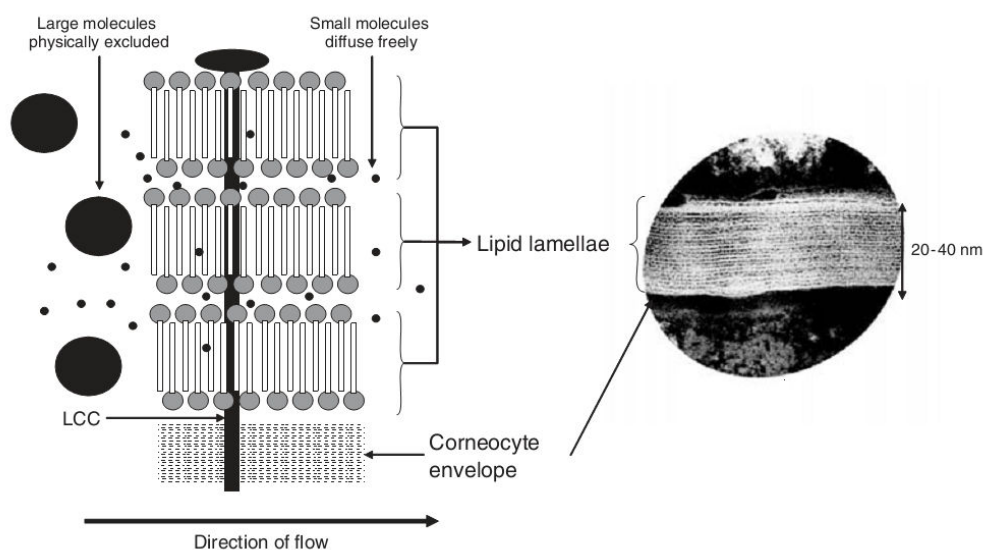


Figure 1-9 : Représentation schématique de la matrice lipidique (gauche) et observation microscopique (droite).²⁵

Les molécules diffusent à travers cette matrice en fonction de leurs propriétés physicochimiques et de leur taille.

2.3.3. Cinétique de l'absorption percutanée

Après une certaine période au cours de laquelle une substance pénètre dans la couche cornée, la quantité de molécules qui rentre est équivalente à celle qui passe vers l'épiderme vivant (et de même pour les couches inférieures), on atteint ainsi un état d'équilibre au cours duquel le flux reste constant tant que la quantité de molécules à la surface de la peau reste suffisante. Durant cette phase, la pénétration d'une substance peut être comparée à sa diffusion à travers une membrane semi-perméable et répond donc à la loi de diffusion de Fick suivante (équation 1)²⁹ :

$$J = Kp * \Delta c = \left(\frac{Km * D * \Delta c}{e} \right) \text{ (eq. 1)}$$

J est le **flux percutané** mesuré en $[M][L^{-2}][t^{-1}]$, c'est-à-dire la quantité de molécules qui diffuse au cours du temps.

Δc est la **différence de concentration** de part et d'autre de la membrane.

Kp est le **coefficient de perméabilité** mesuré en $[L][t^{-1}]$ il est égal à $\frac{Km * D}{e}$. Il traduit la vitesse de diffusion au travers des couches cutanées. Il est donc dépendant de l'épaisseur et de la perméabilité de la membrane et de la nature physicochimique de la molécule et de son excipient.

Km est le **coefficient de partage entre la couche cornée et l'excipient**. Il correspond au rapport de solubilité de la substance dans la couche cornée (C_s) et dans l'excipient (C_e). Une molécule ayant un Km proche de 1 se répartira de manière sensiblement identique entre la couche cornée et son excipient. Un Km élevé traduit une forte affinité de la molécule pour la couche cornée (en générale les molécules lipophiles). Cependant, il est à noter que la pénétration n'est pas favorisée par un Km très élevé. En effet, une molécule très lipophile aura tendance à s'accumuler dans la couche cornée et sera incapable de la quitter pour diffuser dans les sous couches.

D est le coefficient de diffusion mesuré en $[L^2][t^{-1}]$. Il traduit la facilité avec laquelle une molécule peut traverser la couche cornée et atteindre la circulation systémique. Il est dépendant de la taille de la molécule. Il traduit également la différence de perméabilité des couches cutanées : le coefficient de diffusion de la couche cornée est de $10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ contre $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour l'épiderme et le derme.

e correspond à l'épaisseur de la couche cornée. Selon le site anatomique cette valeur peut donc fortement varier.

Selon la quantité disponible en surface on distingue deux types de conditions (Figure 1-10) :

- Exposition en **doses infinies** : la quantité de molécule disponible en surface reste constante tout au long de l'exposition. On atteint donc un état d'équilibre ou le **flux** est **maximum** et **constant**.
- Exposition en **doses finies** : la quantité disponible en surface décroît au cours du temps du fait de l'absorption cutanée, on atteint donc un **flux maximum**.

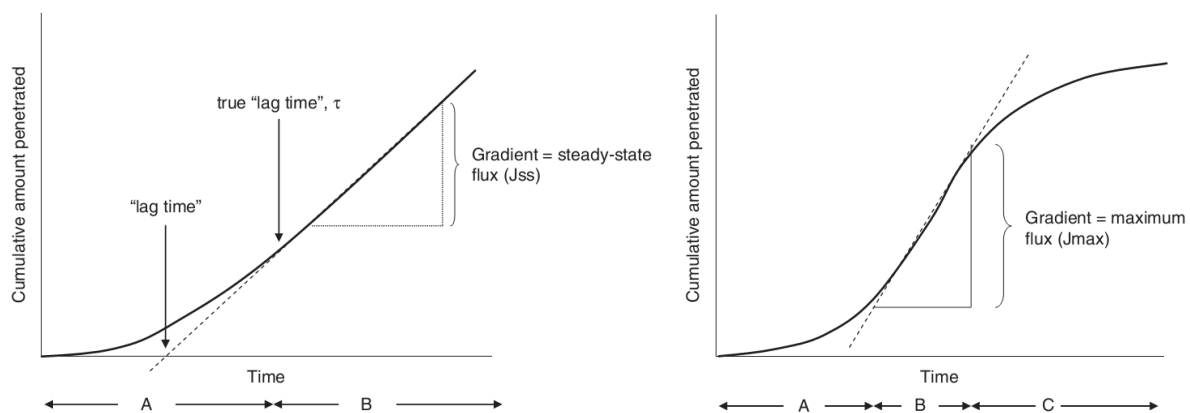


Figure 1-10 : Cinétique de pénétration en conditions infinies (gauche) et finies (droite)²⁹.

Après un temps de latence (phase A), la quantité qui pénètre atteint l'état d'équilibre (flux constant, B). En condition finie, la dose en surface diminue, c'est pourquoi la quantité qui pénètre atteint un plateau (C).

De ces cinétiques de pénétration deux paramètres majeurs peuvent donc être calculés :

- le flux maximum **Jmax** est le flux à l'état d'équilibre en solution aqueuse à saturation. Il correspond à la dérivée de la courbe dans sa partie linéaire. Dans le cas de molécules à l'état liquide, le flux maximum est le flux à l'état d'équilibre de la molécule pure.
- le temps de latence λ qui correspond au retard de l'absorption par rapport à l'entrée de la molécule dans la couche cornée (ou les autres sous couches). Il correspond à l'intersection la dérivée de la courbe dans sa partie linéaire (qui permet de calculer J) avec la droite des abscisses. Il peut également être calculé selon l'équation 2 suivante et dépend du coefficient de diffusion et de l'épaisseur de la membrane.

$$\lambda = \frac{e^2}{6 \cdot D} \text{ (éq. 2)}$$

2.3.4. Les paramètres influençant la pénétration percutanée

- Les facteurs intrinsèques de la peau

Les principaux paramètres biologiques influençant la pénétration percutanée sont l'intégrité et l'épaisseur de la couche cornée. Selon le site anatomique l'**épaisseur** et le **nombre de couches** du *stratum corneum* varient, la pénétration étant donc facilitée au niveau des régions ayant de fines couches cornée (abdomen) par rapport aux régions où la couche cornée est très épaisse comme la plante des pieds²⁸. L'**intégrité** de la couche cornée doit être maintenue. La peau peut être endommagée par des agressions physiques, mécaniques ou chimiques et dans ce cas la pénétration est souvent favorisée.^{27,28}

D'autres facteurs comme la **densité pilo-sébacée** modulent l'absorption percutanée. Les zones anatomiques ayant une densité pilo-sébacée importante ont en général une couche cornée plus fine. De ces deux faits, la pénétration est augmentée (fonction barrière moindre et voie transfolliculaire préférée).^{27,28}

L'**âge** joue également un rôle. Tout au long de la vie de l'individu, l'épiderme subit des modifications (ultrastructurelle ou composition lipidique). A la naissance, la fonction barrière de la peau d'un nouveau n'est pas complète, la perte insensible en eau atteint sa maturité après 7 mois³⁰. Cependant, la perméabilité est similaire ; seule la peau d'un prématuré de plus de 4 semaines est plus perméable que celle d'un homme adulte³¹. De même, lors du vieillissement cutané il y a diminution de la cohésion intercellulaire et du contenu en lipide, la peau d'une personne âgée est donc également plus perméable que celle d'un adulte en bonne santé.^{27,28}

Le dernier facteur intrinsèque de la peau est la **microcirculation cutanée** : plus le débit est élevé plus une substance va se résorber facilement vers la circulation systémique et inversement et ne sera pas stockée dans les sous couches cutanées.^{27,28}

- Les facteurs environnementaux

La fonction barrière de la couche cornée est également influencée par certains facteurs environnementaux comme l'**hydratation** et la **température**. Une couche cornée hydratée ou dont la température est augmentée verra ses ciments lipidiques fluidifiés ainsi sa densité et sa résistance à la diffusion de molécules seront diminuées et la pénétration favorisée.

Le **type d'exposition** influence l'intégrité de la couche cornée³². En conditions occlusives (application de chambres ou textiles recouvrant la zone exposée, certaines crèmes, polymères et graisses peuvent jouer à eux seul le rôle occlusif), la pénétration de molécules lipophiles ou non polaires est augmentée. En effet, la peau est fortement hygroscopique, elle peut prendre 5 fois son

poids en eau si elle est immergée en solution aqueuse. En condition occlusive, la perte naturelle en eau est limitée ce qui augmente la prise en eau dans les espaces intercellulaires entraînant une modification du ciment lipidique.

De plus, la **concentration** (saturante ou non) à laquelle la peau est exposée joue un rôle important dans la pénétration.

- Les facteurs physicochimiques liés à la molécule ou à son excipient

Le premier facteur est la **taille** de la molécule ou le **poids moléculaire**. Les molécules inférieures à 500Da auront un fort coefficient de diffusion tandis que celles dont la taille est supérieure seront freinées du fait de l'agencement de la couche cornée. Les molécules linéaires ayant un poids supérieur à 500Da pourront quand même passer du fait de leur structure linéaire.³³

Le deuxième facteur important est le **coefficient de partage de la molécule (Log P ou Kow)** c'est-à-dire sa répartition entre l'octanol et l'eau (équation 3)³³ traduisant les propriétés **hydrophiles/lipophiles** de la molécule.

$$Kow = \text{Log} \left[\frac{[\text{octanol}]}{[\text{eau}]} \right] \text{ (éq. 3)}$$

Une molécule très hydrophile aura un coefficient de partage négatif, une molécule très lipophile aura un Log P positif et une molécule amphiphile aura un Log P égal à 0. Seules les molécules ayant un coefficient de partage équilibré (proche de 0 et donc à la fois hydrophile et lipophile) passeront facilement la barrière cutanée hydrophobe et les couches vivantes plus profondes hydrophiles.

Le troisième facteur important est la **solubilité** de la molécule. Celle-ci est fonction des propriétés **hydrophiles/lipophiles** de la molécule mais également du **point de fusion** des principes actifs dans l'excipient c'est-à-dire la cohérence du réseau cristallin. Un **excipient** désigne toute substance autre que le principe actif présente dans la formule (médicament, cosmétique, aliment, etc.). Il ne doit pas interagir chimiquement avec la molécule. Outre le fait qu'il doit permettre de solubiliser les principes actifs, il peut favoriser la pénétration de deux manière différentes : (1) la molécule solubilisée a une très faible affinité avec son excipient, elle aura donc une plus forte affinité pour la barrière cutanée et (2) selon sa nature l'excipient peut altérer la barrière cutanée (acétone, esters, DMSO).

Les **molécules chargées** et **polaires** du fait de la nature hydrophobe de la couche cornée ne passent généralement pas la barrière cutanée. Le **pH** de la peau et de l'excipient peuvent donc influencer la pénétration en modifiant la charge de la molécule.

Enfin la capacité d'une molécule à faire des **liaisons hydrogènes** avec les composants de la couche cornée peut influencer sa pénétration. Une forte capacité à faire des liaisons hydrogènes peut ralentir la pénétration d'une molécule et favoriser son stockage dans la couche cornée.

III. METHODES DE MESURE ET PERMEABILITE VIS-A-VIS DES AGENTS CHIMIQUES DE GUERRE

L'étude de la pénétration de produits chimiques tels que les agents chimiques de guerre chez l'homme n'est pas envisageable du fait de leur forte toxicité. En raison de la prise de conscience de la souffrance animale, des normes européennes (règles OCDE) ont été établies et tendent à l'utilisation de méthodes alternatives *in vitro* afin de diminuer le nombre d'animaux en expérimentation : c'est la règle des « 3R » (réduire le nombre d'animaux, raffiner et remplacer les méthodes). Le modèle choisi doit être à la fois scientifiquement **pertinent, prédictible et extrapolable** à l'homme, mais également être utilisé couramment dans la littérature. Selon le rapport de l'ECVAM³⁴ (le Centre Européen pour la Validation des Méthodes Alternatives) le niveau de pertinence des résultats dépend de la physiologie de l'espèce et de la structure de la peau (Figure 1-11).

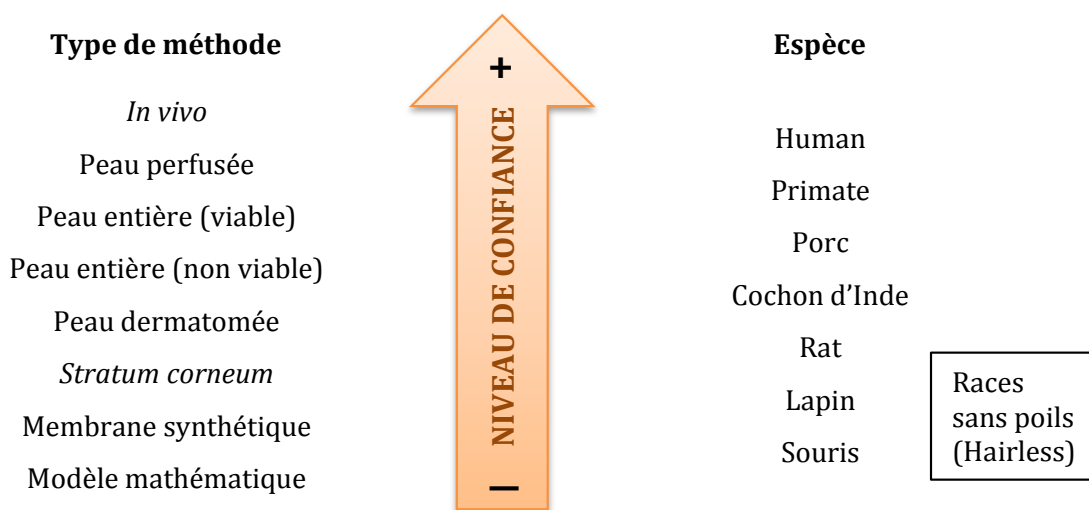


Figure 1-11 : Schéma hiérarchique des méthodes utilisées pour évaluer l'absorption percutanée des molécules.

Ces méthodes sont fonction de la physiologie des espèces (d'après le rapport du Workshop 13 de l'ECVAM³⁴).

Le choix du modèle se fera donc en fonction de ces critères **éthiques** et **réglementaires**, **économiques** (il ne doit pas coûter trop cher), **techniques** (il doit être réalisable et facile à mettre en œuvre) et **statistiques** (il doit être reproductible), le critère le plus important restant le critère **scientifique**. L'OCDE a rédigé en 2004 deux lignes directrices (n°427³⁵ et n°428³⁶) concernant les méthodes d'absorption cutanée des produits chimiques et les règles à respecter au cours de ces études. Cette thèse vise à étudier la protection de la peau vis-à-vis des organophosphorés, seules leur toxicité et pénétration sera abordée dans ce chapitre.

3.1. METHODES ET DONNEES IN VIVO

L'avantage majeur de l'utilisation de méthodes *in vivo* est l'utilisation d'un système intact sur le plan physiologique et métabolique mais à l'inverse la différence de perméabilité entre la peau humaine et celle des espèces animales peut conduire à une surestimation de l'absorption percutanée chez l'homme³⁵. En effet, le facteur espèce est important car il influence la fonction barrière de la peau. Cette fonction est principalement assurée par la couche cornée. Comme vue précédemment, elle peut être représentée par un mur de briques que sont les cornéocytes et dont le ciment serait l'ensemble des lipides intercellulaires essentiels à l'intégrité et la fonction barrière de la peau. Passé la couche cornée, la diffusion des molécules se fait assez facilement et celles-ci peuvent alors passer dans le compartiment sanguin et impacter les différents compartiments humains³⁷.

Selon l'espèce utilisée, la peau est plus ou moins fine et poilue, les poils étant des voies d'entrées, ceux-ci permettent de favoriser la pénétration (Tableau 1-4).

Tableau 1-4 : Différence structurale et folliculaire selon l'espèce utilisée pour les méthodes d'absorption percutanée.³⁸

	Site anatomique	Stratum corneum (μm)	Epiderme (μm)	Peau entière (mm)	Nombre de follicule / cm ²	Diamètre folliculaire (μm)
Humain	abdomen	17±1	47±2	2,9	11±1	97±3
Cochon (2 à 3 mois)	dos	26±1	66±2	3,4	11±1	177±4
Rat	dos	18±1	32±1	2,1	289±21	25±1
Souris « hairless »	dos	9±1	27±1	0,7	75±6	46±1
Souris	dos	6±1	13±1	0,8	658±38	26±1

Les modèles les plus utilisés sont les rongeurs ou les cochons. Le cochon ayant une peau plus proche au niveau de sa structure, de sa composition (Tableau 1-5) et de sa densité pileuse sera préféré mais présente le désavantage de nécessiter un investissement plus élevé en terme de mise en œuvre (animal plus gros = nourrissage et cage métabolique plus importants).

Tableau 1-5 : Comparaison de la composition en lipide de l'épiderme (en % total de lipides).³⁹

	Humain	Cochon	Rat
Lipide non polaire (neutres)	30±8	35±4	64±8
Lipides polaires			
Phospholipides	62±10	53±4	35±8
Glycosphingolipides (glucosylceramide)	7±1	9±1	nd
Sulfate de cholestérol	0,3±0,1	1±0	1±0

La ligne directrice OCDE n°427 décrit la mise en œuvre des expériences et des animaux utilisés pour estimer la pénétration des molécules³⁵. En général, ces méthodes *in vivo* nécessitent l'utilisation de substances radiomarquées pour une meilleure détection et un suivi de leur métabolisation dans les différents compartiments visés. Les molécules sont appliquées pures ou diluées sur la peau préalablement rasée des animaux et maintenues sous un timbre pour prévenir de toute autre voie d'exposition (ingestion, inhalation). Ces conditions correspondent alors à des conditions occlusives. Au terme de la période d'exposition, le timbre est retiré et la peau est nettoyée à l'aide d'un agent lavant approprié (l'ensemble est conservé pour analyse). Un timbre neuf est posé. Les paramètres étudiés peuvent être la quantité de molécules retrouvée dans les différents compartiments (sang, organes) mais également dans leur excrétion. C'est à l'aide de cages métaboliques individuelles que l'ensemble est collecté pour analyse. Dans le cas de molécules ou de la formation de métabolites radioactifs volatils, la collecte de l'air expiré est également réalisée.

En raison de la toxicité avérée de ces molécules peu d'études permettent une comparaison à l'homme. Le Tableau 1-6 présente les différences de pénétration de certains POP connus selon les espèces animales.

Tableau 1-6 : Pénétration cutanée des POP selon les espèces.³⁷

Animal	Facteur de perméabilité / homme	Agent testé
Rat	10	parathion
Lapin	8-10	malathion, parathion
Singe	2,4-3,1	malathion, parathion
Porc	1,5-1,9	parathion, malathion

3.2. METHODES ET DONNEES IN VITRO

L'avantage majeur de l'utilisation de méthodes *in vitro* consiste en la facilité de mise en œuvre comparée aux méthodes *in vivo*, la possibilité d'étudier des molécules très toxiques et ainsi le grand nombre de données disponibles dans la littérature concernant les agents chimiques de guerre. La ligne directrice OCDE n°428 décrit le déroulement des expériences d'absorption cutanée *in vitro*³⁶. Le désavantage de ces méthodes alternatives est qu'elles ne permettent pas de mesurer la métabolisation des molécules par le corps, elles vont permettre uniquement d'étudier la pénétration cutanée des molécules sans pouvoir quantifier leur toxicité et leur impact sur la santé.

De la même manière que pour les études *in vivo* le facteur espèce est important. Le protocole ici est miniaturisé par des cellules dites de diffusion dans lesquels sont disposés les explants de peaux de l'espèce animale choisie. La molécule est appliquée (pure ou diluée) pour un temps donné avant

décontamination. Pour la validité de ces expériences les conditions suivantes doivent être respectées : la composition ou le volume du fluide récepteur ne doit pas freiner l'absorption ou affecter l'intégrité de l'explant ; la viabilité de la préparation cutanée doit être validée ou encore les paramètres environnementaux doivent être compris entre 30 et 70% pour l'humidité et $32 \pm 1^\circ\text{C}$ en surface de la peau³⁶.

3.2.1. Modèles *in vitro*

- Constitution et principe du modèle

Les cellules de diffusion sont composées de deux compartiments délimités par une membrane (membrane artificielle ou explant de peau *ex vivo*) (Figure 1-12 A). Le toxique à évaluer est appliqué sur la surface supérieure de la membrane, cela constitue le compartiment dit **donneur** (côté épiderme). Le compartiment **receveur** (côté derme) est en contact avec un liquide récepteur thermostaté qui hydrate et maintient l'intégrité et la température de la peau (32°C). La quantité de toxique passée dans le compartiment dermique est mesurée en fonction du temps et constitue une **cinétique de passage**.

La quantité cumulée de toxique peut être exprimée en masse, mole ou pourcentage de la dose appliquée et son évolution est représentée graphiquement en fonction du temps (Figure 1-12 B). De ce graphique plusieurs paramètres peuvent être calculés : le flux maximum J_{max} (lorsque le produit est appliqué pur ou en solution aqueuse à saturation) et le temps de latence λ . D'autres méthodes de calculs permettent également d'exprimer la pénétration en coefficient de perméabilité (K_p).

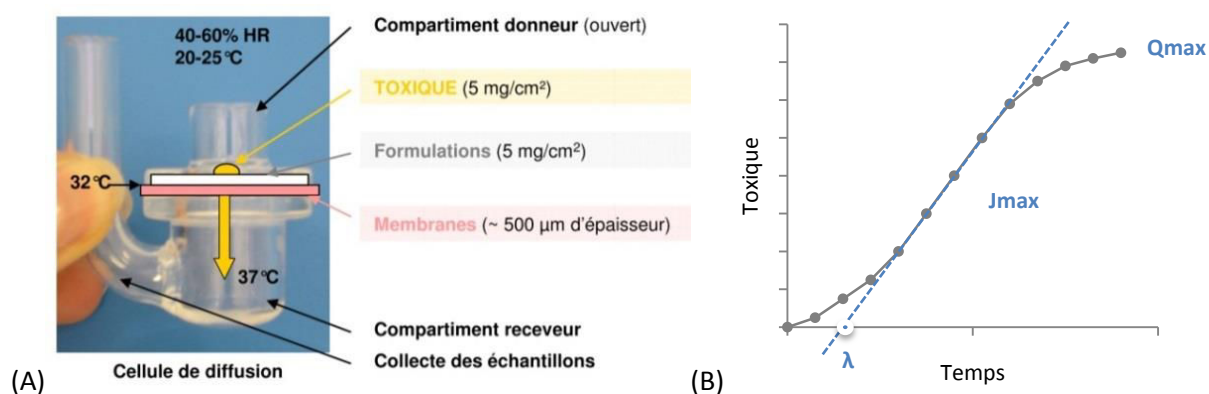


Figure 1-12 : Constitution et principe d'une cellule de diffusion⁴⁰ (A) ; Graphique de la cinétique de passage (B).

Les toxiques peuvent être détectés de deux manières : directe ou indirecte. Ces deux méthodes sont expliquées dans le tableau suivant (Tableau 1-7). La différence de dosage entre les deux méthodes permet de mesurer la quantité de toxique dégradée au cours de leur passage à travers la membrane.

Tableau 1-7 : Les différentes méthodes de détection des toxiques.

Méthode	Mesure par	Avantages	Inconvénients
Radiomarqué	Compteur	Quantifie le toxique passé au travers de la membrane	Utilisation de matière radioactive
Enzymatique	Spectrométrie	Quantifie le toxique passé au travers de la membrane Facilité d'utilisation, pas de matière radioactive	Quantifie uniquement le toxique intact qui réagira avec l'enzyme. Détection uniquement d'inhibiteur enzymatique (OP essentiellement)

- Les différentes membranes

Les membranes peuvent être d'origine humaine, animale ou artificielle.

Les peaux humaines sont généralement issues de plasties chirurgicales (peaux viable) ou de prélèvement post-mortem (peaux non-viables). Les explants de peau d'origine animale (porc, cochon d'inde, lapin, souris, rat, etc.) sont prélevés sur les animaux sacrifiés. Ces explants peuvent être utilisés frais ou congelés et également entiers, dermatomés ou perfusés. Le Tableau 1-8 résume les avantages et inconvénients de chaque type d'explant. De même que pour les expériences *in vivo* le choix de l'espèce est important. Le modèle animal le plus proche de l'homme et d'ailleurs le plus utilisé pour l'évaluation de l'efficacité est le porc³⁷.

Tableau 1-8 : Les différents types de membranes biologiques.³⁷

Membranes	Composition	Inconvénients	Avantages
Explants entiers	Epiderme + derme	Le derme sans circulation sanguine est un endroit de stockage des molécules lipophiles	Facilité de l'expérience
Explants dermatomés	Epiderme + une partie du derme superficiel	Savoir-faire du dermatome	Epaisseur normalisée. Méthode reproductible. Moins de stockage des molécules lipophiles.
Epidermes isolés	Epiderme	Difficulté de séparation du derme/épiderme (chimique, chauffage, enzymatique et mécanique = altération des propriétés de l'épiderme)	Pas de stockage des molécules lipophiles
Peaux perfusées	Epiderme + derme	Mise en œuvre complexe	Similaire à un modèle expérimental intact et vivant

L'intégrité des membranes biologique doit être vérifiée avant utilisation. Plusieurs techniques existent⁴¹ :

- la **perte insensible** en eau (PIE) : on mesure la quantité d'eau évaporée par unité de temps à l'aide d'un évaporimètre. C'est la méthode la plus utilisée. Les valeurs doivent être comprises entre 0 et 25 g/m²h (0-10 = très bonne condition, 10-15 = bonne condition, 15-25 = condition normale).
- la **fonction barrière** de l'explant : on mesure la pénétration de l'eau tritiée à travers l'explant. Cependant le problème de cette méthode est qu'elle augmente l'hydratation et la température de la couche cornée et modifie donc celle-ci pour l'étude d'efficacité.
- la **résistivité** : on applique un courant alternatif de 2 volts maximum et on mesure la résistance électrique de la peau à l'aide d'un cornéomètre.

Les membranes artificielles sont utilisés pour des pré-screening car très faciles à mettre en œuvre comparées aux explants de peau⁴²⁻⁴⁴.

- Les différents types de cellules de diffusion

Il existe différents types de cellules de diffusion³⁷ (Figure 1-13) :

- Les cellules **statiques** : le volume de liquide du compartiment receveur est fixe. Celui-ci est agité afin de ne pas saturer la face inférieure de la membrane en toxique ce qui induirait une limitation la pénétration. Cette méthode est simple de réalisation et est la plus utilisée.
- Les cellules **dynamiques** : le liquide du compartiment receveur est constamment renouvelé par un flux continu (mime le flux sanguin). Cette méthode est utilisée pour les études sur le métabolisme cutané.

- Les conditions des tests

La pénétration d'une molécule dépend également des conditions du test (occlusives, semi-occlusives ou non-occlusives). L'intérêt de l'occlusion est d'éviter l'évaporation de certains composés volatils comme les études avec l'Ypérite et sera utilisée pour des applications longues durée³⁶. Cependant, le système occlusif augmente la température et le pH cutané et favorise l'hydratation de la couche cornée ce qui augmente la fluidification des ciments intercellulaires et diminue ainsi la densité de la couche cornée. En générale l'absorption cutanée en est augmentée.^{32,45}

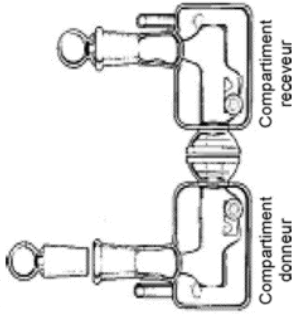
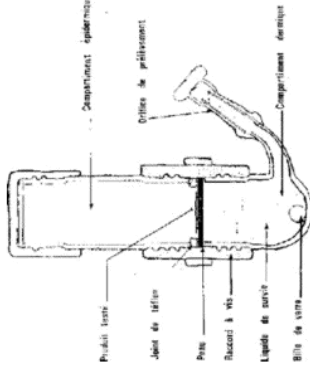
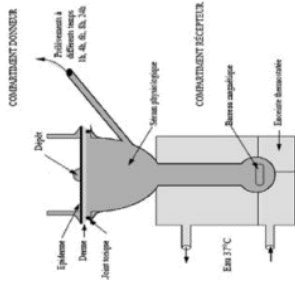
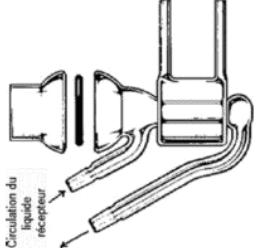
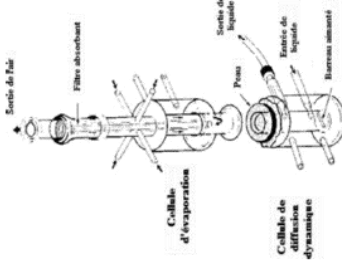
Références	Cellules statiques compartiments juxtaposés	Cellules statiques compartiments superposés fermés	Cellules statiques compartiments superposés ouverts	Cellules dynamiques	Cellules dynamiques équipées d'une cellule d'évaporation
Principe					
Avantages	Homogénéité des compartiments donneurs et receveurs	Mise en œuvre simple	Prélèvements manuels ou automatiques	Pas d'accumulation des molécules dans le compartiment receveur Circulation sous la peau (débit de 0,1 à 5 ml/h) Prélèvements automatisés Étude du métabolisme cutané	Mise en œuvre plus complexe Nécessité de disposer de techniques de dosage plus sensibles
Limites	Système occlusive (hydratation du SC) Prélèvements manuels	Accumulation des molécules dans le compartiment receveur			

Figure 1-13 : Les différentes cellules de diffusion.³⁷

- Choix du liquide récepteur

Enfin, concernant le choix du liquide récepteur, deux critères sont à respecter : (1) La concentration du toxique à analyser doit être dix fois inférieure à sa limite de solubilité dans le liquide choisi et ne doit pas empêcher le transfert du toxique dans le compartiment récepteur. Il peut contenir un agent solubilisant soit du sérum bovin (< 5%), du polyéthylène glycol (< 6%) ou de l'éthanol (< 50%) mais ces produits ne doivent pas gêner l'analyse (ex : la spectrométrie n'est pas compatible avec du sérum bovin) ; (2) La composition du liquide récepteur choisi ne doit pas modifier l'intégrité de la peau. Par exemple, dans le cas d'ajout d'éthanol à hauteur de 50%, il faut prendre en compte l'aspect non physiologique de ce liquide et son impact sur la pénétration à savoir que les absorptions mesurées seront plus élevées que la réalité.

3.2.2. Données de pénétration in vitro

Le Tableau 1-9 présente la différence de perméabilité entre les différents explants cutanés vis-à-vis des OPs. Le modèle le plus proche de l'homme semble donc être le porc en raison de sa similarité avec la peau humaine (épaisseur cutanée, densité pileuse).

Tableau 1-9 : Pénétration cutanée des OP selon les explants utilisés.^{22,37,46,47}

Explant	FOD / humain	Agent testé
Cochon (oreille ou dos)	1,8-2,0	Demeton-S methyl
	1,1	DDT
	1,2	Lindane
	1,8	Malathion
	1,4	Paraoxon
	0,4	DEET
	2,4-3,0	Parathion (seul/acétone/éthanol)
	1-10	VX
Cochon d'inde (dos)	7,2	VX
	3,1	Paraoxon
	0,2	DEET
	0,5	Lindane
Chat	35	sarin
Lapin	10	parathion/malathion

La mesure de la pénétration permet d'évaluer la quantité de molécules qui rentre en contact avec la peau et passe la barrière cutanée. La mesure de l'efficacité d'un topique protecteur cutané consiste en une évaluation de la diminution de cette pénétration. Les méthodes d'évaluation de l'efficacité des crèmes candidates sont donc les mêmes que celles employées pour la mesure de la pénétration percutanée, la différence résidant dans l'application de la crème candidate entre la peau/support et le toxique.

IV. LES TOPIQUES PROTECTEURS CUTANES : UN MOYEN DE PROTECTION ET DE NEUTRALISATION DES AGENTS CHIMIQUES

Un topique protecteur cutané (TPC ou TSP : topical skin protectant) est un **médicament** et/ou un **cosmétique** à **usage cutané** permettant de **protéger la peau** contre des **agressions extérieures**.

La majorité des produits vendus en tant que topiques protecteurs regroupe à la fois des produits simplement émollients dont la fonction est de conserver l'hydratation et l'homéostasie de la peau mais également des formules dont la fonction est de créer une réelle barrière contre des produits chimiques agressifs et donc de limiter leur contact avec la peau dans des environnements à risques (solvants, acides, bases, détergents, etc.). Parmi les nombreux TPC existants à destination des travailleurs en milieu industriel quelques-uns ont démontré scientifiquement leur efficacité (Tableau 1-10).

Tableau 1-10 : Liste des TPC commerciaux et leur preuve d'efficacité.

TPC	Revendications	Résultats scientifiques	Modèle / Référence
Anthydro® Laboratoires SORIFA	Crème barrière hydrophobe ANTI-EAU. Protection cutanée contre l'eau, les solutions aqueuses et les détergents	Efficacité démontrée pour la réduction de l'irritation cutanée, le terme de « crème barrière » semble abusif, il faudrait plutôt parler de « crème modulatrices ou freinatrices de la pénétration »	Homme <i>in vivo</i> ⁴⁸
Stockoderm® Evonik industries	Protection combinée contre les substances à base d'huile et d'eau.	Protection démontrée contre des détergents (SDS) et des solvants (toluène).	Cochon d'inde <i>in vivo</i> ⁴⁹
TRAVABON® Evonik industries	Protège la peau contre les substances grasses et non miscibles à l'eau.	Protection démontrée contre n-hexane et toluène mais pas contre trichloroéthylène	Cochon d'inde <i>in vivo</i> ⁵⁰

Un topique protecteur est toujours utilisé en **complément** et ne constitue en aucun cas une substitution des équipements individuels (EPI) et collectifs (EPC) de protection d'après la Circulaire DRT (Direction des Relations du Travail) n° 89-6 du 27/2/1989. Dans le cadre de cette thèse, les topiques protecteurs viendraient également en complément des EPI pour apporter une protection supplémentaire en cas de rupture d'étanchéité des EPI et des jonctions tenue-masque, tenue-gant, tenue-chaussure au moment de l'intervention ou au cours du processus de décontamination (lors de l'enlèvement des EPI). Les TPC existant contre la pénétration d'agents chimiques de guerre sont développés dans la troisième partie de ce chapitre (4.3.).

La commercialisation de ces TPC est soumise soit au **Règlement cosmétique européen** du 30 novembre 2009⁵¹ s'ils sont considérés comme tel (produits solaire), soit à la **réglementation** concernant les **dispositifs médicaux** en cours d'évolution⁵² (dans le cas d'agent chimiques de guerre). Les dispositifs médicaux (DM) sont classés en 4 catégories en fonction de leurs risques pour la santé humaine :

- Classe I (risque faible) comme les lunettes correctrices
- Classe II (risque modéré) comme les lentilles de contact
- Classe III (risque élevé) comme les conservateurs et produits de désinfection
- Classe IV (risque le plus élevé) comme les implants.

Un TPC contre la pénétration d'agents chimiques de guerre pourra être considéré comme un DM de classes II ou III car directement en contact avec la peau.

La différence majeure entre ces deux réglementations réside dans (1) la preuve des **allégations** des produits et (2) les méthodes de validation de **l'innocuité** pour la santé humaine. Un produit cosmétique ne doit en aucun cas être une source de danger ou de toxicité pour la santé humaine tandis qu'un DM doit à minima prouver que **les risques éventuels encourus sont acceptables au regard des bénéfices apportés**. Egalement, dans le premier cas les tests d'innocuité doivent utiliser uniquement des méthodes *in vitro* tandis que pour les dispositifs médicaux l'utilisation d'animaux (*in vivo*) est possible pour prouver à la fois l'efficacité et l'innocuité du produit.

Deux générations de TPC ont vu le jour :

- Les **crèmes barrières passives** dites de première génération qui ont pour but de seulement limiter le contact entre la peau et le toxique en formant une couche difficilement pénétrable (en général composées d'un mélange de polymères perfluorés).
- Les **crèmes barrières actives** ou **aTSP** (active Topical Skin Protectant), dites de deuxième génération, ayant des propriétés spécifiques et capables de piéger et/ou de dégrader les toxiques. Ces dernières sont très intéressantes car elles peuvent allier protection et décontamination.

Les méthodes d'évaluation de l'efficacité des formules candidates correspondent aux méthodes de mesures de la pénétration. Aucune ligne directrice n'est encore rédigée mais de nombreux modèles sont en cours. Dans ce chapitre IV sera rappelé rapidement les différents tests *in vitro* et *in vivo* réalisés pour l'évaluation de l'efficacité des formules candidates puis seront développés les différents classes TPC et leur mécanisme de protection.

4.1. LES METHODES DE MESURE DE L'EFFICACITE DES TPC

Un TPC est dit efficace s'il limite le contact entre le toxique et la peau. Ainsi selon le toxique visé la mesure de l'indice d'efficacité peut se baser soit sur une **diminution de l'irritation/corrosion** (pour les substances ayant un effet direct sur la peau) ou sur une **limitation de la pénétration** (pour les substances toxiques sans effet direct sur la peau). D'après la règle des « 3R », le schéma de tests sera le suivant : **screening** à l'aide de méthodes *in vitro* et **validation** par des méthodes *in vivo*. Ce schéma n'est pas toujours respecté car nous avons vu que la réglementation n'est pas encore stricte concernant les dispositifs médicaux. Cependant, les raisons économiques et techniques tendent de plus en plus vers un respect de cette stratégie.

La principale méthode de mesure de l'efficacité *in vitro* des TPC se base sur la ligne directrice OCDE n°428³⁶ utilisant des cellules de diffusion. Le porc, modèle animal le plus proche de l'homme, est le plus utilisé pour l'évaluation de l'efficacité^{22,23,53}. Les membranes artificielles sont utilisées pour des pré-screening car très faciles à mettre en œuvre comparées aux explants de peau. Elles sont déjà utilisées pour des études de pénétration cutanées⁴²⁻⁴⁴ et ont été mises au point pour des tests d'efficacité par Jennifer Millérioux et ses collaborateurs^{22,23}. Ils ont démontré que l'ordre d'efficacité des formules était conservé entre des expériences *ex vivo* sur peau de porc et humaine, *in vivo* sur humain (analogue non toxique irritant) et *in vitro* sur membranes siliconées. La grande différence entre membranes artificielles et explants de peaux réside dans l'interaction entre la crème et les constituants de la peau quand les membranes artificielles ne constituent qu'un support inerte. Une autre méthode complémentaire peu répandue utilise la colorimétrie. Elle consiste à mettre en contact un épiderme protégé par un TPC avec un colorant (éosine, crystal violet et oil red O, etc.). On mesure la coloration de l'épiderme après solubilisation de celui-ci par colorimétrie⁵⁴. Cette méthode peut être également utilisée de manière *in vivo* sur l'homme puisque les colorants ne sont pas toxiques⁵⁵.

La logique de test serait donc de faire un pré-screening sur membranes artificielles et d'ensuite confirmer les résultats intéressants sur membranes biologiques.

La deuxième méthode la plus utilisée pour l'évaluation des TPC est l'utilisation de porc vivant^{53,56,57} mais peut également utiliser des rongeurs^{49,50}. Cette technique est plus longue, coûteuse et difficile à mettre en œuvre que les méthodes *in vitro*. Le TPC est appliqué sur une zone déterminée et limitée par un cylindre en verre ou en plastique fixé à la surface cutanée par des colles biologiques (chambres de protection). Le site anatomique de dépôt est en général le dos ou les oreilles (porc). Le toxique est ensuite appliqué pendant une durée déterminée qui peut varier selon le toxique étudié.

Egalement, les conditions peuvent être occlusives dans le cas de molécules volatiles. Les paramètres à étudier diffèrent selon la nature du toxique (mortel, irritant ou analogue non toxique (colorants)) (Tableau 1-11).

Tableau 1-11 : Paramètres étudiés dans les tests *in vivo* chez l'animal.

Paramètres	Méthodes d'analyse	Références
Quantité trouvée dans la peau ou prélevée dans le sang	Analyses radiométriques (dosage du passage du toxique radioactif) : HPLC, CG (en raison des faibles quantités absorbée par la peau)	53,58
Le toxique peut être absorbé par la peau mais stocké (peau) ou métabolisé (fèces, urines, gaz expirés)	Analyses enzymatiques (% enzyme active)	53,57,58
	Colorimétries (études du passage d'un colorant)	59
Analyses histologiques	Biopsies ou analyses post-mortem	48
Erythèmes, Œdèmes	Observations visuelles	49,60
Lésions cutanées	Observations visuelles	53,56,57,61,62
Mortalité	Nombre de mort vs. contrôles	58,63
DL ₅₀	Etude dose-réponse, Quantité induisant 50% de la mortalité dans le lot	64
PIE (perte insensible en eau)	Evaporimètre	49
Flux sanguin cutané	Laser Doppler	65

Compte tenu de la toxicité des agents chimiques de guerre, les tests faits sur l'homme utilisent des analogues moins toxiques (faiblement irritants) ou non toxiques (non irritants).

Le protocole d'application du TPC et du toxique reste le même que chez l'animal. Les chambres de protection ne sont pas nécessaires et l'application peut être délimitée par un marquage au stylo. Les chambres peuvent être utilisées pour des études occlusives ou semi-occlusives.

Les paramètres à étudier sont eux plus restreint du fait de l'étude sur l'homme :

- Analyses **histologiques** (état de l'épiderme : structure, lésions, etc.)⁶⁶ et **colorimétriques** (le passage du colorant peut représenter un type chimique : solvant (colorant dilué dans l'éthanol) ou solution aqueux (colorant dilué dans l'eau))^{55,67}. Les échantillons de peau sont obtenus par biopsie cutanée (SSB, Skin Surface Biopsy)
- **Résistance électrique** mesurée à l'aide d'un cornéomètre⁴⁸
- **Observations macroscopiques** : irritation, érythème, œdèmes⁶⁸⁻⁷⁰
- **Flux sanguin cutané**⁴⁸
- **Perte Insensible en Eau**⁴⁸

4.2. LES CREMES BARRIERE PASSIVES

Dans le développement des TPC, les premières formules utilisaient des polyéthylènes glycols (PEG) de différents poids moléculaires^{58,63,64} (1980-1990). Les recherches se sont ensuite orientées vers des produits résistants à la transpiration et à une exposition à l'eau, c'est ainsi que l'utilisation de polymères perfluorés dans les TPC a fait son apparition^{53,61}. Trois principaux TPC ont été développés en 30 ans : la SERPACWA (Skin-Exposure Reduction Paste Against Chemical Warfare Agents, Etats-Unis), l'AG-7 (Anti-Gaz number 7, Angleterre) et l'IB-1 (Israël).

L'Ag-7 est un TPC d'origine britannique développé par R. Chilcott et ses collaborateurs^{53,56,71}. La mise au point de cette crème barrière comprend de nombreuses formules basées sur un mélange de polymères perfluorés intégrés dans différentes émulsions (eau dans huile ou huile dans eau). La composition retenue est la suivante : 30% (p/p) de polytétrafluoroéthylène (PTFE) dont la taille des particules est de diamètre inférieur à 1µm qui sont dispersées dans 70% (p/p) de perfluoromethylisopropyl ether (PFPE). Cette formule présente une efficacité à la fois contre le VX (Tableau 1-12) et l'Ypérite (Tableau 1-13). Des PEG, du talc et de l'eau sont également présents dans la formule.

La **SERPACWA** développée à partir des recherches ayant débutées après la Première Guerre Mondiale au Etats-Unis est un mélange de polymères perfluorés (50% PTFE, 50% PFPE)⁶¹. Elle forme une barrière physique sur la peau qui permet de réduire ou retarder la pénétration percutanée à la fois des vésicants et des OPs⁶¹ (Tableau 1-12 et Tableau 1-13). Son efficacité *in vivo* chez l'homme à 20µL/cm² a également été testée : elle diminue de manière significative les lésions cutanées et érythèmes provoqués par l'Urushiol et le nicotinate de méthyle⁶¹. Elle a été approuvée par la FDA en 2006 comme étant non toxiques et efficace. Une recommandation de la FDA est la suivante : le contact de la crème avec des produits doit être évité car la contamination des produits fumés (cigarette) par le PTFE peut entraîner l'apparition de fibromes pulmonaires. De plus, il semble également que l'utilisation d'insecticides comme le DEET (N,N-diéthyl-m-toluamide) en diminue l'efficacité protectrice.

L'IB-1 a été mis au point par l'Institut Israélien de recherche biologique⁵⁷. C'est un TPC hydrophile contenant de la glycérine et du sulfate de magnésium. Le mécanisme de protection avancé par Kadar *et al.* est le suivant : la formule pénètre dans la peau et interagit avec les ciments intercellulaires pour former une barrière protectrice homogène. Cette crème barrière a montré son efficacité vis-à-vis du VX et de l'Ypérite, elle est d'ailleurs actuellement commercialisée sous le nom DermostyX par la société pharmaceutique israélienne REKAH. Cette formule présente une protection longue durée

puisque son efficacité a été démontrée au-delà de 10h vis-à-vis du VX (Tableau 1-12) et de l'Ypérite (Tableau 1-13) mais a, cependant, le désavantage de ne pas être résistante à l'eau et s'élimine donc facilement par la transpiration naturelle de la peau.

Les Tableau 1-12 et Tableau 1-13 présente les résultats d'efficacité des TPC existants. Le ratio de protection de chaque TPC montre que le plus efficace des TPC passifs est la SERPACWA car à la fois aussi efficace vis-à-vis des vésicants que des OPs.

Tableau 1-12 : Topiques protecteurs cutanées et leur efficacité contre les agent OP (thèse J. Millérioux⁷²).

TPC	Méthode	OP	Conditions	Paramètres mesurés Exposition	Résultats (P vs NP)	RP
SERPACWA	Lapin <i>in vivo</i>	VX	pur	DL50 (mg/kg) 4h	2,5 vs 0,049	51
	Cochon d'Inde <i>in vivo</i>	VX	5% dans	DL50 (mg/kg) 2h	0,26 vs 0,13	2
		VR	l'isopropanol		35 vs17	2
		GF	pur		> 250 vs 7,8	32
		GD			2,3 vs 0,73	3
IB-1	Porc <i>in vivo</i>	VX	pur	AChE active 1h	75 vs 40	2
Ag-7	Porc <i>in vivo</i>	VX	pur	AChE active 3h	56 vs 3%	19
	%Q0 (sang) 3h			63 vs 77%	1	
	Porc <i>in vitro</i>			%Q0 (milieu récepteur) 3h	3,4 vs 3%	1
PEG 540	Lapin <i>in vivo</i>	GD	pur	DL50 (mg/kg) 4h	16,6 vs 1,35	12
		TGD			17,3 vs 4,0	4
		VX			1,76 vs 0,04	44
Crèmes à base de PEG	Rat <i>in vivo</i>	VX	pur	Mortalité 1h	82 vs 18	5
		GD			>67 vs 21	3
	Cochon d'Inde <i>in vivo</i>	VX	pur	Mortalité 4min	0 vs 8/8	++
	Cochon d'Inde <i>in vitro</i>	VX		%Q0 (milieu récepteur) 24h	18-56 vs 97%	5-2

Tabun (GA), Sarin (GB), Sarin cyclohexylique (GF), Soman (GD) et Soman épaissi (TGD), VX russe (VR).

RP = Ratio de protection = valeurs contrôles / valeurs TPC.

Tableau 1-13 : Topiques protecteurs cutanées et leur efficacité contre les agent vésicants (thèse J. Millérioux⁷²).

TPC	Méthode	Agent	Condition	Paramètres mesurés Exposition	Résultats (P vs NP)	Ratio R
SERPCWA	Lapin <i>in vivo</i>	HD	pur 0,01ml/cm ²	Lesions cutanées 4h	20% vs 100% (témoin)	5
IB-1	Porc <i>in vivo</i> (occlusif)	HD	pur 5-10µL/cm ²	Lesions cutanées (aire) 1h	20 vs 180mm ²	9
Ag-7	Porc <i>in vivo</i> (occlusif)	HD	pur 0,02ml/cm ²	Lesions cutanées (observation histologique 5min 1h)	peau intacte vs lésé	-
	Porc <i>in vitro</i> (occlusif)			%Q0peau 5min	0,12 vs 0,27	2
	Humain <i>in vitro</i>		0,08ml/cm ²	Jmax (µg/cm ² .h-1)	1,23 vs 4,41	3
Crème protectrice	Cochon d'Inde <i>in vivo</i>	HN	1g/100mL d'éthanol	Lésions cutanées	réduite vs témoin	-

Ypérite au soufre (HD), Ypérite à l'azote (HN).

RP = Ratio de protection = valeurs contrôles / valeurs TPC.

4.3. LES ATSP

Il existe de nombreuses méthodes de contres-mesures médicales capable de neutraliser les toxiques mais dont la limitation est le temps très court d'action nécessaire entre contamination et décontamination. En effet, une fois la barrière cutanée traversée la neutralisation des agents dans le corps est plus complexe. Le but des aTSP est d'associer protection (et donc limiter le contact avec la peau) et décontamination immédiate (dans le cas éventuel d'une contamination). Les ingrédients intégrés dans ces topiques nouvelle génération doivent donc dégrader les toxiques.

4.3.1. Mécanismes de dégradation

La dégradation des agents peut se faire de différentes manières²¹.

L'**hydrolyse** est la manière la plus simple et la plus utilisée pour neutraliser des agents. Le Tableau 1-14 résume les temps de demi-vie des OPs par hydrolyse. Globalement l'hydrolyse permet la formation de composés moins ou pas toxiques, elle est particulièrement efficace pour les agents G (sarin, soman) plus solubles dans l'eau. L'**hydrolyse en milieu basique** est la plus rapide puisqu'elle permet de réduire les temps de demi-vie du sarin et du soman de plusieurs jours à quelques minutes. La dégradation des agents G (tabun, sarin, soman) est moins complexe que celle des agents V (VX, R-VX). En effet, la voie de dégradation des agents V dépend du pH : la liaison P-S est clivée à pH acide ou basique et à pH neutre c'est la liaison P-O (Figure 1-14 A et Figure 1-15).

Tableau 1-14 : Variation de la demi-vie des agents selon les conditions d'hydrolyse.²¹

Agent	pH	Température	Demi-vie (T _{1/2})
Tabun	7.4	20°C	8 h
Sarin	6.5	20°C	416h
		25°C	237 h
	7.5	20°C	46 h
		25°C	24h
	>10	-	quelques minutes
Soman	6.0	25°C	60h
	>10	-	quelques minutes
VX	7	-	4,8 jours
R-VX	7	-	12,4 jours

Les agents V peuvent également se dégrader par **hydrolyse autocatalytique** en excès d'eau mais le temps de dégradation est beaucoup plus long (1-2 mois).

Une troisième voie consiste en une attaque nucléophile par des **peroxydes** (R-O-O-R') non toxiques et non corrosifs (contrairement à l'hydroxyde de sodium) et aboutit directement à la formation de dérivés non toxiques en évitant la formation d'intermédiaires toxiques (EA-2192).

Une autre voie majeure de dégradation consiste en une **chlorination oxydative** (Figure 1-14 C). Les premières méthodes utilisaient l'eau de javel puis d'autres produits décontaminants ont été mis au point (HTH, SMT, ASH, SLASH, etc.).

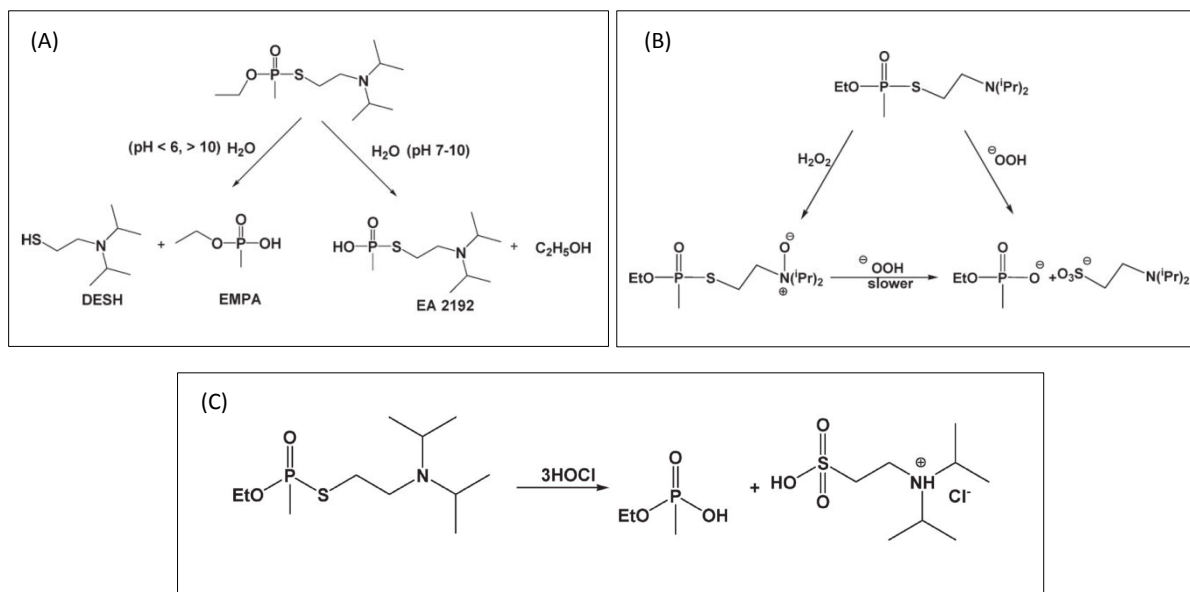


Figure 1-14 : Dégradation du VX par hydrolyse dans l'eau aux différents pH (A), hydrolyse par un peroxyde (B) et par chlorination oxydative (C).²¹

DESH : diisopropylethyl mercaptoamine ; EMPA : ethyl methylphosphonic acid ; EA 2192 : S-(2-diisopropyl- aminoethyl) methylphosphonothioic acid.

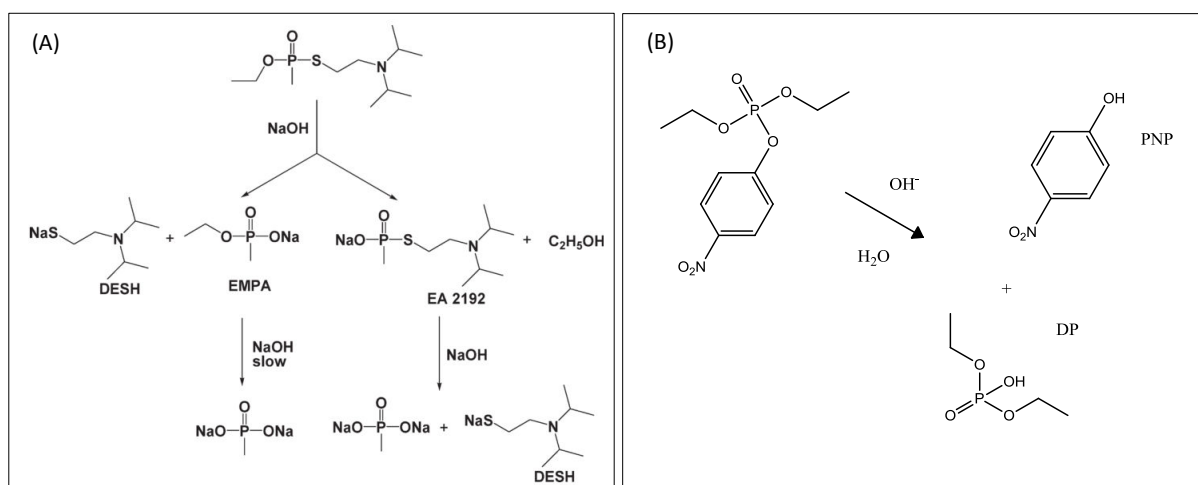


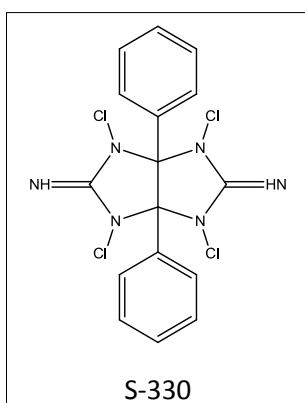
Figure 1-15 : Mécanisme complet de dégradation du VX (A) et du POX (B) par la soude (NaOH).²¹

DESH : diisopropylethyl mercaptoamine ; EMPA : ethyl methylphosphonic acid ; EA 2192 : S-(2-diisopropyl- aminoethyl) methylphosphonothioic acid. PNP : paranitrophenol ; DP : diethyl phosphonate.

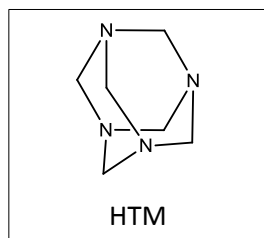
L'Ypérite (vésicant) peut être dégradée de la même manière : substitution nucléophile et élimination en milieu acide, hydrolyse autocatalytique dans l'eau mais la principale reste l'oxydation du soufre puis l'élimination des sous-produits en milieu basique.

4.3.2. Les molécules « actives » à incorporer dans les aTSP

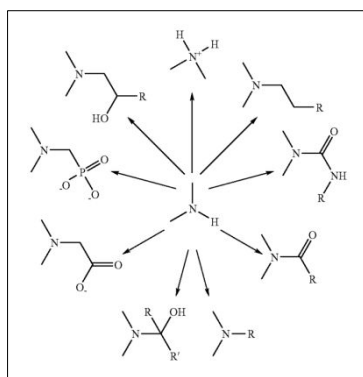
La dégradation des agents chimiques de guerre peut se faire également à l'aide de molécules plus complexes qui vont pouvoir être incorporées dans des formules à but de protection active.



La **molécule organique S-330** incorporée dans une matrice polymérique perfluorée a montré une efficacité significative pour la dégradation de l'Ypérite par oxydation/dehydrohalogénéation⁷³. Aucun effet significatif contre les agents V n'a été observé. Parmi les 6 formules réalisées la meilleure sélectionnée est composée de 10% S-300, 54% PFPE et 36% PTFE et réduit l'apparition des érythèmes jusqu'à 60min après exposition à des vapeurs d'Ypérite (porc *in vivo*). Sans S-330, l'intervalle de temps est réduit à 5min pour la SERPAWA, l'addition de S-330 dans cette matrice permet donc d'augmenter l'efficacité de cette formule par 12. Cependant, la difficulté d'étalement et l'odeur de cette formule n'a pas permis de la retenir comme aTSP pertinent.

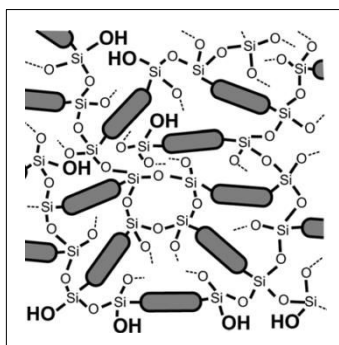


L'**hexaméthylènetétramine (HTM)** possèdent quatre azotes nucléophiles et peut donc plus facilement dégrader les toxiques comparés aux ligands soufrés monofonctionnels⁷⁴. Testé sur épiderme isolé en cellules de Franz, l'HTM seul permet de retarder la pénétration de l'Ypérite : diminution de la pénétration à 48h (42±14% du contrôle non protégé) mais pas du flux maximum. Intégrée dans Stokoderm (20:80 p/p), elle est encore plus efficace car la pénétration est à la fois retardée et diminuée (17±3% du contrôle).



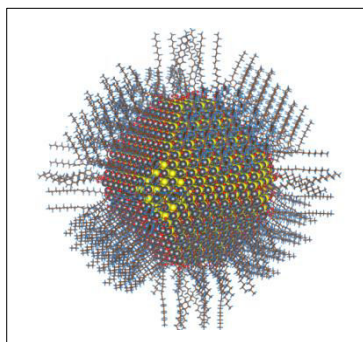
Les **polyalkylènes imines** introduits dans une formulation à base de PTFE/PFPE et comparé à la SERPACWA réduisent la pénétration de l'Ypérite et du VX⁷⁵. Vis-à-vis de l'Ypérite, il peut la dégrader par alkylation, hydrolyse ou dehydrohalogénéation. Vis-à-vis des OPs la dégradation peut se faire soit en agissant comme des nucléophiles (substitution puis élimination) soit accélérer l'hydrolyse en milieu basique.

Se basant sur la défense naturelle du corps humain les premières molécules pourraient être également des **enzymes**. La présence d'estérase de type A (acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase et carboxylestérase, cibles des OPs) dans des TPC permettrait de les piéger au sein de la formule et limiterait donc leur contact avec la peau. D'autres estérases comme la Paraoxonase sont capables d'hydrolyser les OPs par oxydation⁷⁶. Cependant, l'activité d'une enzyme est difficile à conserver et nécessiterait des conditions spéciales de stockages et transport.



Les **polysilsesquioxanes** (POSS) sont des composés organiques-inorganiques de formule brute $(\text{RSiO}_{3/2})_n$ ($n = 6-18$) dont l'agencement prend une architecture de type cage leur conférant une grande surface active ($850\text{m}^2/\text{g}$)⁷⁷⁻⁷⁹. Ces molécules ont une double activité : la structuration permet le piégeage des agents chimiques de guerre et les groupements R peuvent porter des fonctions catalytiques pour initier leur dégradation. De plus, la possibilité d'ajouter des groupements R organiques facilite leur incorporation dans une matrice organique comme par exemple la SERPACWA. Ils présentent une efficacité similaire vis-à-vis de l'Ypérite sous forme liquide ou vaporisée mais également contre les neurotoxiques comme le soman⁷⁹. La neutralisation de l'Ypérite par les POSS se fait par hydrolyse ou déhydrohalogénéation et celle du soman par hydrolyse.

Les **polyoxométallates** (POM) sont des composés organométalliques et forment des clusters à trois dimensions qui peuvent comme les POSS piéger et neutraliser les toxiques. La détoxification est plus active vis-à-vis de l'Ypérite ($T_{1/2} = 13\text{h}$) que vis-à-vis des NOPs (soman et VX, $T_{1/2} > 1\text{jour}$)⁸⁰. L'Ypérite peut être dégradée par catalyse de l'oxydation du soufre ou dehydrohalogénéation⁸¹. L'intégration de ces actifs dans des formules à base de polymères fluorés a montré de bons résultats *in vitro*. *In vivo* sur porc la meilleure formule (5% $\text{H}_5\text{PV}_{2\text{Mo}}10\text{O}40$ on CeO_2 , 47% PFPE, 48% PTFE) a montré 29% de réduction des érythèmes par rapport au contrôle⁸¹.



Les **nanoparticules** (NPs) sont des éléments dont la taille varie entre 1 et 100nm. En raison de leur petite taille, elles possèdent une grande surface spécifique et un grand nombre de sites réactifs. Elles sont donc des ingrédients très intéressants pour la mise au point de nouveaux aTSP car elles ont la capacité d'à la fois adsorber/piéger physiquement en surface le toxique et de le dégrader lorsqu'elles possèdent des fonctions catalytiques.

Du fait de leur taille et de leur réactivité, la toxicité liée aux NPs est largement discutée car elles sont suspectées de passer les barrières biologiques pour atteindre la circulation sanguine et s'accumuler dans les organes internes. Cependant, leur toxicité pour la santé humaine et l'environnement reste encore aujourd'hui très controversée. Les nanoparticules d'oxydes métalliques peuvent relarguer des oxydes de métaux, c'est d'ailleurs pour cela que les NPs d'argent sont utilisées dans les produits bactéricides⁸²⁻⁸⁴.

Dans le cas d'une crème appliquée sur la peau, les NPs auront un effet toxique si elles passent la barrière cutanée et rejoignent la circulation sanguine. Concernant cette voie d'absorption dans l'organisme les études sont encore très divisées. En effet, certaines études menées sur des NPs d'argent montrent que les nanoparticules passent la barrière épidermique et forment des agrégats dans le derme⁸⁵ et peuvent atteindre la circulation sanguine⁸². Les NPs sont particulièrement utilisées dans l'industrie cosmétique et notamment celles de titane et de zinc pour la formulation de crèmes solaires où elles sont utilisées comme filtres solaires pour refléter les rayons UV. Elles ont remplacé leur équivalent de taille micronique en raison de leurs meilleures propriétés organoleptiques et d'efficacité. Dans le cas de ces NPs il a été montré qu'elles ne peuvent pas ou peu s'accumuler, elles atteignent au pire les couches les plus externes du *stratum corneum*^{83,86}. Le projet européen NANODERM (2007) a permis de démontrer la sécurité des produits solaires vis-à-vis des NPs de titane et de zinc utilisées sur des peaux saines⁸⁷.

Le potentiel toxique des NPs pour l'environnement n'est également pas encore déterminé. Leur toxicité pourrait être liée à deux paramètres différents : (1) leur toxicité intrinsèque et (2) leur capacité à absorber les polluants et à les relarguer une fois bioaccumulées^{88,89}. Dans le cas de l'utilisation de NPs dans les aTSP il faudra donc faire particulièrement attention à la décontamination et éviter le relargage dans l'environnement. C'est au niveau de leur capacité à se bioaccumuler que les études divergent : certaines prouvent l'accumulation de TiO_2 , ZnO et CeO_2 dans les organismes (*Nitrosomonas europaea*, bactérie à Gram-) ⁹⁰ tandis que d'autres montrent le contraire (*Tetrahymena thermophila*, protozoaire cilié)⁸⁸. Une récente review met en évidence la non harmonisation des protocoles et des modèles utilisés pour les études de toxicité environnementale qui ne permettent pas, à ce jour, de conclure à une toxicité ou une non toxicité des NPs de titane par exemple⁹¹.

Les NPs d'aluminium (Al_2O_3), calcium (CaO), magnésium (MgO) ou encore de titane anatase (TiO_2) et de fer ont toutes la capacité de dégrader autant les vésicants (Ypérite) que les neurotoxiques (soman, sarin et VX)⁹²⁻⁹⁵. L'avantage de l'utilisation des nanoparticules est d'ailleurs d'éviter la formation du composé de dégradation du VX EA-2192 qui est toxique (Figure 1-16). Il a été également démontré que les nanoparticules de titane et de fer sont plus efficaces que les

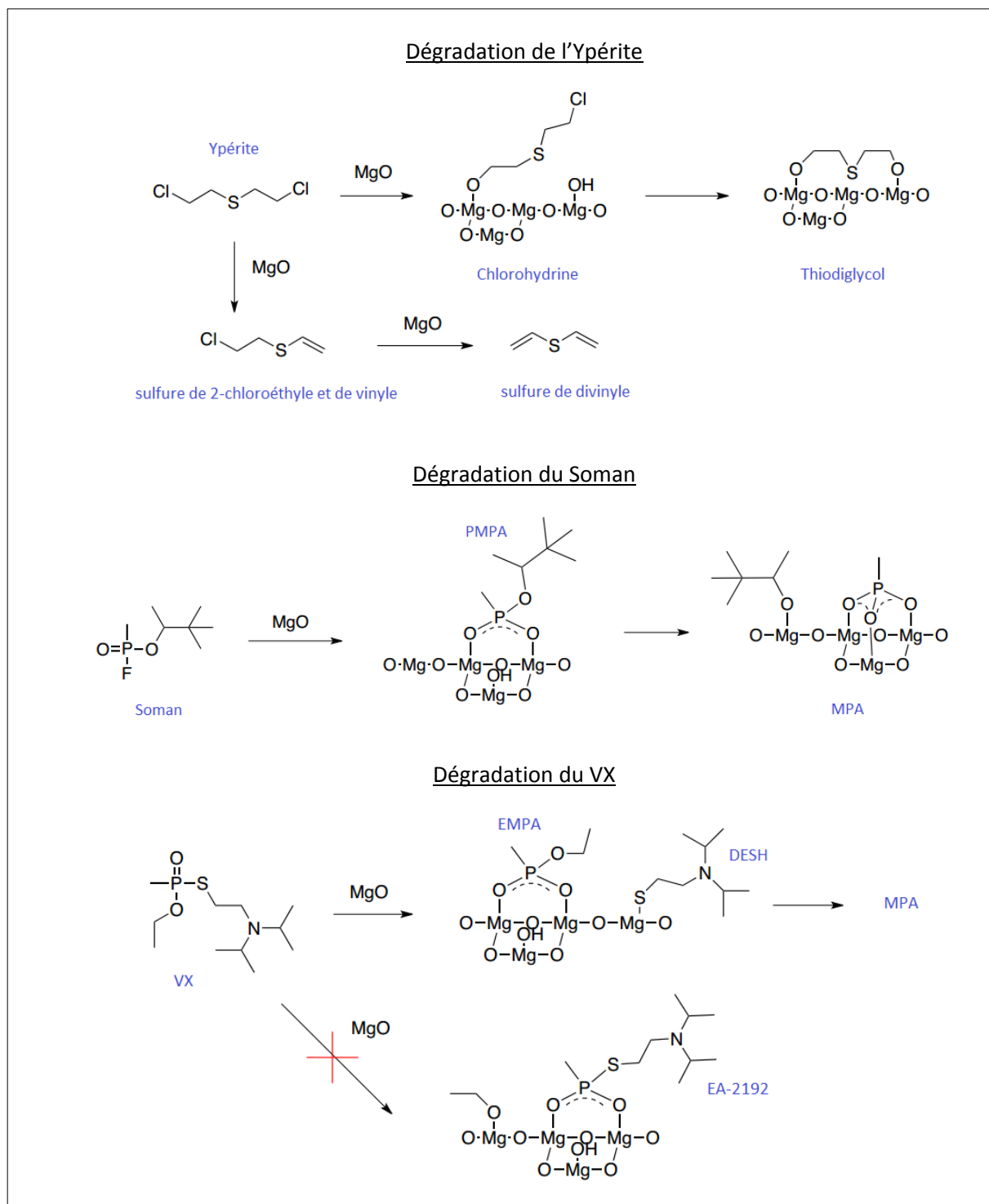


Figure 1-16 : Mécanisme de dégradation des agents chimiques de guerre par les nanoparticules. ^{92-94,96}

MPA : methylphosphonic acid ; *PMPA* : pinacolyl methylphosphonic acid ; *DESH* : diisopropylethyl mercaptoamine ; *EMPA* : ethyl methylphosphonic acid ; *EA 2192* : S-(2-diisopropyl- aminoethyl) methylphosphonothioic acid.

NPs de magnésium pour la dégradation d'Ypérite, du soman et du VX⁹⁵. Egalement, les NPs de silice (SiO₂) peuvent être utilisées pour la décontamination comme véhicule en les imprégnant de produit de décontamination⁹⁷. Dans tous les cas la présence d'eau joue un rôle crucial dans la dégradation des agents chimiques. L'utilisation des propriétés photocatalytiques de certaines NPs peut également être une voie d'amélioration de la dégradation des toxiques. Déjà utilisée comme méthode de dégradation de nombreux polluants⁹⁸⁻¹⁰¹, les NPs peuvent également mieux dégrader l'Ypérite^{102,103} et les organophosphorés⁹⁹ et encore plus si elles sont dopées¹⁰⁴.

Intégré dans des TPC, elles ont également montré une certaine efficacité. Hobson et ses collaborateurs¹⁰⁵ ont montré que les NPs de MgO et TiO₂ intégrées dans une matrice composées de polymères fluorés (PTFE + PFPE) permettaient de réduire la pénétration *in vitro* de soman de 99%. Ils ont également montré que les NPs de MgO, ZnO et TiO₂ étaient autant efficaces contre les vapeurs que l'Ypérite que sous sa forme liquide (*in vitro*). De plus, ils ont vérifié qu'après intégration dans les aTSP, les NPs conservaient leur efficacité de dégradation contre le soman, le VX et l'Ypérite. Cependant, les tests *in vivo* sur porc n'ont pas permis de confirmer l'efficacité des nouveaux aTSP. Ils ont également essayé d'associer les NPs et POM au sein d'un même topique, les résultats ont été similaires aux aTSP contenant seulement des NPs : de très bon résultats *in vitro* mais non confirmés *in vivo* sur porc¹⁰⁶. Plus récemment l'intégration des NPs de cérine (CeO₂) dans des émulsions huile dans eau (H/E) contenant des polymères perfluorés, des silicones et de la paraffine a montré une efficacité protectrice : la pénétration du POX est diminuée d'un facteur 3 sur membranes siliconées¹⁰⁷. Une autre idée développée au laboratoire est d'associer de manière covalente des NPs avec des polymères perfluorés modificateurs de rhéologie. Cette association est prometteuse car elle permet (1) d'allier à la fois les propriétés de répulsion des polymères perfluorés et les propriétés d'absorption ou de dégradation des NPs en conservant la surface active des objets nanométriques ; (2) de diminuer l'impact écologique des NPs de silice¹⁰⁸ et (3) d'utiliser le principe actif sans additif du fait de la formation du gel par le polymère modificateur de rhéologie. Ces nouveaux composés ont montré une efficacité certaine⁹⁶ : la pénétration du POX est réduite d'un facteur 4 pour des polymères greffés avec des NPs de silice ou cérine. Cependant, ils ont présenté le désavantage de ne pas être homogènes au séchage car le dépôt en surface craquèle. Il serait intéressant donc d'intégrer ces nouveaux composés dans des formules en vue de développer de nouveaux aTSP.

V. OBJECTIFS DE NOTRE ÉTUDE

L'incorporation de molécules dites actives semble donc une voie pertinente pour l'amélioration continue de la recherche sur les topiques protecteurs cutanés. De précédentes études ont permis de mettre en valeur l'efficacité protectrice de NPs de silice ou cérine greffées en réseau à des polymères modificateurs de rhéologie (HASE-F-RF8)^{96,107,109}. En effet, l'association covalente de ces deux types de principes actifs permet (1) d'allier à la fois les propriétés de protection/décontamination des NPs et des polymères en conservant la surface active libre des NPs (bonne dispersion en solution et dans les dépôts en surface)¹¹⁰ et (2) d'éliminer la toxicité environnementale des NPs libres puisque greffées à des macromolécules elles ne peuvent plus aussi facilement pénétrer dans les organismes et s'y accumuler¹⁰⁸.

Cependant, ces nouveaux nanocomposites ne sont pas utilisables tels quels car ils craquèlent au séchage et n'offrent donc pas de fonction barrière complète (Figure 1-17). L'homogénéité des dépôts en surface n'est donc pas suffisante impactant ainsi la reproductibilité des résultats d'efficacité.

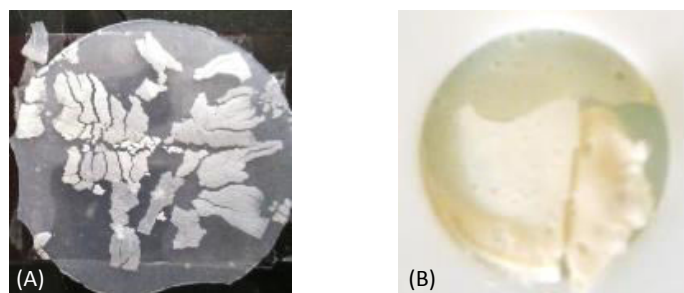


Figure 1-17 : Craquèlement des dépôts de polymère au séchage.

Polymère greffé avec des nanoparticules de silice (A) et de cérine : B).

Il semble donc nécessaire d'intégrer ces nanocomposites dans des formules stables conservant la dispersion homogène des nanoparticules par le polymère et permettant la formation de dépôts filmogènes en surface de la peau pour offrir une meilleure barrière aux toxiques.

L'objectif de ce travail de thèse est donc de développer de nouveaux TPC à base de réseau polymériques de nanoparticules performants contre la pénétration d'agents chimiques toxiques. Ce travail de thèse se découpe en 5 parties. Le **Chapitre 2** se focalisera sur l'optimisation de la synthèse et l'amélioration des actifs HASE-F-RF8/NPs. La synthèse de ces polymères prend actuellement 21 jours pour 20g de polymères greffés¹¹⁰⁻¹¹². Dans le cadre d'une future industrialisation, il semble intéressant d'optimiser le processus de synthèse. Ces polymères greffés ne présentent actuellement

aucune propriété oléophobe (angle de contact 60-70°), la deuxième partie du chapitre présentera la possibilité de greffer d'autres composés fluorocarbonés au polymère actuel en vue d'améliorer ces propriétés oléophobes et protectrices. Le **Chapitre 3** concernera l'évaluation de la biocompatibilité (avec une utilisation cutanée) et de l'écocompatibilité des nouveaux composites en vue d'une utilisation à la fois par des civils ou des militaires et d'une application à plus large échelle. Le **Chapitre 4** décrira les différentes formules réalisées à base de polymères greffés avec des nanoparticules de silice ou de cérine et de leur pré screening sur membranes siliconées. Le paraoxon a été utilisé comme simulant du VX pour sa facilité de mise en œuvre liée à une moindre toxicité. Deux formules se sont montrées très efficace vis-à-vis de la pénétration du paraoxon, le **Chapitre 5** présentera une étude détaillée des deux crèmes candidates concernant l'impact sur l'efficacité des nanoparticules, des ingrédients et de différents paramètres comme l'occlusion. C'est également dans ce chapitre que l'efficacité sur explants de peau humaine sera validée. De plus, au cours de cette thèse j'ai pu expérimenter de près la difficulté de l'accès aux explants de peaux de cochon (nécessite un certain savoir-faire et du matériel spécifique) et humaines (le peu de donneur disponible rend la production faible, longue et très coûteuse). J'ai donc décidé d'essayer de développer une nouvelle méthode pour l'évaluation de l'efficacité des TPC candidats. Mon choix s'est orienté vers les épidermes humains reconstruits actuellement validés pour la corrosion et l'irritation comme modèles alternatifs pertinent aux études *in vivo*^{113,114}. Le **Chapitre 6** constituera un début d'étude concernant l'évaluation de la perméabilité et de la capacité des épidermes à identifier correctement des TPC candidats.

Références bibliographiques

1. Organization for the Prohibition of Chemical Weapons. Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on Their Destruction. (1993).
2. Les armes chimiques avant 1914. Site du centre de défense Nucléaire Biologique et Chimique. <http://www.cdnbc.terre.defense.gouv.fr> (2009).
3. Textbook of Military Medicine. Chapter 2: History of Chemical and biological warfare: an american perspective. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. *Pages 9-86 (Eds: F. Sidel, E. Takafuji, D. Franz)* (1997).
4. Historique de la non-prolifération chimique. Du site de l'Institut de la Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN). <http://non-prolifération.irsnn.fr/> (2011).
5. Protocole concernant la prohibition d'emploi à la guerre de gaz asphyxiants, toxiques ou similaires et de moyens bactériologiques. <http://www.icrc.org/> (1925).
6. Nakajima, T., Sato, S., Morita, H. & Yanagisawa, N. Sarin poisoning of a rescue team in the Matsumoto sarin incident in Japan. *Occup. Environ. Med.* **54**, 697–701 (1997).
7. Masuda, N. *et al.* Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* **345**, 1446–1447 (1995).
8. *Rapport d'information n°429 (2000-2001) de M. Jacques MACHET, fait au nom de la commission des lois, déposé le 5 juillet 2001. M. Christophe Pezron directeur du programme SECOIA à la Délégation Générale pour l'Armement.* (2001).
9. Yáñez, L. *et al.* Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environ. Health Perspect.* **110**, 901–909 (2002).
10. Public health impact of pesticides used in agriculture. A report from the World Health Organization. (1990).
11. Exposure to highly hazardous pesticides: a major public health concern. A report from the World Health Organization. (2010).
12. Règlement (CE) N°1107/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil. *J. Off. l'Union Eur.* (2009).
13. Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France. Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire. Disponible en ligne. <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>
14. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Chapter 8: Mustards and Vesicants. *Pages 93-108 (Ed: R. Gupta)* (2009).
15. Potential military chemical/biological agents and compounds. Chapter 2: Chemical agents and their properties. *Pages (II-1)-(II-78)* (2005).

16. Test de brulures au gaz moutarde sur l'avant-bras d'un soldat. Photographie de guerre du National Museum of Health and Medicine, Maryland USA (Photo ID: NCP 001057), soldat inconnu.
17. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Chapter 6: Organophosphate Nerve Agents. *Pages 43-67 (Ed: R. Gupta) (2009).*
18. Fiche Piratox n°4 : « Organophosphorés : neurotoxiques de guerre et pesticides ». Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM, *ex-AFSSAPS*) (2010).
19. Convention de Stockholm sur les polluants organiques résistants du 22 mai 2001.
20. The Merck veterinary manual ("Veterinary Professional", "Toxicology", "Insecticide and Acaricide", "Organophosphates (Toxicity)" (Dernière révision par R.C. Gupta en août 2014).
Site web :
http://www.merckvetmanual.com/mvm/toxicology/insecticide_and_acaricide_organic_toxicity/organophosphates_toxicity.html
21. Kim, K., Tsay, O. G., Atwood, D. a & Churchill, D. G. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. *Chem. Rev.* **111**, 5345–5403 (2011).
22. Millerioux, J. *et al.* In vitro selection and efficacy of topical skin protectants against the nerve agent VX. *Toxicol. Vitro.* **23**, 539–545 (2009).
23. Millerioux, J. *et al.* Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicol. Vitro.* **23**, 127–33 (2009).
24. Vallet, V. *et al.* Percutaneous penetration and distribution of VX using in vitro pig or human excised skin validation of demeton-S-methyl as adequate simulant for VX skin permeation investigations. *Toxicology* **246**, 73–82 (2008).
25. Principles and Practice of Skin Toxicology. Chapter 1: Cutaneous anatomy and function. *Pages 3-15 (Eds: R. Chilcott and S. Price) (2008).*
26. Servier Medical Art. Banque d'images en ligne (libre d'utilisation).

Site web : <http://smart.servier.fr/servier-medical-art>
27. Principles and Practice of Skin Toxicology. Chapter 4: Skin as a route of entry. *Pages 71-80 (Eds: R. Chilcott and S. Price) (2008).*
28. Dermatotoxicology. Chapter 4: Anatomical Factors affecting barrier function. *Pages 39-50 (Eds: H. Zhai, K. Wilhelm and H. Maibach) (2007).*
29. Principles and Practice of Skin Toxicology. Chapter 6: Principles of Diffusion and Thermodynamics. *Pages 93-107 (Eds: R. Chilcott and S. Price) (2008).*
30. Delgado-Charro, M. B. & Guy, R. H. Effective use of transdermal drug delivery in children. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **73**, 63–82 (2014).

31. Kalia, Y. N., Nonato, L. B., Lund, C. H. & Guy, R. H. Development of skin barrier function in premature infants. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 320–6 (1998).
32. Dermatotoxicology. Chapter 3: Occlusion and Barrier Function. *Pages 31-37 (Eds: H. Zhai, K. Wilhelm and H. Maibach)* (2007).
33. Principles and Practice of Skin Toxicology. Chapter 5: Physicochemical Factors Affecting Skin Absorption. *Pages 83-91 (Eds: R. Chilcott and S. Price)* (2008).
34. Howes, D. *et al.* Methods for Assessing Percutaneous Absorption. The Report and Recommendation of ECVAM Workshop 13. *ATLA* **24**, 81–106 (1996).
35. Guideline for the testing of chemicals: skin absorption: in vivo method (n°427). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2004).
36. Guideline for the testing of chemicals: skin absorption: in vitro method (n°428). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2004).
37. Boudry, I., Trescos, Y., Vallet, V., Cruz, C. & Lallement, G. Methods and models for percutaneous absorption studies of organophosphates. *Pathol. Biol. (Paris)*. **56**, 292–9 (2008).
38. Bronaugh, R. L., Stewart, R. F. & Congdon, E. R. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62**, 481–8 (1982).
39. Gray, G. M. & Yardley, H. J. Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. *J. Lipid Res.* **16**, 434–40 (1975).
40. Millérioux, J., Cruz, C., Bazire, A., Josse, D. & Lefeuvre, L. Screening and efficacy of barrier creams against organophosphorus compounds: comparison of two in vitro models. Poster (2006).
41. Principles and Practice of Skin Toxicology. Chapter 8: In vitro percutaneous absorption measurements. *Pages 129-148 (Eds: R. Chilcott and S. Price)* (2008).
42. Ley, E. & Bunge, A. Chemical transport in silicone rubber membranes from pure powders and saturated aqueous solutions. *J. Memb. Sci.* **292**, 35–44 (2007).
43. Hymas, R. V, Ho, N. F. H. & Higuchi, W. I. Pharmaceuticals , preformulation and drug delivery transport of a lipophilic ionizable permeant (Capric Acid) across a lipophilic membrane (Silicone Polymer Membrane) from aqueous buffered solutions in the presence of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. **101**, 2340–2352 (2012).
44. Jiang, R., Roberts, M. S., Prankerd, R. J. & Benson, H. a. Percutaneous absorption of sunscreen agents from liquid paraffin: self-association of octyl salicylate and effects on skin flux. *J. Pharm. Sci.* **86**, 791–6 (1997).
45. Ryatt, K., Mobayen, M., Stevenson, J., Maibach, H. & Guy, R. Methodology to measure the transient effect of occlusion on skin penetration and stratum corneum hydration in vivo. *Br. J. Dermatol.* **119**, 307–312 (1988).
46. Barbero, A. M. & Frisch, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro

- penetration studies: a quantitative review. *Toxicol. Vitro.* **23**, 1–13 (2009).
47. Dalton, C. H., Hattersley, I. J., Rutter, S. J. & Chilcott, R. P. Absorption of the nerve agent VX (O-ethyl-S-[2(di-isopropylamino)ethyl] methyl phosphonothioate) through pig, human and guinea pig skin in vitro. *Toxicol. Vitro.* **20**, 1532–6 (2006).
 48. Nouaigui, H., Antoine, J. L., Masmoudi, M. L., Van Neste, D. J. & Lachapelle, J. M. Invasive and non-invasive studies of the protective action of a silicon-containing cream and its excipient in skin irritation induced by sodium laurylsulfate. *Ann. Dermatol. Venereol.* **116**, 389–398 (1989).
 49. Frosch, P. J., Schulze-Dirks, A., Hoffmann, M., Axthelm, I. & Kurte, A. Efficacy of skin barrier creams (I). The repetitive irritation test (RIT) in the guinea pig. *Contact Dermatitis* **28**, 94–100 (1993).
 50. Lachapelle, J., Nouaigui, H. & Marot, L. Experimental study of the effects of a new protective cream against skin irritation provoked by the organic solvents n-hexane, trichlorethylene and toluene. *Dermatologie Beruf und Umwelt* **38**, 19–23 (1990).
 51. Règlement (CE) N°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. *J. Off. l'Union Eur. L* 342/59 (2009).
 52. Proposition de Règlement du Parlement Européen et du Conseil relatif aux dispositifs médicaux, et modifiant la directive 2001/83/CE, le règlement (CE) n°178/2002 et le règlement (CE) n°1223/2009. (2012).
 53. Chilcott, R. P. *et al.* Evaluation of a barrier cream against the chemical warfare agent VX using the domestic white pig. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97**, 35–8 (2005).
 54. Treffel, P., Gabard, B. & Juch, R. Evaluation of barrier creams: an in vitro technique on human skin. *Acta Derm. Venereol.* **74**, 7–11 (1994).
 55. Marks, R., Dykes, P. . & Hamami, I. Two novel techniques for the evaluation of barrier creams. *Br. J. Dermatol.* **120**, 655–60 (1989).
 56. Chilcott, R. P. *et al.* Evaluation of barrier creams against sulphur mustard: (II) In vivo and in vitro studies using the domestic white pig. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **26**, 235–47 (2007).
 57. Kadar, T. *et al.* A Topical Skin Protectant against Chemical Warfare Agents. *Isr. Med. Assoc. J.* **5**, 717–719 (2003).
 58. Reiner, R., Rossmann, K., van Hooideonk, C., Ceulen, C. & Boock, J. Ointments for the protection against organophosphate poisoning. *Arzneimittelforschung* **32**, 630–633 (1982).
 59. Rieger, T. *et al.* Evaluation of barrier creams – introduction and comparison of 3 in vivo methods. *Contact Dermatitis* **56**, 347–354 (2007).
 60. Zissu, D. & Falcy, M. Mise au point d'un test pour évaluer l'efficacité des crèmes barrières. *Ann. Dermatol. Venereol.* **121**, 700–703 (1994).
 61. Liu, D. K., Wannemacher, R. W., Snider, T. H. & Hayes, T. L. Efficacy of the topical skin protectant in advanced development. *J. Appl. Toxicol.* **19**, S40–45 (1999).

62. Kenar, L. *et al.* Evaluation of protective ointments used against dermal effects of nitrogen mustard, a vesicant warfare agent. *Mil. Med.* **170**, 1–6 (2005).
63. Knezevic, D. L., Tadic, V., Cetkovic, S. & Kicic, Z. The efficacy of different formulations of protective-decontaminating ointments based on polyethylene glycol in rats percutaneously poisoned with highly toxic organophosphates. *Vet. Hum. Toxicol.* **35**, 418–420 (1993).
64. Olson, C. T., Feder, P. I., Hobson, D. W., Kiser, R. C. & Joiner, R. L. Evaluation of compounds as barriers to dermal penetration of organophosphates using acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol. Lett.* **55**, 325–334 (1991).
65. Mahmoud, G. & Lachapelle, J. Evaluation of the protective value of an antisolvent gel by laser Doppler flowmetry and histology. *Contact Dermatitis* **13**, 14–19 (1985).
66. Lupulescu, A. & Birmingham, D. Effect of protective agent against lipid-solvent-induced damages. Ultrastructural and scanning electron microscopical study of human epidermis. *Arch. Environ. Health* **31**, 33–36 (1976).
67. Zhai, H. & Maibach, H. I. Effect of barrier creams: human skin in vivo. *Contact Dermatitis* **35**, 92–96 (1996).
68. Langford, N. Fluorochemical resin complexes for use in solvent repellent hand creams. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **39**, 33–40 (1978).
69. Schwartz, L., Warren, L. & Goldman, F. Protective ointment for the prevention of poison ivy dermatitis. *Public Health Rep.* **55**, 1327 (1940).
70. Zhai, H. & Maibach, H. I. Evaluating skin-protective materials against contact irritants and allergens. An in vivo screening human model. *Contact Dermatitis* **38**, 155–158 (1998).
71. Chilcott, R. P., Jenner, J., Hotchkiss, S. A. M. & Rice, P. Evaluation of barrier creams against sulphur mustard. I. In vitro studies using human skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **15**, 225–35 (2002).
72. Millérioux, J. Formulation et évaluation de la stabilité et de l'efficacité de topiques protecteurs vis-à-vis des composés organophosphorés. Thèse de l'Université de Lyon 1 (2009).
73. Braue, E. H., Mershon, M. M., Braue, C. R. & Way, R. A. Active topical skin protectants containg S-330. US Patent 6,472,438 B1 (2002).
74. Jenner, J., Smith, C. N., Chilcott, R. P. & Lindsay, D. Barrier cream comprising hexamethylenetetramine or derivative Thereof. US Patent 6,22,885 B1 (2001).
75. Braue, E. H., Hobson, S. T. & Boecker, J. Active topical skin protectants containing amines, polyalkenimines and / or derivatives. US Patent 7,976,832 B2 (2011).
76. Rochu, D., Chabrière, E. & Masson, P. Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology* **233**, 47–59 (2007).
77. Guizhi Li Hanli Ni, and Charles U. Pittman Jr., L. W. Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS). Polymers and Copolymers: A Review. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **11**, 123–154 (2001).

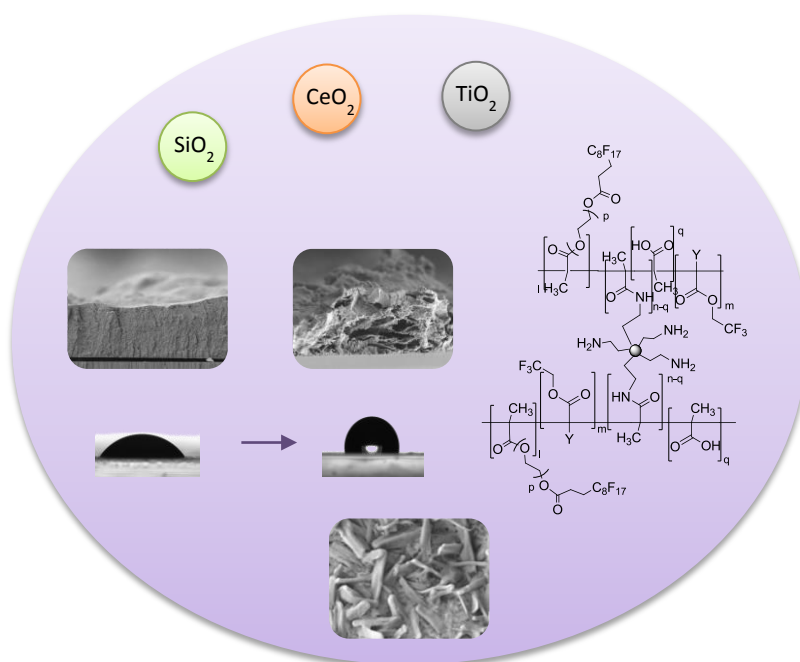
78. Imae, I. *et al.* Oligothiophenes incorporated in a polysilsesquioxane network: application to tunable transparent conductive films. *J. Mater. Chem.* **22**, 16407–16415 (2012).
79. Hobson, S. T., Braue, E. H. & Shea, K. Active topical skin protectants using hybrid organic polysilsesquioxane materials. US Patent 6,417,236 B1 (2002).
80. Peterson, G. W. & Wagner, G. W. Detoxification of chemical warfare agents by CuBTC. *J. Porous Mater.* **21**, 121–126 (2014).
81. Braue, E. H., Hobson, S. T., White, J. & Bley, R. Actives topical skin protectants using polyoxometallates. US Patent 6,420,434 B1 (2002).
82. George, R., Merten, S., Wang, T. T., Kennedy, P. & Maitz, P. In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin. *Australas. J. Dermatol.* **55**, 185–190 (2014).
83. Crosera, M. *et al.* Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of the literature. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **82**, 1043–1055 (2009).
84. Yang, Y., Zhang, C. & Hu, Z. Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion. *Environ. Sci. Process. Impacts* **15**, 39–48 (2013).
85. Bianco, C. *et al.* In vitro percutaneous penetration and characterization of silver from silver-containing textiles. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1899–1908 (2015).
86. Filipe, P. *et al.* Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacol. Physiol.* **22**, 266–75 (2009).
87. Butz, T. *et al.* *NANODERM : Quality of the skin as a barrier to ultra-fine particles.* (2007).
88. Yang, W. *et al.* TiO₂ nanoparticles act as a carrier of Cd bioaccumulation in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 7568–7575 (2014).
89. Gao, J., Bonzongo, J.-C. J., Bitton, G., Li, Y. & Wu, C.-Y. Nanowastes and the environment: using mercury as an example pollutant to assess the environmental fate of chemicals adsorbed onto manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 808–10 (2008).
90. Yu, R., Fang, X., Somasundaran, P. & Chandran, K. Short-term effects of TiO₂, CeO₂, and ZnO nanoparticles on metabolic activities and gene expression of *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere* **128**, 207–215 (2015).
91. Minetto, D., Libralato, G. & Volpi Ghirardini, A. Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: an overview. *Environ. Int.* **66**, 18–27 (2014).
92. Wagner, G. W., Bartram, P. W., Koper, O. & Klabunde, K. J. Reactions of VX, GD, and HD with Nanosize MgO. *J. Phys. Chem.* **103**, 3225–3228 (1999).
93. Wagner, G. W. *et al.* Reactions of VX, GB, GD, and HD with nanosize Al₂O₃. Formation of aluminophosphonates. *Am. Chem. Soc.* **123**, 1636–1644 (2001).
94. Wagner, G. W., Koper, O. B., Lucas, E., Decker, S. & Klabunde, K. J. Reactions of VX, GD, and

- HD with Nanosize CaO: Autocatalytic Dehydrohalogenation of HD. *J. Phys. Chem.* **104**, 5118–5123 (2000).
95. Šteng, V. *et al.* Reaction of sulfur mustard gas, soman and agent VX with nanosized anatase TiO₂ and ferrihydrite. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 754–758 (2005).
 96. Zenerino, A. Nanoparticules polymérisées en réseau actif ou bioactif pour la protection ou la décontamination. Thèse de l'Université Nice Sophia Antipolis (2012).
 97. Saxena, A., Srivastava, A. K., Singh, B. & Goyal, A. Removal of sulphur mustard, sarin and simulants on impregnated silica nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* **211-212**, 226–232 (2012).
 98. Zhang, Y., Zhou, Z., Chen, T., Wang, H. & Lu, W. Graphene TiO₂ nanocomposites with high photocatalytic activity for the degradation of sodium pentachlorophenol. *J. Environ. Sci.* **26**, 2114–2122 (2014).
 99. Kadam, A. N., Dhabbe, R. S., Kokate, M. R., Gaikwad, Y. B. & Garadkar, K. M. Preparation of N doped TiO₂ via microwave-assisted method and its photocatalytic activity for degradation of Malathion. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **133**, 669–676 (2014).
 100. Gomathi Devi, L. N. & Krishnamurthy, G. Photocatalytic degradation of the herbicide pendimethalin using nanoparticles of BaTiO₃/TiO₂ prepared by gel to crystalline conversion method: a kinetic approach. *J. Environ. Sci. Health. B.* **43**, 553–61 (2008).
 101. Chen, H., Shen, M., Chen, R., Dai, K. & Peng, T. Photocatalytic degradation of commercial methyl parathion in aqueous suspension containing La-doped TiO₂ nanoparticles. *Environ. Technol.* **32**, 1515–22 (2011).
 102. Martyanov, I. & Klabunde, K. J. Photocatalytic oxidation of gaseous 2-Chloroethyl Ethyl Sulfide over TiO₂. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 3448–3453 (2003).
 103. Thompson, T. L., Panayotov, D. a., Yates, J. T., Martyanov, I. & Klabunde, K. Photodecomposition of adsorbed 2-chloroethyl ethyl sulfide on TiO₂: Involvement of lattice oxygen. *J. Phys. Chem. B* **108**, 17857–17865 (2004).
 104. Neațu, S. *et al.* Photo-degradation of yperite over V, Fe and Mn-doped titania-silica photocatalysts. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6562–6570 (2008).
 105. Hobson, S. T. *et al.* Active topical skin protectants using reactive nanoparticles. US Patent 6,403,653 B1 (2002).
 106. Hobson, S. T. *et al.* Active topical skin protectants using combinations of reactive nanoparticles and polyoxometalates or metal salts. US Patent 6,410,603 B1 (2002).
 107. Boutard, T. Synthèse et caractérisation de dioxyde de cérium nanométrique : Applications à la protection topique contre les agents chimiques de guerre et civils et à la photoprotection topique. Thèse de l'Université d'Orléans (2013).
 108. Clément, L. *et al.* Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **450-451**, 120–8 (2013).

109. Zenerino, A. *et al.* New CeO₂ nanoparticles-based topical formulations for the skin protection against organophosphates. *Toxicol. Rep.* **2**, 1007–1013 (in press).
110. Zenerino, A., Amigoni, S., Taffin de Givenchy, E., Josse, D. & Guittard, F. New fluorinated hybrid organic/inorganic water soluble polymeric network. *Polymer*. **54**, 6089–6095 (2013).
111. Guittard, F., Amigoni, S., Taffin de Givenchy, E., Zenerino, A. & Josse, D. Nanoparticules polymérisées en réseau actif ou bioactif, topiques protecteurs, leurs procédés de préparation et leurs utilisations. FR patent PCT/FR14/000043 (2013).
112. Amigoni, S. *et al.* Nanoparticules de cérine polymérisées en réseau actif ou bioactif, topiques protecteurs, leurs procédés de préparation et leurs utilisations. FR Patent, PCT/FR2014/000167 (2013).
113. Guideline for the testing of chemicals. In vitro skin irritation : Reconstructed Human Epidermis test method (n°439). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2010).
114. Guideline for the testing of chemicals: skin corrosion: in vitro method (n°431). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2004).

CHAPITRE 2

Optimisation de la synthèse et production des actifs polymères



Les actifs précédemment synthétisés au laboratoire^{1,2} et sélectionnés pour la suite de ce projet sont des polymères HASE-F-RF8 greffés avec des nanoparticules de dioxyde de silice (SiO_2), de dioxyde de cérium (CeO_2) ou de dioxyde de titane (TiO_2) appelés respectivement P_{Si}, P_{Ce} et P_{Ti} (Figure 2-1). Le greffage des nanoparticules à des réseaux polymériques est une recherche en pleine expansion concernant de nombreuses applications comme l'amélioration des propriétés optiques et mécaniques des composites^{3,4}. Le greffage covalent de nanoparticules à un polymère est très intéressante pour notre application puisqu'il permet une dispersion stable et individuelle des nanoparticules dans l'eau à pH 7^{2,5}. En effet, les polymères HASE-F-RF8 sont des polymères modificateurs de rhéologie de type HASE (Hydrophobically Alkali-Soluble Emulsions) comportant de courtes (CF_3) et de longues (C_8F_{17}) chaînes fluorées. Les polymères HASE sont classiquement constitués d'acide méthacrylique (AM), d'acrylate d'éthyle (AE) et d'un macromonomère comportant un chaînon hydrophobe séparé du squelette polymérique par une chaîne en polyéthylène glycol (PEG). Ce sont des polymères associatifs et leur dispersion dans l'eau (en général à un pH > 6) permet la formation d'un réseau tridimensionnel modifiant la rhéologie d'une solution aqueuse, on parle alors de gel aqueux⁶⁻⁸. Le remplacement de l'acrylate d'éthyle par une chaîne trifluoroéthyle (AF, CF_3) ne change pas le comportement modificateur de rhéologie du polymère en comparaison à la référence HASE hydrocarbonée². Cette modification de rhéologie est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux paramètres physiques et chimiques et peut être expliquée par les mécanismes suivants (Figure 2-1) :

- La neutralisation des fonctions acides du polymère permet la formation des fonctions COO^- de l'AM. L'apparition de ces charges négatives génère des répulsions électrostatiques entre les chaînes de polymère induisant leur déploiement dans l'eau. On parle de gonflement du polymère dans l'eau ou d'augmentation du volume hydrodynamique.
- De plus, en solution aqueuse, les chaînons hydrophobes du polymère vont s'associer entre eux dans le but de minimiser au maximum leur contact avec l'eau. Cette auto-associativité des polymères HASE contribue à la formation d'un réseau structuré ou gel tridimensionnel.

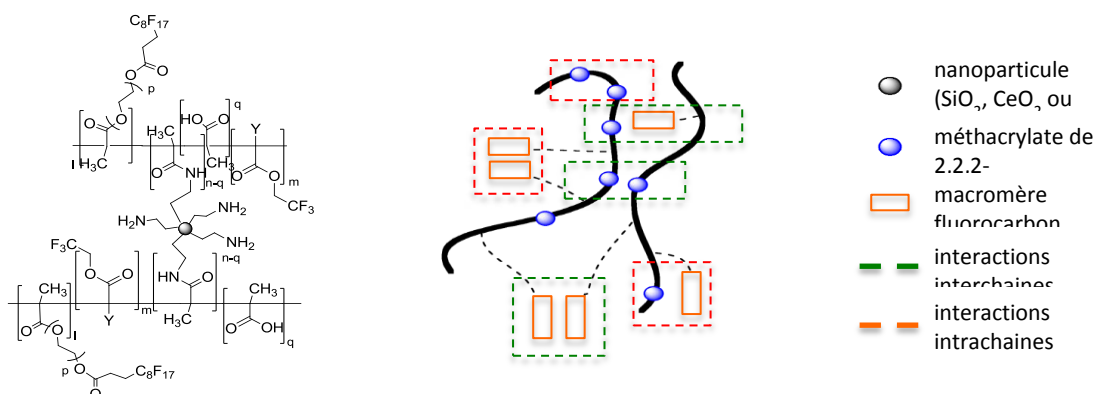


Figure 2-1 : Polymère HASE-F-RF8 greffé (gauche) et schéma des interactions possibles lors de la formation du réseau 3D en solution aqueuse basique (droite).

Ces polymères hautement fluorés présentent des propriétés intéressantes de mouillabilité lorsqu'ils sont déposés sur une surface modèle. La mouillabilité est la capacité d'un matériau à repousser un liquide. La mouillabilité se caractérise par **l'angle de contact à l'interface liquide/solide/vapeur** que forme la goutte déposée sur une surface (Figure 2-2). Dans le cas de notre application, l'étude de la mouillabilité paraît intéressante car la limitation de la surface de contact entre le toxique et la peau pourrait être un moyen de limiter sa pénétration.

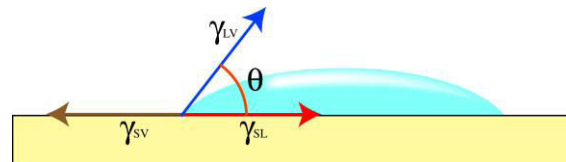


Figure 2-2 : Mesure de l'angle de contact à l'interface liquide/solide/vapeur (modèle de Young).

Considérons une goutte de liquide sur une surface lisse à atmosphère ambiante (le liquide et la surface sont donc au contact de l'air), l'angle de contact mesuré correspond à un angle à l'équilibre qui est défini par l'équation de **Young**⁹ (équation 4). Un matériau ayant une faible mouillabilité présentera un angle de contact très élevé et à l'inverse un matériau mouillable présentera un angle de contact faible signifiant que la goutte s'étale à la surface. L'angle de contact défini par cette relation permet le classement des surfaces élaborées : les surfaces ayant un angle de contact inférieur à 90° sont dites hydro- ou oléophile (selon le liquide sonde utilisé), supérieur à 90° hydro- ou oléophobe et excédant 150°C superhydro- ou oléophobe.

$$\cos \theta_y = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}} \quad (eq.4)$$

Où θ_y est l'angle de contact apparent à l'équilibre (en °) et γ_{sv} , γ_{sl} et γ_{lv} représentent les tensions superficielles entre les phases solide/vapeur, solide/liquide et liquide/vapeur.

La mouillabilité d'une surface est fonction de deux facteurs : la composition **chimique** qui constitue les caractéristiques intrinsèques de la surface et la **structuration**. Les composés fluorés présentent les meilleures propriétés de répulsion. En effet, dans le cas de surfaces lisses l'hydro- et oléophobie peuvent être atteintes¹⁰.

Le cas d'une surface rugueuse ne peut être expliqué par la seule équation de Young. D'autres théories ont été élaborées pour prendre en compte l'impact de la structuration de surface. Le modèle de **Wenzel**¹¹ décrit le cas d'une goutte qui épouse les aspérités de la surface et est régi par

l'équation 5 qui prend en compte le paramètre de rugosité r (r = surface réelle / surface apparente) (Figure 2-3). La rugosité permet donc d'augmenter l'angle de contact du matériau ($r > 1$). Le modèle **Cassie-Baxter**¹² décrit, lui, le cas d'une goutte qui emprisonne dans la surface des bulles d'air (Figure 2-3). L'angle de contact apparent est fonction de la fraction solide (φ_s) en contact avec la goutte ($\varphi_s \cos \theta^y$) auquel on retire la fraction d'air emprisonné sous la goutte ($1 - \varphi_s$) (équation 6).

Dans le cas d'un état de Wenzel, la goutte adhère à la surface puisqu'elle s'accroche dans les aspérités. Si l'angle de contact est élevé, on parlera alors de comportement parahydro/oléophobe ou comportement « collant ». Dans le cas de l'état de Cassie-Baxter, la goutte repose sur les aspérités ainsi la goutte se décrochera plus aisément de la surface tout en conservant sa forme sphérique, on parlera alors de comportement « glissant » ou superhydro/oléophobe.

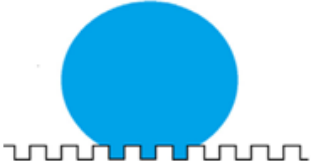
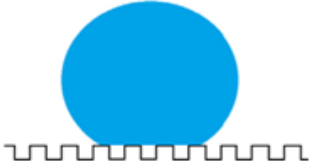
<u>Wenzel</u>	<u>Cassie-Baxter</u>
$\cos \theta^w = r \cdot \cos \theta^y \quad (eq. 5)$	$\cos \theta^{cb} = \varphi_s (\cos \theta^y + 1) - 1 \quad (eq. 6)$
	

Figure 2-3 : Modèles et équations de Wenzel et Cassie-Baxter.

Ces phénomènes sont retrouvés dans la nature. Par exemple, les pétales de rose sont parahydrophobes, les gouttes d'eau sont donc retenues en surface afin de permettre une meilleure hydratation. Au contraire, dans le cas de la feuille de lotus, le comportement superhydrophobe lui confère des propriétés autonettoyantes. La composition en cire (caractéristiques intrinsèques) des pétales de rose et feuilles de lotus mais surtout les structurations micro- et nanométriques participent largement à ces propriétés (Figure 2-4).

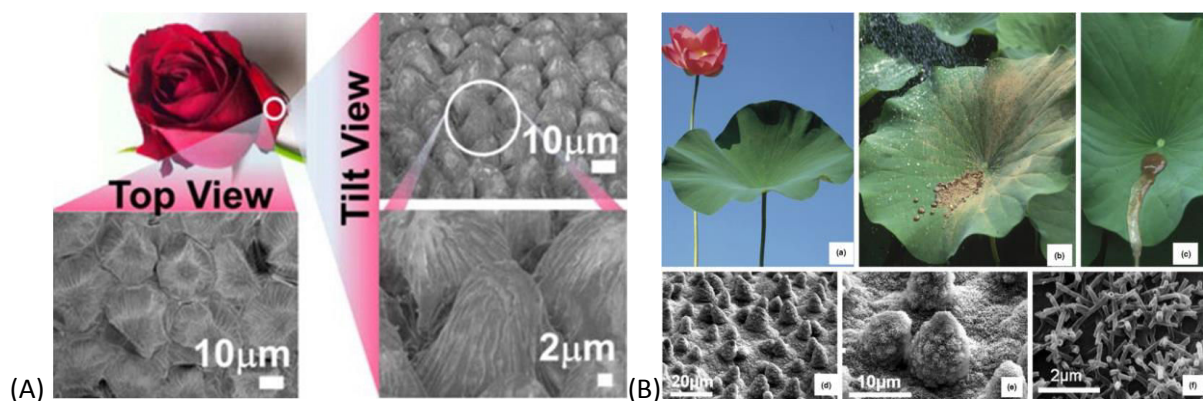


Figure 2-4 : Comportement parahydrophobe des pétales de rose (A) et superhydrophobe des feuilles de lotus (B)¹³.

L'étude de la mouillabilité de dépôts de polymères HASE-F-RF8 montre un angle contact à l'huile proche de entre 70° et 90°, ceux-ci sont donc faiblement oléophobe, c'est pourquoi ils ont été choisis pour notre application de protection topique¹. L'ajout de groupements fluorés supplémentaires à ces polymères pourrait permettre d'augmenter l'angle de contact des polymères à l'huile afin d'atteindre une forte oléophobie et ainsi potentiellement d'augmenter l'efficacité des actifs.

Ce chapitre est composé de trois parties : en premier en vue d'une industrialisation l'optimisation de la **synthèse** du polymère sera présentée puis la possibilité de **greffage** de **nouvelles nanoparticules** telles que des particules de dioxyde de cérium de différentes tailles ou de dioxyde de titane anatase au polymère sera abordée et enfin, l'amélioration des actifs par le **surgreffage** des nanoparticules avec des groupements fluorés sera développée.

I. SYNTHESE DES POLYMERES GREFFES ET OPTIMISATION

La durée de synthèse totale en condition de laboratoire est de 15 jours pour environ 15 à 20g de polymère greffé. Dans le but d'une industrialisation future de ces actifs, une optimisation de la synthèse est nécessaire. La Figure 2-5 suivante représente les différentes étapes de synthèse successive de ces polymères.

1.1. LE MACROMERE MF8

Le macromère MF8 constitue la première étape de synthèse. Il est utilisé pour la synthèse du polymère portant la longue chaîne fluoré RF8. La réaction de synthèse (Figure 2-6) dure 1 nuit suivie de 1 à 2 jours de traitement (filtration sur célite, extraction à l'eau et purification sur colonne chromatographique de silice).

L'optimisation de la synthèse du macromère proposée se situe au niveau des étapes de purification :

- L'étape de filtration sur célite est éliminée. En effet, la célite forme un maillage qui permet d'éliminer les précipités solides. Tout comme la célite, la silice forme un maillage, mais plus serré
- L'étape de purification sur colonne chromatographique est longue et coûteuse. C'est une étape consommatrice de temps et de solvant car le produit doit traverser l'épaisseur de silice de la colonne d'environ 20 à 25cm. Cette méthode est remplacée par l'utilisation d'un fritté dans lequel on charge la silice d'une épaisseur plus fine d'environ 3-4 cm. Les molécules passent donc plus vite et à l'aide de peu de solvant (1,5L contre 5-6L pour une purification sur colonne).

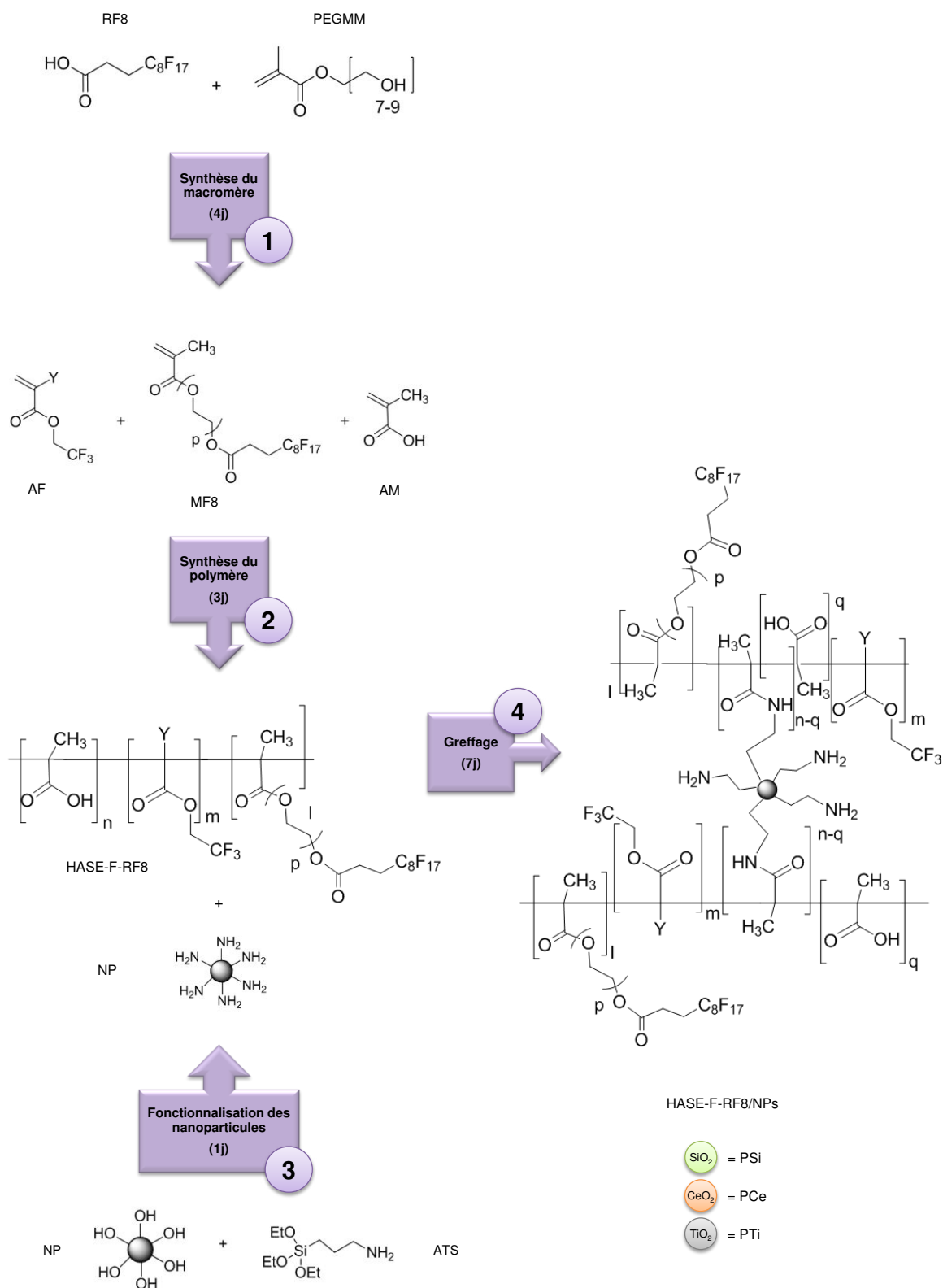


Figure 2-5 : Schéma global de synthèse des actifs greffés.

Les liaisons créées à chaque étape sont mises en évidence par des flèches violettes.

RF8 : acide fluoré en C_8F_{17} ; **PEGMM** : polyéthylène glycol méthyl méthacrylate; **AF** : acrylate fluoré (méthacrylate de 2,2,2-trifluoéthyl); **MF8** : macromère fluoré en C_8F_{17} ; **AM** : acide méthacrylique; **HASE-F-RF8** : polymère fluoré avec des chainons hydrophobes en CF_3 et C_8F_{17} ; **NP** : nanoparticule; **ATS** : (3-aminopropyl)triéthoxysilane; **HASE-F-RF8/NPs** : polymère greffé.

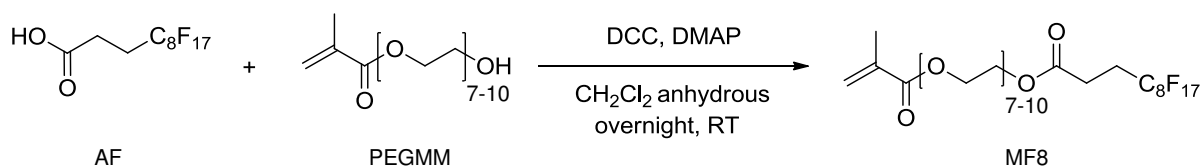


Figure 2-6 : Réaction de synthèse du macromère MF8.

Grâce à cette optimisation le protocole de synthèse du macromère a été réduit de moitié et est le suivant :

- 1- **Réaction** : 1 nuit
- 2- **Traitement** :
 - a. Extraction à l'eau : 1h
 - b. Purification sur fritté de silice: 3h.

Total : 2 jours

L'optimisation détaillée et le protocole sont disponibles en annexe 2.1. L'analyse RMN permet la sélection des composés possédant des motifs de répétition entre 7 et 10.

1.2. LE POLYMER HASE-F-RF8

Le polymère HASE-F-RF8 est obtenu par polymérisation en émulsion selon la réaction suivante (Figure 2-7).

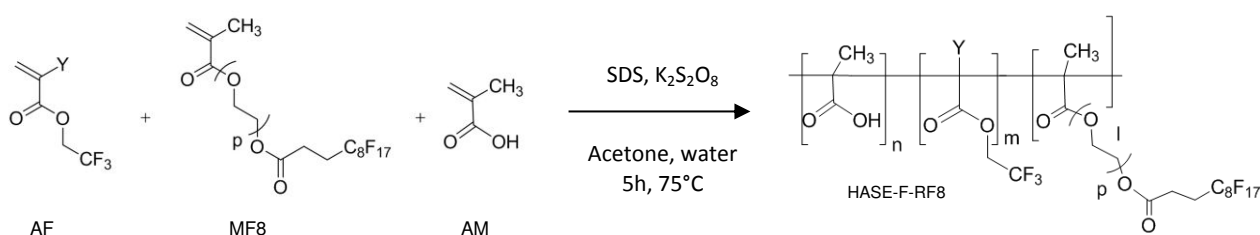


Figure 2-7 : Réaction de synthèse du polymère.

La caractérisation du polymère est réalisée par RMN ^1H et permet d'obtenir le pourcentage molaire de chaque monomère. Les polymères conservés sont ceux contenant $45\pm 9\%$ de AM, $36\pm 5\%$ de AF et $19\pm 7\%$ de MF8. Le rendement de la réaction est d'environ 50-70%.

Les paramètres qui se sont révélés être clefs pour l'obtention des polymères sont l'étanchéité du montage et le contrôle du débit d'azote. En effet, la réaction est une réaction radicalaire sensible à l'air, c'est pourquoi elle est réalisée sous atmosphère inerte et contrôlée. De plus, la température de réaction est également très importante car c'est à 75°C que la réaction s'initie. L'optimisation a

consisté ici en la mise en place d'un réacteur double enveloppe de 500mL permettant un meilleur contrôle de la température. Le volume du réacteur réduit la réaction à 20g de monomères initiaux. L'utilisation de ce réacteur double enveloppe a permis d'obtenir des rendements proches de 90% pour chaque réaction. L'optimisation détaillée et le protocole sont disponibles en annexe 2.2.

1.3. GREFFAGE DES NANOPARTICULES AU POLYMER

Le greffage des nanoparticules (protocole détaillé en annexe 2.4) consiste en la formation d'une liaison amide ($C(=O)-N$) à partir des liaisons amines (NH_2) des nanoparticules fonctionnalisées suivant un protocole déjà mis au point précédemment (annexe 2.3) et des liaisons acides libres ($COOH$) du polymère (Figure 2-8). Cette réaction est longue car elle nécessite un temps de contact nanoparticules – polymère de 5 jours. La liaison covalente formée est très stable, une liaison amide résiste à de très hautes températures.

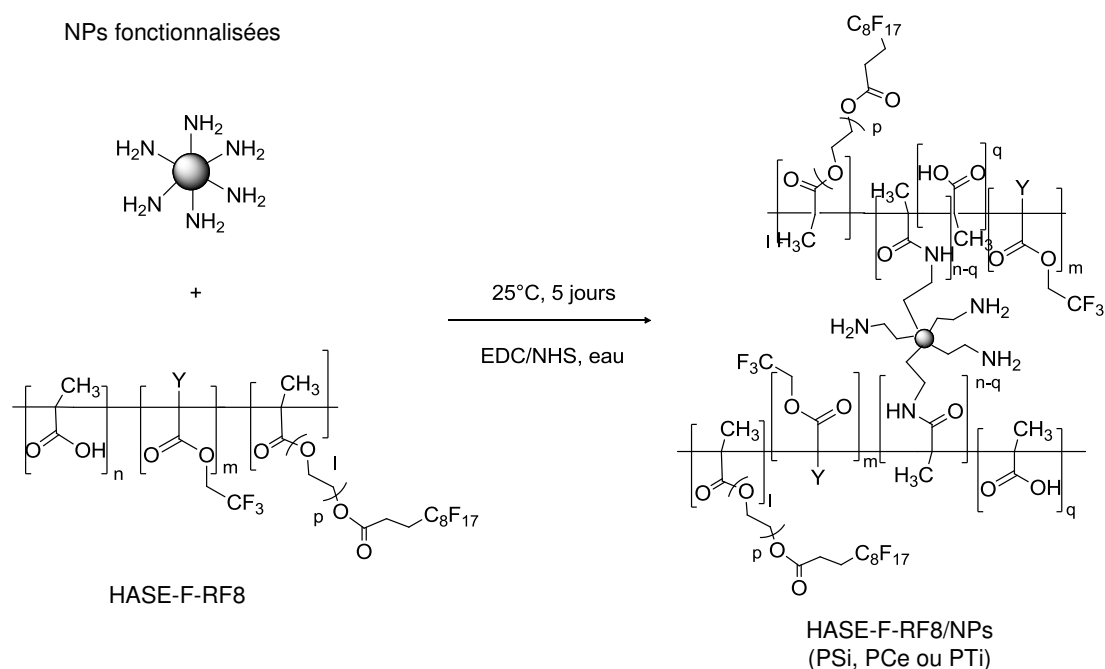


Figure 2-8 : Greffage des nanoparticules fonctionnalisées au polymère HASE-F-RF8.

La caractérisation des polymères PSi, PCe ou PTi respectivement greffés avec des nanoparticules de dioxyde de silice (SiO_2), de dioxyde de cérium (CeO_2) ou de dioxyde de titane (TiO_2) s'analyse par infra-rouge (IR). La formation de la liaison amide est visible par l'apparition de la bande de vibration $C=O$ de l'amide à environ $1645cm^{-1}$ (Figure 2-9, temps 5 jours). L'optimisation consiste ici en une étude temporelle de la formation de la liaison amide. La Figure 2-9 montre les analyses IR réalisées

sur 1, 2, 3, 4 et 5 jours et comparées au polymère non greffé. L'épaule caractéristique de la liaison amide à 1645cm^{-1} n'augmente pas entre 1 et 5 jours, ainsi 24h de réaction sont suffisantes pour réaliser la totalité de la réaction de greffage. **Il est donc possible de réduire le temps de greffage des nanoparticules de 5 jours à 24h.**

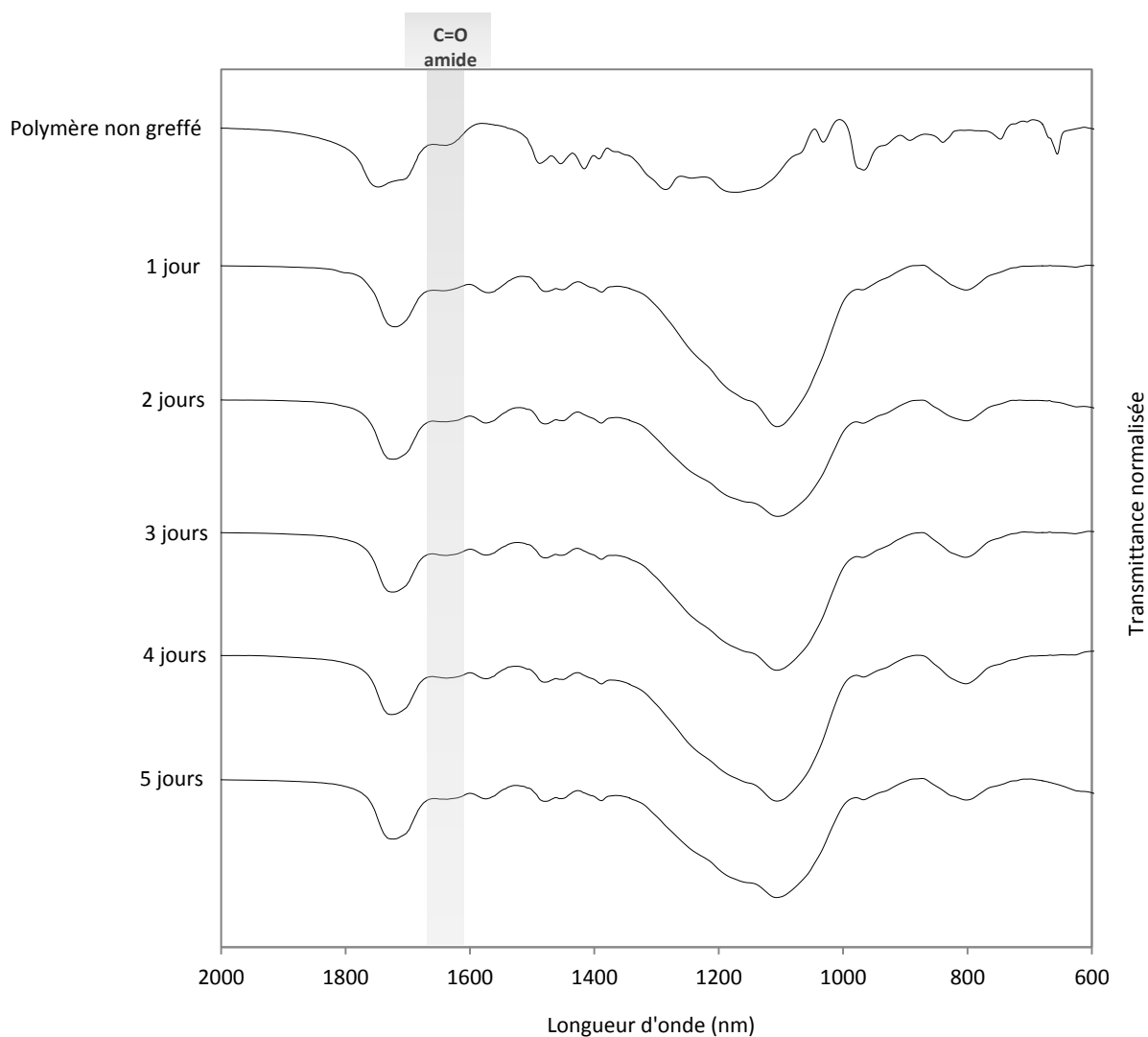


Figure 2-9 : Analyses IR du greffage des nanoparticules au cours du temps.

1.4. PROTOCOLE OPTIMISE

Le protocole a donc été optimisé en terme de durée (la synthèse dure 9 jours au lieu de 15 jours) et de quantité solvant utilisée par réaction (Figure 2-10). Les protocoles détaillés finaux sont disponibles en annexe 2.1 à 2.4.

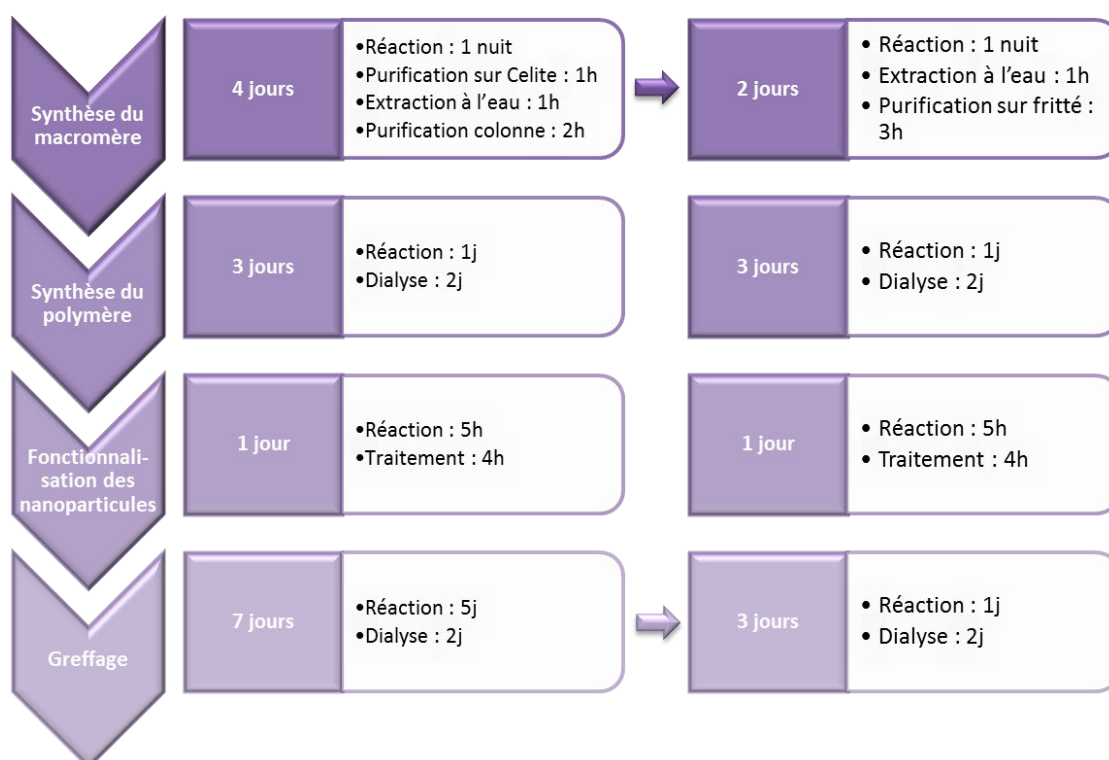


Figure 2-10 : Schéma de l'optimisation de la synthèse des actifs greffés.

II. SYNTHESE DE NOUVEAUX COMPOSES HASE-F-RF8/NPs

Les protocoles étant mis au point, ils peuvent donc être étendus à d'autres types de nanoparticules pour mettre en évidence l'impact de leur nature chimique.

2.1. FONCTIONNALISATION DE NOUVELLES PARTICULES

2.1.1. *Dioxyde de cérium 100 nm*

Les travaux préliminaires réalisés au laboratoire concernant des réseaux polymériques de nanoparticules de dioxyde de cérium ont montré que le polymère HASE-F-RF8/CeO₂ (PCe) présente une efficacité protectrice contre la pénétration du paraoxon^{14,15}. Il serait intéressant de mesurer un effet taille ou dopage de ces nanoparticules de dioxyde de cérium sur l'efficacité. C'est pourquoi des particules de 100nm non dopées et 10nm dopées calcium ont été incluses dans cette étude. Le dioxyde de cérium 100 nm a été fourni par ABC Texture (CERIGUARD SP02, Daitokasei). Les particules de dioxyde de cérium 10nm dopées avec du calcium ont été obtenues d'un partenaire selon le protocole décrit par Boutard *et al.*¹⁶ La fonctionnalisation des nanoparticules a été caractérisée par IR et/ou analyse élémentaire.

L'analyse IR des nanoparticules de dioxyde de cérium 10nm dopées calcium (Figure 2-11) après fonctionnalisation (F) montre l'apparition de bandes de vibration entre 2800 et 2900cm⁻¹ correspondant aux bandes de vibration des groupements alkyles de l'amine-silane ainsi que la bande de vibration N-H à 1500cm⁻¹ (observation d'une modification de bande entre la cérine avant et après fonctionnalisation). La bande entre 450-500cm⁻¹ est la signature spectrale de la cérine. L'analyse IR des nanoparticules de dioxyde de cérium 100nm (Figure 2-11) montre la présence de bandes alkyles avant et après fonctionnalisation, ce qui pourrait être expliqué par la présence de résidus hydrocarbures. Une légère modification de bandes correspondant aux liaisons N-H est visible après fonctionnalisation à 1500cm⁻¹. Cependant, l'analyse élémentaire ne confirme pas ces résultats, elle révèle un taux de fonction amine <0,07mmol/g de particules. Les nanoparticules de dioxyde de cérium de 100nm n'ont donc pas pu être suffisamment fonctionnalisées, sûrement du fait de leur grande taille. En effet, les nanoparticules de 100nm étant plus grande, le nombre de fonction OH libres n'est pas suffisant pour fonctionnaliser les nanoparticules de manière conséquente.

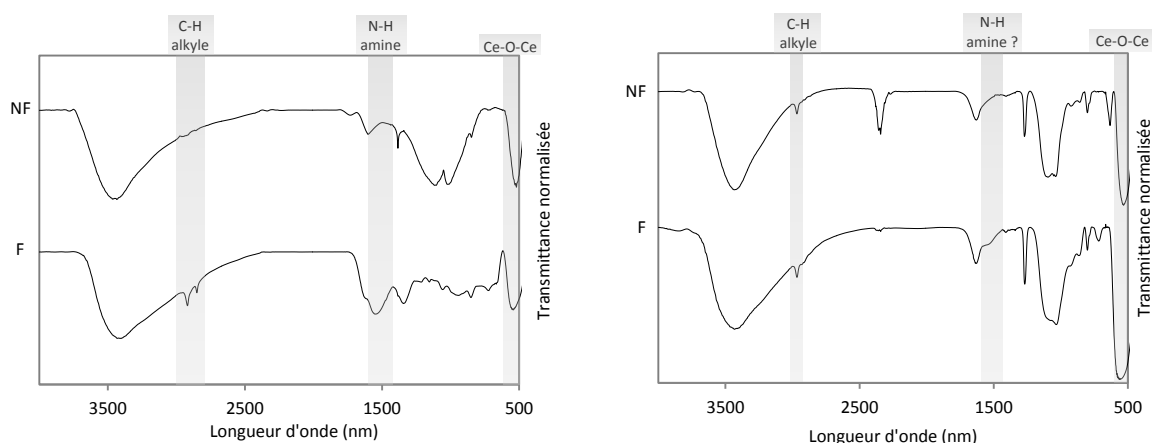


Figure 2-11 : Analyse IR des particules de dioxyde de cérium 10nm (gauche) et 100nm (droite).

2.1.2. Dioxyde de titane enrobé silice

Des nanoparticules de dioxyde de titane anatase (TiO₂) ont précédemment été greffées au polymère au laboratoire. Le dioxyde de titane anatase est photo-instable et donc potentiellement phototoxique. C'est pourquoi une forme plus stable (forme rutile) a été choisie pour la poursuite de ce projet. Le dioxyde de titane rutile utilisé provient de la société cosmétique COTY-Lancaster (MT-100T, Advanced Polymer). Il est enrobé de silice et la taille des nanoparticules est comprise entre 10 et 30nm. La fonctionnalisation des particules a été caractérisée par IR et analyse élémentaire.

L'analyse IR des nanoparticules de dioxyde de titane (Figure 2-12) ne permet pas de caractériser clairement leur fonctionnalisation car elles contiennent des résidus d'acide stéarique qui polluent le signal des groupements alkyles à 2900 cm⁻¹. Cependant à 1530cm⁻¹ un léger épaulement apparaît après fonctionnalisation, il correspond à la liaison N-H qui interagit avec des silanols ou hydroxyles de surface des nanoparticules. Les bandes de vibrations à 730cm⁻¹ et 1050cm⁻¹ sont respectivement caractéristiques des liaisons Ti-O-Ti et Si-O-Si des nanoparticules de dioxyde de titane enrobées de silice. L'analyse élémentaire a permis de confirmer la fonctionnalisation des nanoparticules de dioxyde de titane et révèle un taux de fonction amine de 0,27mmol/g de nanoparticules TiO₂. Les nanoparticules de dioxyde de titane ont donc pu être fonctionnalisées et seront greffées au polymère.

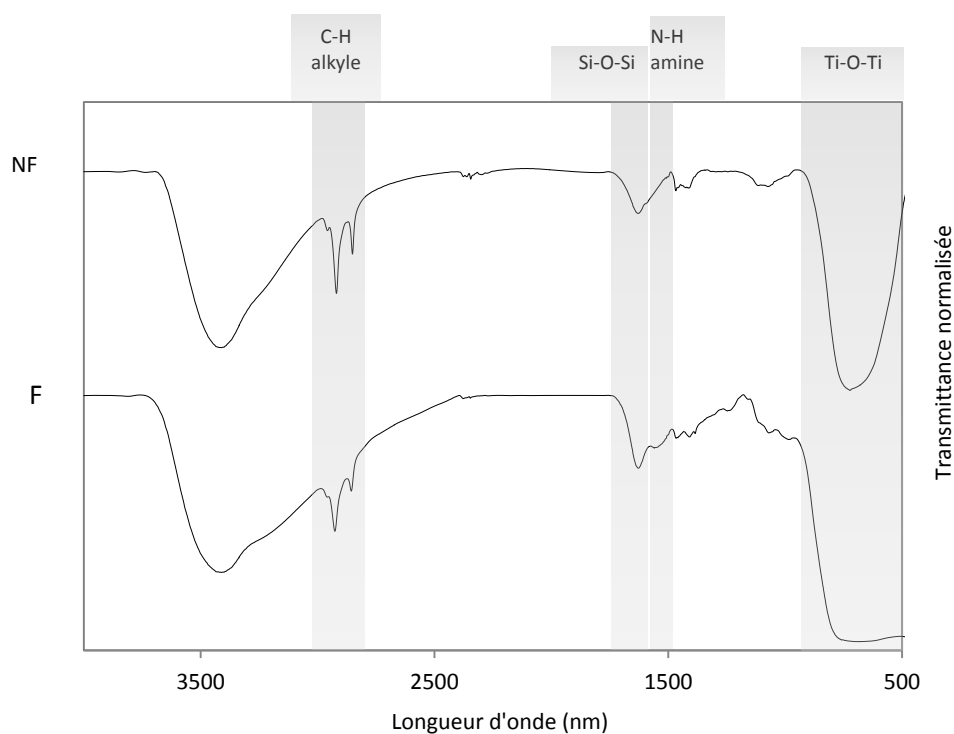


Figure 2-12 : Analyse IR des particules de dioxyde de titane.

La bonne fonctionnalisation des particules de dioxyde de titane est également facilement décelable par un simple test à la ninhydrine qui révèle la présence des amines. Ce test consiste à déposer quelques gouttes de ninhydrine dans un tube à essais contenant des nanoparticules sèches et les chauffer à 600°C à l'aide d'un décapeur thermique. Au chauffage, la ninhydrine va colorer en violet les fonctions amines. La Figure 2-13 met en évidence la fonctionnalisation des nanoparticules de dioxyde de titane.

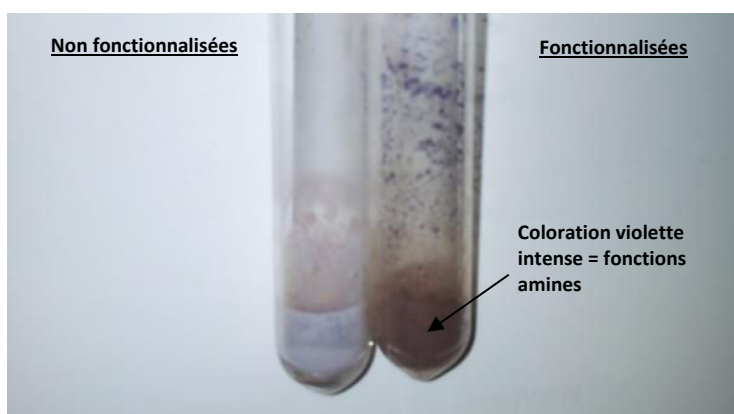


Figure 2-13 : Fonctionnalisation des nanoparticules de dioxyde de titane révélée à la ninhydrine.

2.2. GREFFAGE DES NANOPARTICULES DE TiO_2 ET DE Ca^{2+} - CeO_2

Les nanoparticules de dioxyde de titane enrobées silice et de dioxyde de cérium dopées calcium ont été fonctionnalisées efficacement par le 3-ATS, le greffage de ces nanoparticules au polymère a donc été réalisé. Le protocole de greffage est disponible en annexe 2.4. La Figure 2-14 montre l'analyse IR du polymère greffé avec les nanoparticules de dioxyde de titane comparé au polymère non greffé. Un épaulement est facilement observable vers 1630cm^{-1} correspondant à l'apparition de la bande de vibration du C=O de l'amide. Les nanoparticules ont donc été greffées au polymère. De plus, les bandes de vibration vers 1690cm^{-1} et 1750cm^{-1} correspondent respectivement aux liaisons C=O des fonctions acides et esters du polymère. La grande bande de vibration entre 600 et 740cm^{-1} correspond quant à elle à la bande caractéristique des particules de dioxyde de titane (liaison Ti-O-Ti).

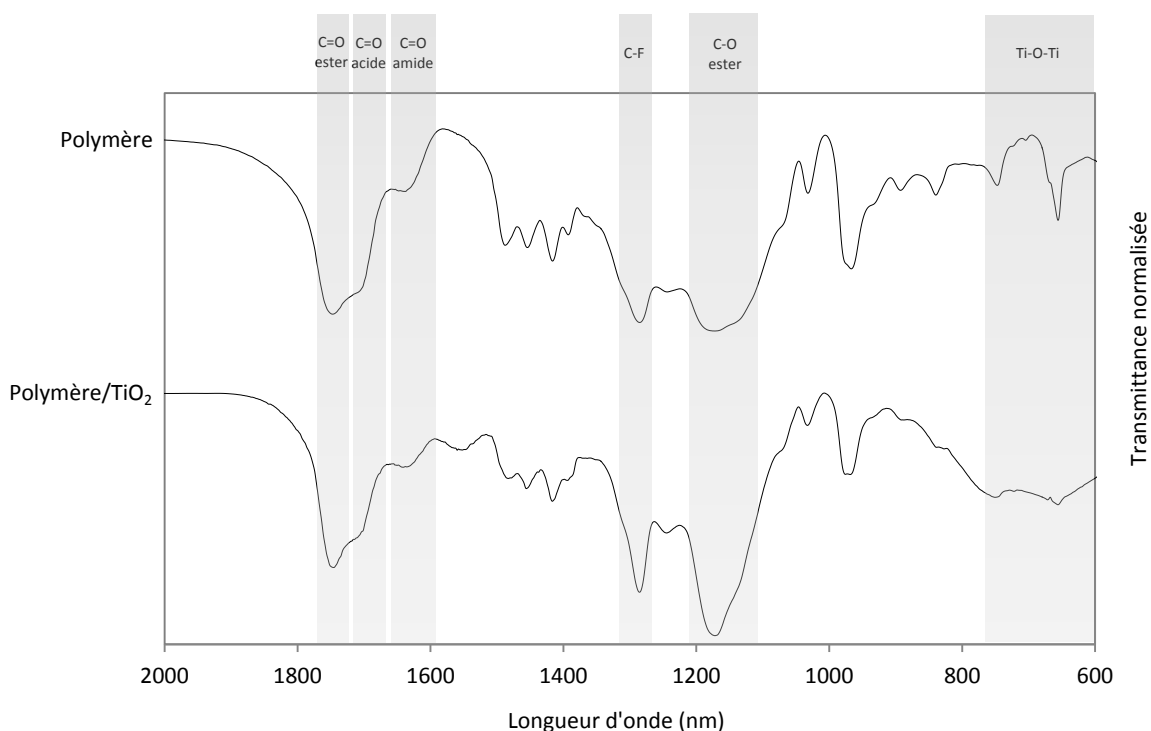


Figure 2-14 : Analyse IR du polymère greffé dioxyde de titane.

La Figure 2-15 montre l'analyse IR du polymère greffé avec les nanoparticules de dioxyde de cérium dopées calcium comparées au polymère non greffé. L'épaulement observable vers 1630cm^{-1} (C=O de l'amide) est visible ainsi que les bandes de vibration vers 1690cm^{-1} (C=O des fonctions acides) et 1750cm^{-1} (C=O des fonctions esters). Les nanoparticules de dioxyde de cérium dopées calcium ont donc été greffées au polymère.

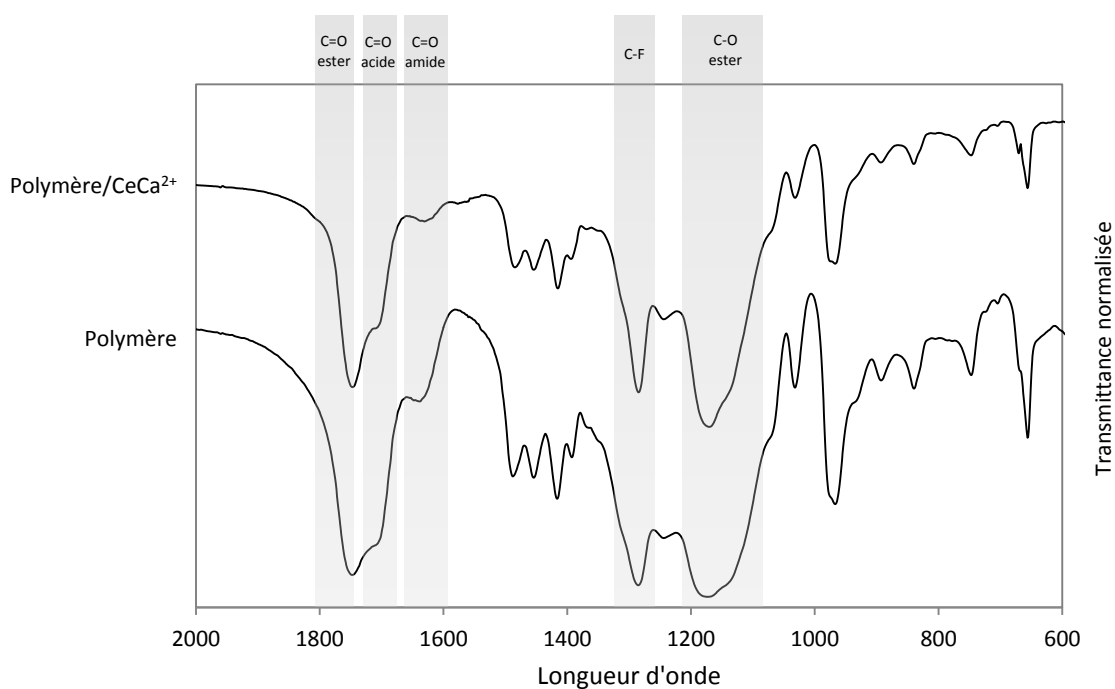


Figure 2-15 : Analyse IR du polymère greffé dioxyde de cérium dopée calcium.

Les polymères fluorés HASE-F-RF8 ont été greffés avec des particules de dioxyde de silice de 22nm, de dioxyde de cérium de 10nm ou de dioxyde de titane enrobées silice (10-30nm). Ces polymères ne présentent pas de propriétés oléophobes (angles de contact inférieurs à 90°) (Tableau 2-1), il serait intéressant de voir maintenant l'impact de l'ajout de groupements fluorés supplémentaires sur la mouillabilité de ces polymères.

Tableau 2-1: Angles de contact des polymères greffés (10mg/cm²) à l'huile (4,9µL).

Polymères	PSi	PCe	PTi
Angle de contact (°)	81±2	49±1	63±2

III. AMELIORATION DES ACTIFS

La fonctionnalisation des nanoparticules avec le (3-aminopropyl)triéthoxysilane a permis l'ajout d'un grand nombre de fonctions amines (NH_2) en surface de celles-ci. Ainsi, même après la réaction de greffage entre le polymère HASE-F-RF8 et les nanoparticules, des fonctions amines de surface peuvent encore être libres pour une autre réaction de greffage. Il serait intéressant de les « surgreffer » avec un acide fluoré (RF8) afin d'augmenter le taux de fluor du polymère et potentiellement l'oléophobie. Un ensemble d'analyse sera réalisé pour la caractérisation de ces nouveaux composés (analyse élémentaire, mouillabilité, dispersion des nanoparticules et polymères, structuration de surface, étude rhéologique, etc.).

3.1. REACTION CHIMIQUE

L'acide fluoré (acide 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoro-undecanoïque – RF8) utilisé pour la synthèse du macromère est mis à réagir avec le polymère greffé pendant 5 jours puis l'ensemble est dialysé afin d'éliminer les agents de couplages et le reste d'acide qui ne se serait pas greffé. Le protocole détaillé est disponible en annexe 2.5. La réaction est la suivante (Figure 2-16).

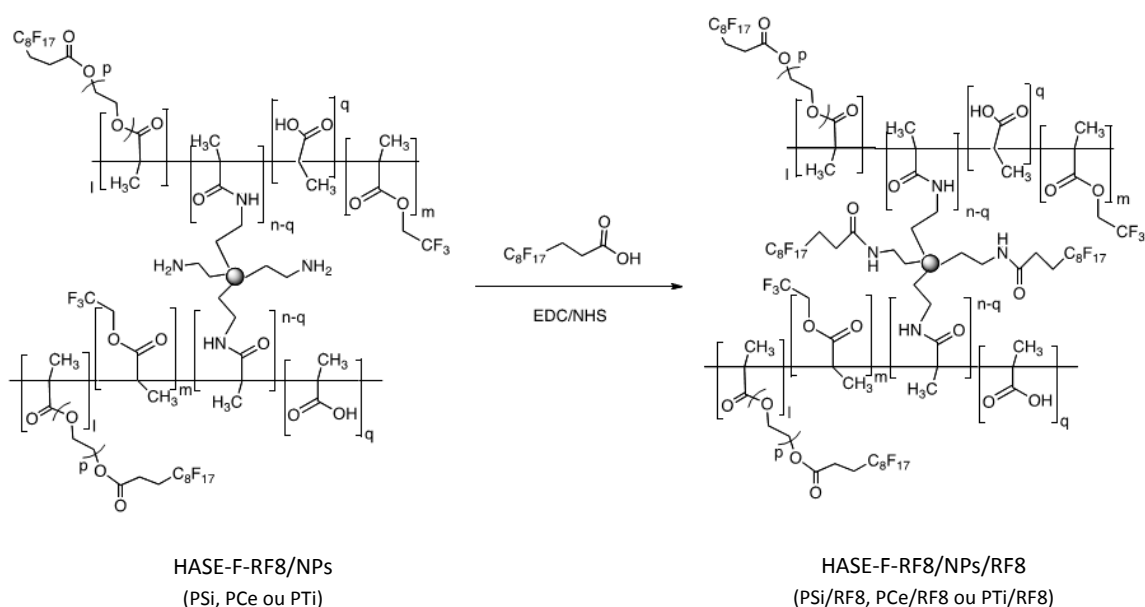


Figure 2-16 : Réaction de surgreffage des nanoparticules greffées au polymère HASE-F-RF8.

Les trois polymères (PSi, PCe et PTi) ont été surgreffés (PSi/RF8, PCe/RF8 et PTi/RF8). Leurs comportements distincts sont abordés dans ce chapitre.

3.2. CARACTERISATION ET ANALYSES DES HASE-F-RF8/NPS/FR8

3.2.1. Polymère silice surgreffé (PSi/RF8)

Les nanoparticules de dioxyde de silice étant les plus fonctionnalisées (2,5mmol NH_2/g de particule), le polymère silice surgreffé constitue la preuve de concept de cette étude. Nous l'étudierons donc à l'aide de nombreuses analyses. L'analyse élémentaire de ces composés a permis de mettre en évidence le greffage entre l'acide carboxylique du RF8 et les fonctions amines des nanoparticules (Tableau 2-2). Le ratio F/C augmente de 58% entre le polymère greffé et surgreffé.

Tableau 2-2 : Analyses élémentaire des composés avant et après greffage.

	C (%)	F (%)	F/C
PSi	29,65	9,20	0,31
PSi-RF8	26,36	12,84	0,48

Le greffage peut également être mis en évidence grâce à des analyses au **potentiel zêta** (Figure 2-17). A pH 4, une légère différence est observable entre les polymères non greffés (HASE) et greffés avec des nanoparticules de dioxyde de silice (HASE/Si) : le potentiel zêta du polymère HASE/Si est légèrement plus élevé (-22mV) que le polymère non greffé (-32mV) correspondant à la présence des fonctions amines qui à pH acide sont ionisées ($\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3^+$). Le surgreffage des nanoparticules diminue le nombre de fonctions amines libres en surface de celles-ci et correspond au shift vers le bas à pH 4 du polymère surgreffé (HASE/Si-RF8).

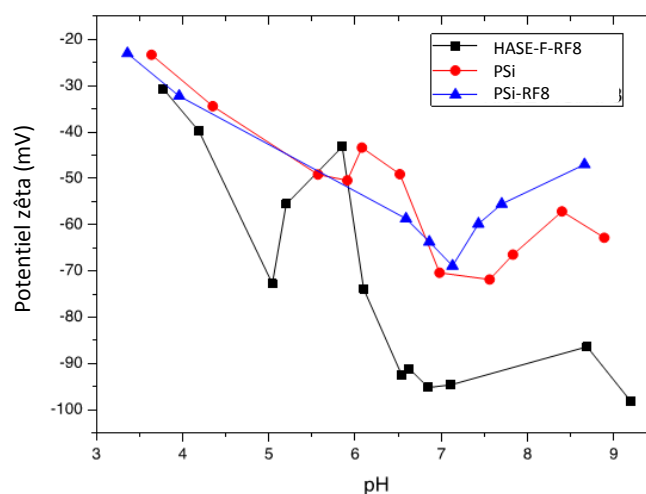


Figure 2-17 : Potentiel zêta des suspensions de polymères, polymères greffés silice et homologues surgreffés.

La **dispersion des nanoparticules** dans l'eau est dépendante du pH de la suspension. A pH4, le potentiel zêta des trois polymères est élevé. L'augmentation du pH provoque pour les trois polymères une brusque diminution du potentiel correspondant à l'ionisation des groupements carboxyliques ($\text{COOH} \Rightarrow \text{COO}^-$) de l'acide méthacrylique entrant en jeu dans la formation du réseau tridimensionnel. La plus grande diminution observée pour le polymère non greffé (HASE-F-RF8) est expliquée par la présence d'un plus grand nombre de fonctions COO^- disponibles car non greffées aux nanoparticules. La meilleure stabilisation est obtenue pour un pH = 7. Ainsi comme le polymère greffé, le polymère surgreffé est stable à pH7.

La **stabilité** de la suspension dans le temps à pH7 a été réalisée sur des solutions à 2% (p/p) dans l'eau (Figure 2-18). La suspension est stable pendant 4h, le polymère se déstabilise et retombe au fond du tube. Si la suspension est réagitée elle reste stable pendant 4h de nouveau.

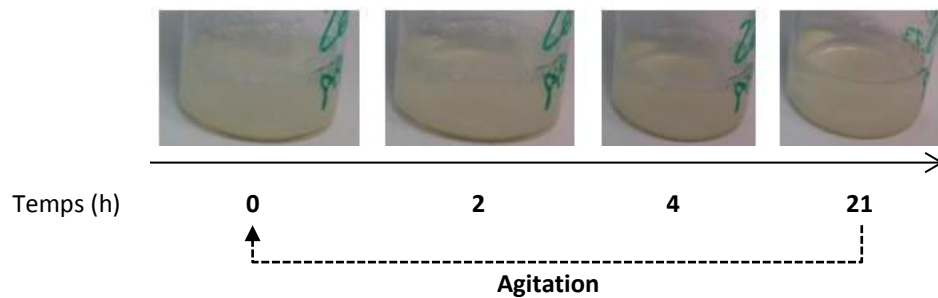


Figure 2-18 : Etude de stabilité du polymère silice surgreffé.

De plus, l'aspect du polymère surgreffé diverge complètement du polymère greffé : tandis que le deuxième à 10% forme un gel très stable et visqueux à pH7, le premier est un liquide peu visqueux. Le surgreffage a donc modifié complètement le comportement du polymère en solution aqueuse. La **rhéologie** est l'étude de l'écoulement de la matière (crème, liquide) sous l'effet des contraintes qui lui sont appliquées. Pour le besoin des études, les grands principes de rhéologie sont détaillés plus tard au Chapitre 4 (3.3). Brièvement, dans le cas de ces nouveaux polymères ces études vont permettre de mettre en évidence une différence de **comportements** des polymères greffés et surgreffés en solution. La Figure 2-19 représente la viscosité des polymères à 2% (p/p) dans l'eau et pH7 en fonction de la contrainte qui lui est appliquée (en Pa). Il est facilement observable qu'une fois surgreffé, le PSi a une viscosité bien moins importante que celle du polymère greffé pour toute la gamme de contrainte. Ce type de polymère pourrait être intéressant pour une intégration dans une formule sprayable. En effet, l'intégration en spray nécessite une formule faiblement visqueuse. De plus, en raison de sa stabilité, on peut imaginer indiquer sur le produit : « à agiter avant utilisation ».

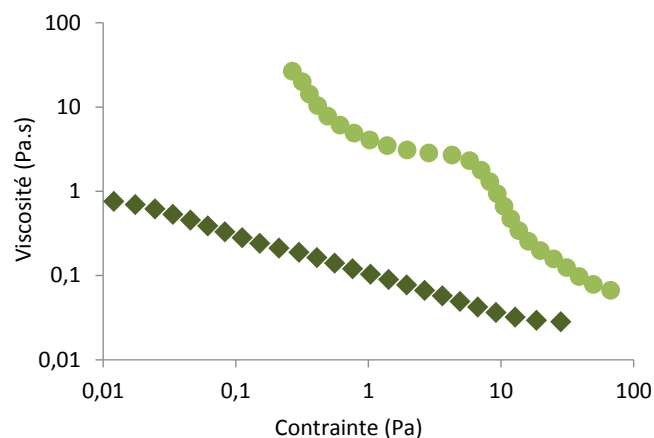


Figure 2-19 : Etude en écoulement des polymères greffés silice (●) et surgreffés (◆).

Afin d'étudier la capacité des nouveaux polymères à repousser les toxiques, ses propriétés de **mouillabilité** ont été étudiées par goniométrie (goutte d'huile d'olive de 4,9μL).

Dès 3mg/cm² (dépôt sec sur verre), l'angle de contact est proche de l'**oléophobie** (81±2°) pour les deux polymères, ensuite une différence de comportement est observée entre le polymère avant et après surgreffage (Figure 2-20). Tandis que pour le premier l'oléophobie n'évolue pas, voir même décroît, le deuxième voit son oléophobie augmenter de manière proportionnelle en fonction de la quantité déposée pour atteindre 120° à 10mg/cm². Ainsi le **polymère surgreffé** tend vers la **superoleophobie** comparé au polymère greffé. Le dépôt par spray donne la même évolution d'angle de contact.

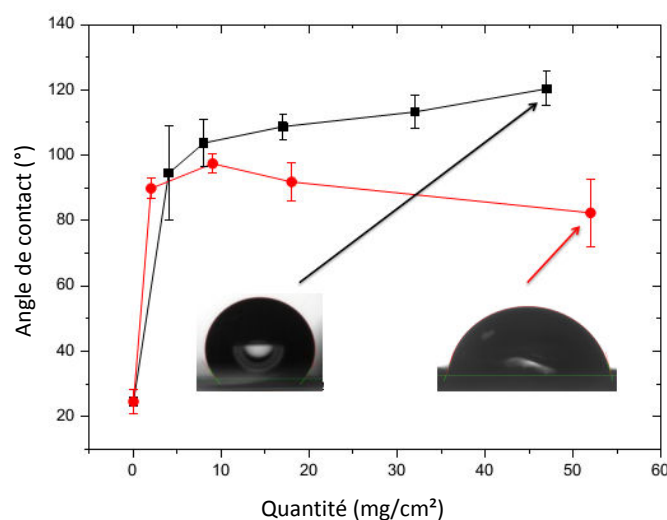


Figure 2-20 : Mouillabilité des polymères greffés silice (●) et surgreffés (■) en fonction de la quantité de dépôt sur plaque de verre.

L'évolution des angles de contact en fonction de la dose ne peut être expliquée par le seul paramètre chimie (paramètre intrinsèque). C'est en augmentant le **taux de fluor** que nous avons joué sur la chimie mais qu'en est-il de la structuration de surface ? Des **clichés MEB** ont donc été réalisés (Figure 2-21). Aucune structuration spécifique n'est visible pour le polymère greffé et de légers craquèlements sont observés (flèches blanches). Ces craquèlements augmentent avec la quantité de polymère déposée ce qui pourrait expliquer la tendance à la perte de l'angle de contact observée dans la Figure 2-20 pour le polymère greffé. Ces craquèlements sont des points d'entrée et diminuerait la capacité du polymère à protéger la peau. Pour le polymère surgreffé (autant étalé à la spatule que sprayé) une structuration spécifique en feuillet est observée et aucun craquèlement n'est visible.

L'angle de contact observé pour le polymère surgreffé ne peut donc pas être expliqué par la seule équation de Young. Si l'angle de contact que forme la goutte d'huile d'olive avec la surface de PSi/RF8 suit l'équation de Wenzel, cela signifie que la goutte est complètement en contact avec les aspérités formées par les nanofeuillets. Avec l'équation de Wenzel ($\cos \theta^w = r \cdot \cos \theta^y$ où r = facteur de rugosité), θ^w ne peut être supérieur à θ^y que si θ^y est supérieur à 90° . Hors, l'ensemble des matériaux lisses oléophobes connus présente un θ^y inférieur à 90° ¹⁷. Donc, les résultats de mouillabilité du polymère surgreffé ne peuvent être expliqués par cette équation. Dans le cas de $\theta^y < 90^\circ$, seul l'équation de Cassie-Baxter permet d'expliquer ce gain d'oléophobie puisque θ^{cb} peut augmenter même si $\theta^y < 90^\circ$ ($\cos \theta^{cb} = \varphi_s (\cos \theta^y + 1) - 1$). Bien que l'angle atteint ne permette pas d'avoir des propriétés glissantes (comme la feuille de lotus), le dépôt de la goutte emprisonne donc une fractions d'air dans les nanofeuillets qui expliquent ce gain d'oléophobie pour le polymère surgreffé.

Le **polymère silice surgreffé** montre donc une nette **amélioration** de ces **propriétés de mouillabilité** et tend vers la **superoleophobie** qui s'explique à la fois par l'augmentation du taux de **fluor** et la **structuration** de surface. La modification des propriétés **rhéologiques** permettrait l'intégration de ces polymères protecteurs dans des formules en **spray**.

Il serait intéressant maintenant de comparer le surgreffage de notre modèle PSi aux deux autres polymères dont les nanoparticules sont moins bien fonctionnalisées.

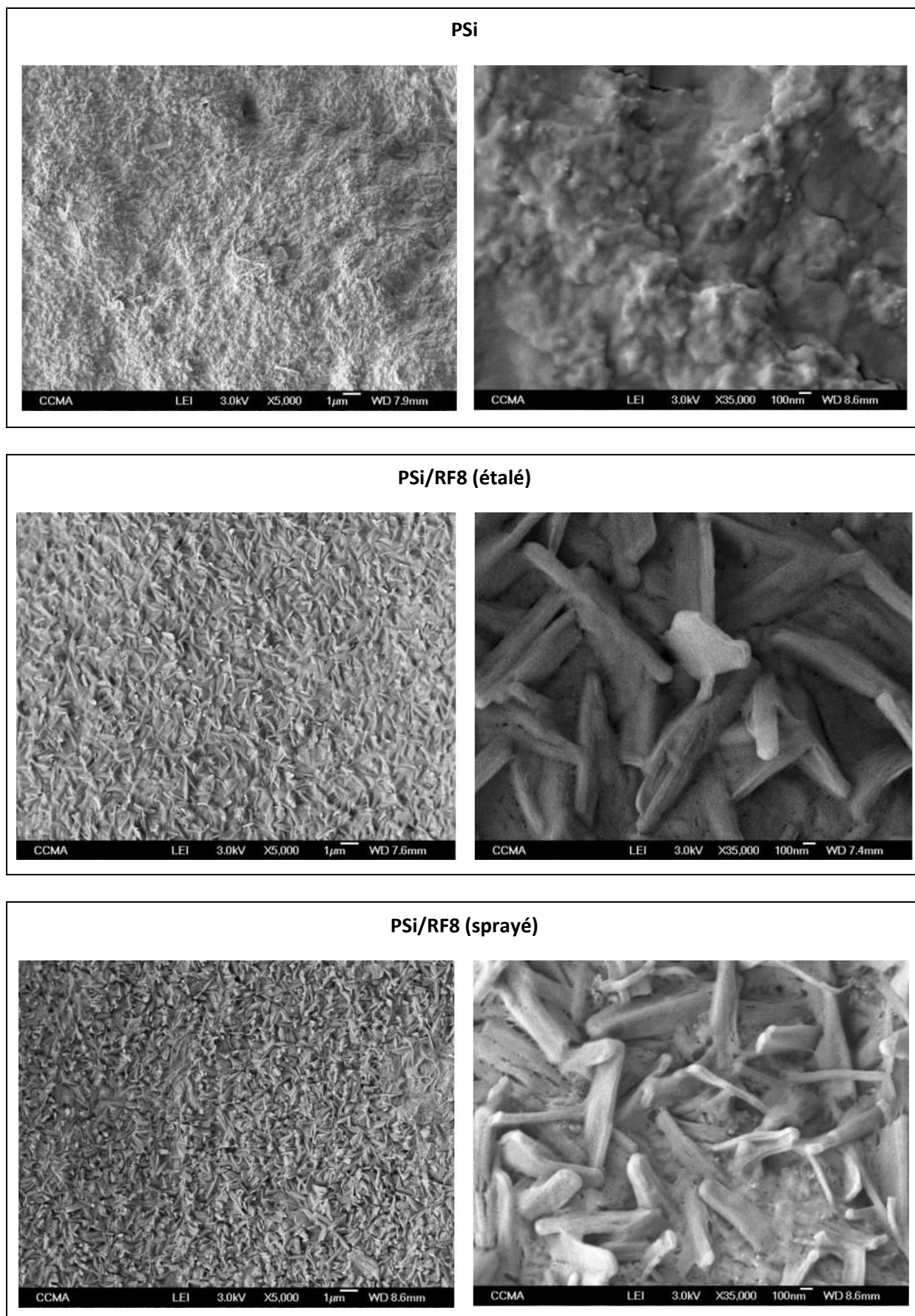


Figure 2-21 : Clichés MEB des polymères silice greffés et surgreffés.

3.2.2. Polymères cérine (PCe/RF8) et titane (PTi/RF8) surgreffés

Deux autres polymères ont donc été surgreffés : les polymères greffés avec des nanoparticules de dioxyde de cérium (PCe) et dioxyde de titane (PTi). Leur mouillabilité, rugosité, structuration de surface ont donc été analysées.

L'analyse élémentaire de ces composés a permis de mettre en évidence le gain en fluor des polymères (Tableau 2-3). Les ratios F/C augmentent entre les polymères greffés et surgreffés de 226% pour le dioxyde de cérium et de 37% pour le dioxyde de titane.

Tableau 2-3 : Analyses élémentaire des composés avant et après greffage.

	C (%)	F (%)	F/C
PCe	21,83	7,43	0,34
PCe/RF8	21,24	23,72	1,11
PTi	34,72	13,78	0,40
PTi/RF8	33,40	18,64	0,55

L'étude de la **mouillabilité** (Figure 2-22) permet de mettre en évidence (tout comme le polymère greffé avec des nanoparticules de dioxyde de silice) que le surgreffage apporte un gain d'oléophobie (+100% i.e. +50° pour le PCe/RF8, +33% i.e +20° pour le PTi/RF8), le PCe/RF8 atteignant l'oléophobie (103±2°).

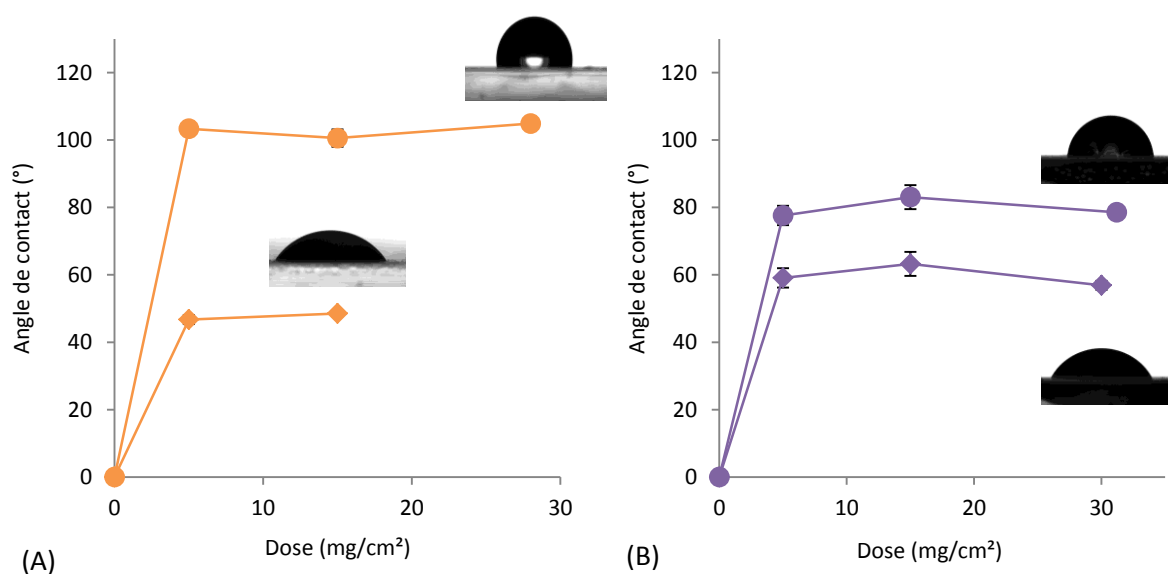


Figure 2-22 : Mouillabilité des polymères greffés (♦) et surgreffés (●) dioxyde de cérium (A) et dioxyde de titane (B).

Nous allons donc maintenant étudier la structuration de surface afin de voir quelle partie entre le gain de fluor et la structuration influence ces nouvelles propriétés de mouillabilité.

La profilométrie est une méthode permettant de mesurer le relief d'une surface, notamment dans le but d'évaluer sa rugosité ou sa micro-géométrie. La **rugosité** sera mesurée en minimum 3 points de la surface et l'écart-type des valeurs nous permettra de déterminer l'homogénéité des formules. L'étude est réalisée sur des dépôts secs sur verre à $3\text{mg}/\text{cm}^2$. La Figure 2-23 montre que la rugosité augmente pour le surgreffage du PCe et à l'inverse diminue pour le PTi. La rugosité en soit n'est pas un paramètre clef pour l'évaluation de la structuration, les images MEB et d'AFM (Atomic Force Microscopy) permettront d'étudier plus en détail la structuration de surface des dépôts.

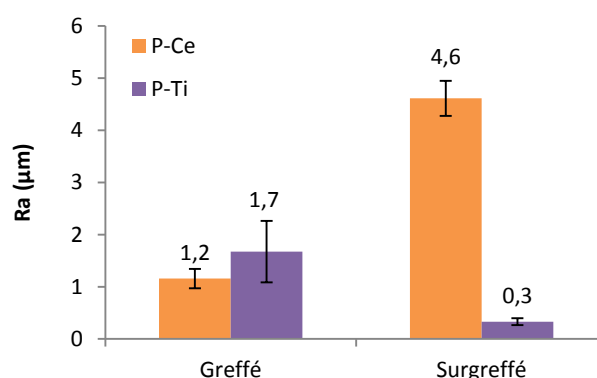


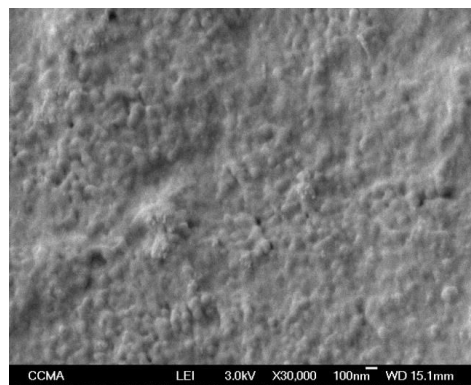
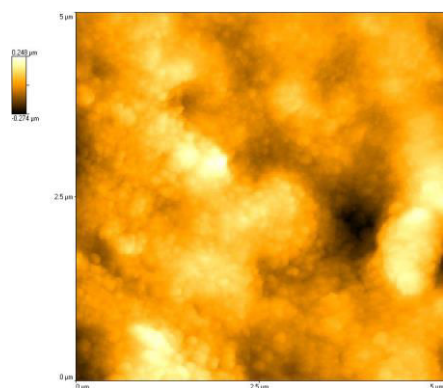
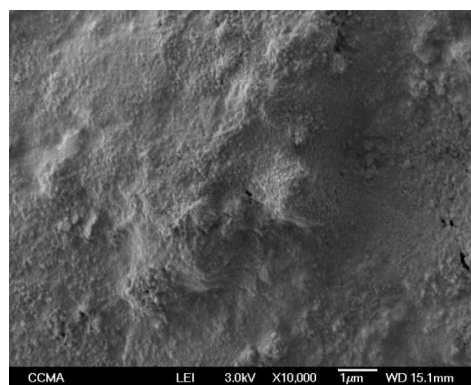
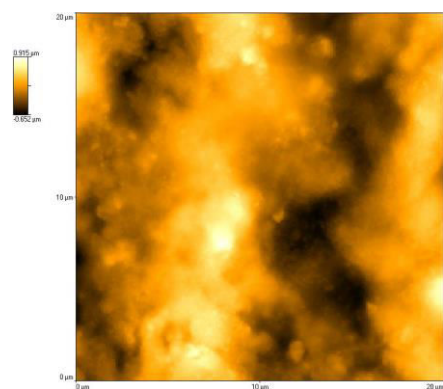
Figure 2-23 : Rugosité des polymères greffés et surgreffés dioxyde de cérium et dioxyde de titane.

L'étude de la **structuration** de surface par MEB et AFM ne montre pas une structuration en feuillet comme le PSi/RF8 (Figure 2-24). Pour le PCe/RF8, les analyses AFM et MEB montrent une structuration globulaire. L'observation du PCe/RF8 par AFM n'a pas été possible, les images MEB montrent une légère micro et nano-structuration globulaire. Pour le PTi/RF8, les analyses AFM montrent une structuration globulaire comme pour le PCe/RF8. Cependant, il est difficile d'observer ces structurations par MEB. En effet, le faisceau d'électron est très énergétique et parfois l'observation des polymères par MEB est difficile car il interagit avec la surface et fait « fondre » le polymère.

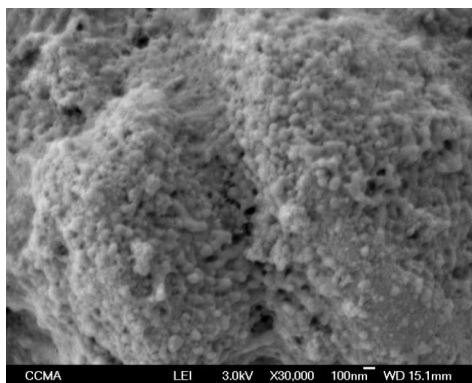
L'apparition de la micro et nano-structuration du PCe/RF8 par rapport au PCe et l'augmentation du taux de fluor (+226%) expliquent le grand gain d'oléophobie (de $47\pm 1^\circ$ à $103\pm 2^\circ$). Cependant, ces propriétés ne permettent pas d'atteindre les angles de contact obtenus pour le PSi/RF8, la structuration en nanofeuillet permet ici d'expliquer de telles propriétés puisque le gain en fluor (+58%) n'est pas aussi élevé que pour le PCe/RF8.

La faible structuration du PTi et PTi/RF8 permet de dire que dans le cas du polymère titane, c'est uniquement l'augmentation du taux de fluor (+37%) qui permet d'augmenter l'angle contact de 20° .

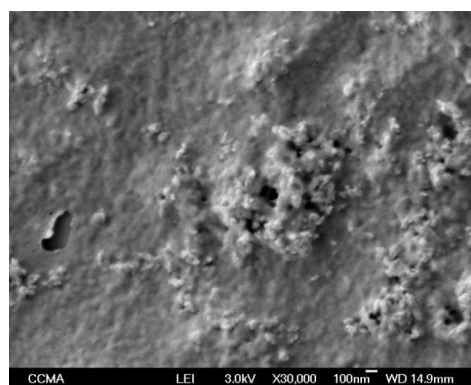
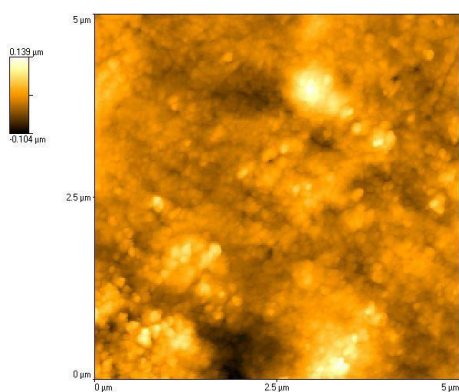
PCe



PCe/RF8



PTi



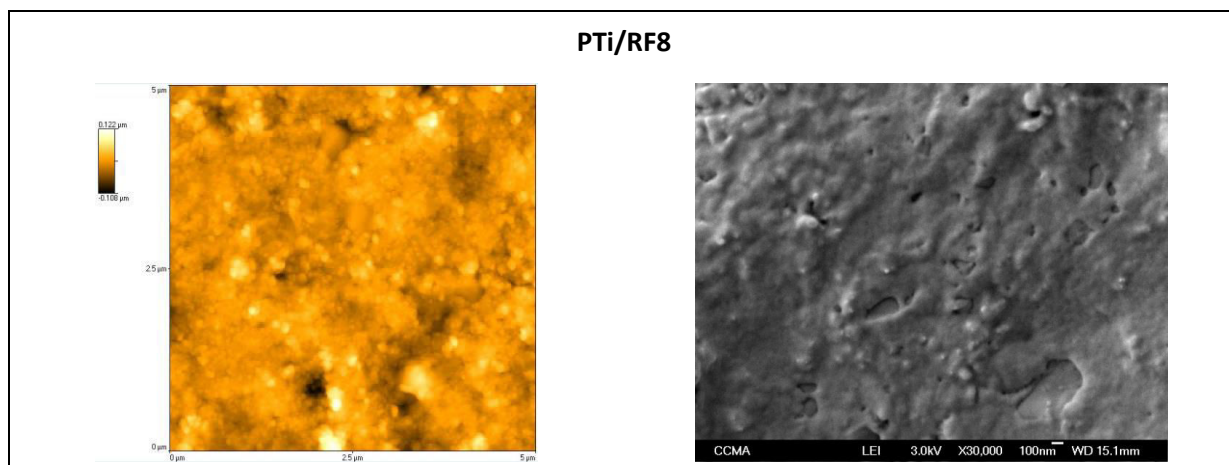


Figure 2-24 : Image AFM (gauche) et MEB (droite) des polymères greffés et surgreffés dioxyde de cérium et dioxyde de titane.

L'étude **rhéologique** des polymères greffés et surgreffés permet également de mettre en évidence une perte de viscosité des polymères une fois surgreffés (Figure 2-25). Ceux-ci plus fluides pourraient donc être intégrés dans une formulation en spray. Leur **stabilité** en solution est cependant différente du PSi/RF8 : le PCe/RF8 déphase plus rapidement (30min) tandis que le PTi/RF8 lui ne déphase pas (stable sur plusieurs jours). Les nanoparticules de dioxyde de titane étant très peu fonctionnalisés ($0,37\text{mmol NH}_2/\text{g}$), il n'y a pas autant de d'acide fluoré RF8 qui se greffe ce qui peut expliquer la conservation de sa stabilité à pH7.

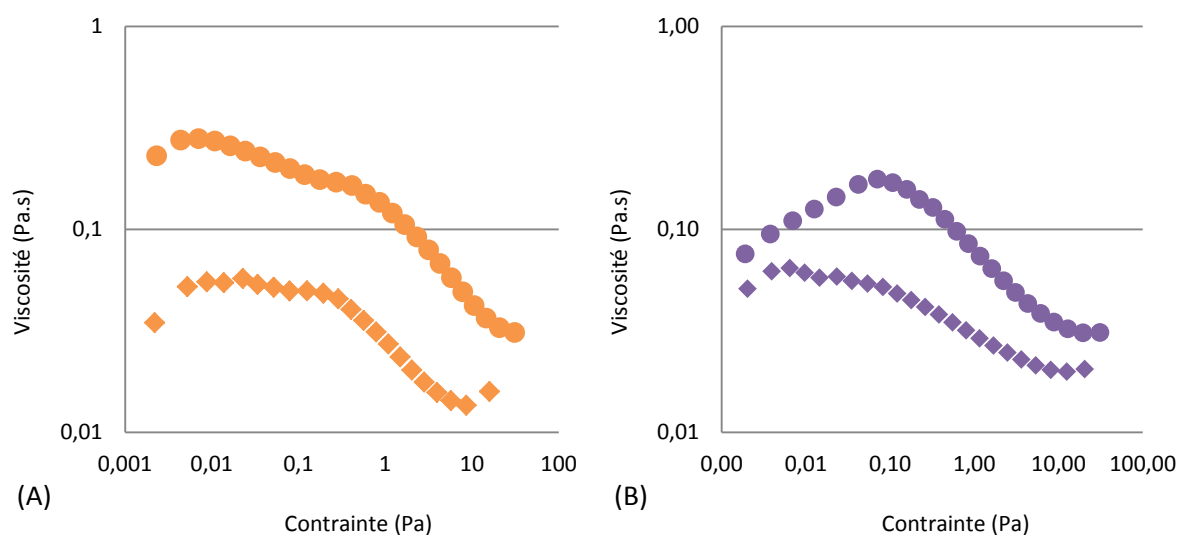


Figure 2-25 : Etude en écoulement des polymères greffés (●) et surgreffés (◆) dioxyde de cérium (A) et dioxyde de titane (B).

Les coupes latérales des polymères greffés et surgreffés ont permis d'observer l'intérieur des dépôts (Figure 2-26). Pour les trois polymères, on observe une différence de structuration de l'intérieur des dépôts. En effet les polymères **greffés** forment une couche **compacte** tandis que les polymères **surgreffés** sont **aérés**. Cette différence peut venir de l'augmentation du taux de fluor qui influence l'arrangement au séchage et forme des bulles d'air dans les polymères surgreffés.

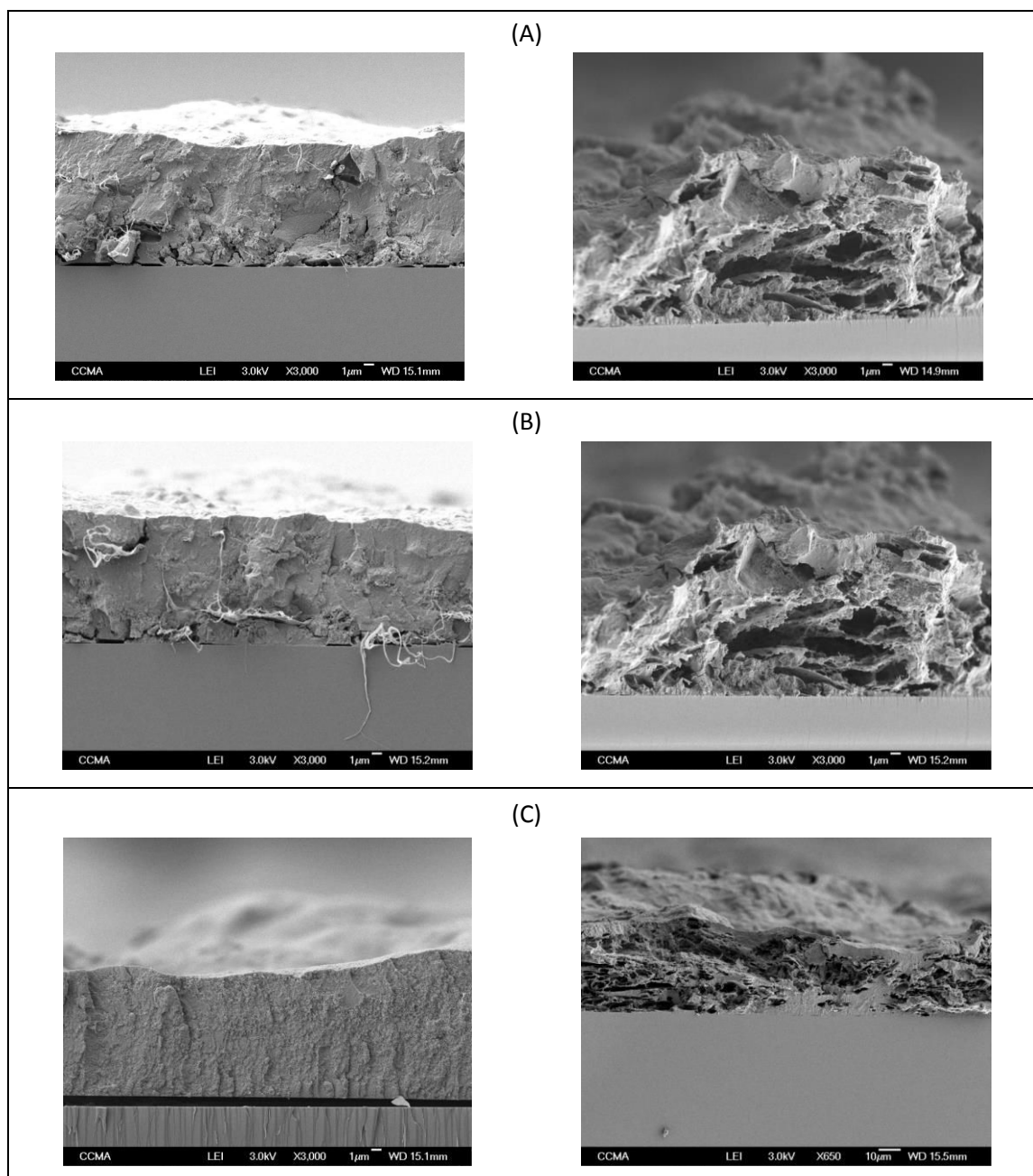


Figure 2-26 : Image MEB des tranches des polymères greffés (gauche) et surgreffés (droite) dioxyde de cérium (A), dioxyde de titane (B) et dioxyde de silice (C).

3.3. CONCLUSION SUR L'AMELIORATION DES ACTIFS

Le **surgreffage** des polymères par l'acide fluoré RF8 a permis l'obtention de nouveaux polymères aux propriétés intéressantes. Celui-ci **plus fluide** que le polymère de départ pourra être intégré dans une formulation en **spray**.

La **différence de mouillabilité** entre les polymères surgreffés P_{Si}/RF8, P_{Ce}/RF8 et P_{Ti}/RF8 peut s'expliquer à la fois par la différence d'augmentation du **taux de fluor** et la différence de **structuration** des surfaces. P_{Si}/RF8 présente les meilleures propriétés grâce à une nano-structuration en feuillet et une augmentation des propriétés intrinsèques (chimie). Les résultats de P_{Ce}/RF8 dont l'angle de contact double s'explique en premier par la très forte augmentation des propriétés intrinsèques et par sa légère micro et nano-structuration. Les faibles résultats de P_{Ti}/RF8 s'expliquent par la faible fonctionnalisation des nanoparticules ne permettant pas la même augmentation des propriétés intrinsèques et la même structuration de surface. L'augmentation du **taux fluor** et la **structuration en nanofeuillet** du P_{Si}/RF8 a permis l'obtention des meilleures propriétés de mouillabilité tendant vers la **superoléophobie** très intéressante pour notre application de protection cutané. L'étude de l'efficacité de ces nouveaux composés n'a pas pu être réalisée au cours de cette thèse, il serait très intéressant de les tester en efficacité à la fois seuls et formulés.

IV. CONCLUSION

Dans les parties I et II de ce chapitre nous avons donc vu que le protocole a pu être optimisé pour réduire le temps de synthèse mais également augmenter le rendement du polymère. Il a pu également être possible de fonctionnaliser des nanoparticules de dioxyde de cérium de 10nm et des nanoparticules de dioxyde de titane rutile commerciales (10-30nm). Celles-ci ont été utilisées pour être greffées au polymère HASE-F-RF8. Les synthèses des différents actifs utilisés pour la formulation (PSi, PCe et PTi) sont récapitulées dans le tableau suivant (Tableau 2-4).

Tableau 2-4: Récapitulatif des synthèses de polymères greffés.

	Macromère MF8	Polymère HASE-F-RF8	Nanoparticules fonctionnalisées	Polymère greffé
Avant optimisation	10g initiaux	10g initiaux	-	10-25g initiaux
	10 réactions	35 réactions	-	5 réactions
	Rendement ~50%	Rendement 50-70%	-	Rendement > 95%
Après optimisation	5-40g initiaux	10-20g initiaux	5-10g initiaux	10-25g initiaux
	11 réactions	15 réactions	17 réactions	4 réactions
	Rendement ~50%	Rendement ~ 90%	Rendement > 95%	Rendement > 95%
	68g	220g	Dioxyde de silice : 45g Dioxyde de cérium : 41g Dioxyde de titane : 12g	PSi : 110g PCe : 110g PTi : 12g

Dans le but d'une industrialisation des polymères greffés et d'une production de nouvelles crèmes barrières, le paramètre coût est important. Ci-dessous un diagramme représentant le coût de chaque étape de synthèse (Figure 2-27). La part importante du coût revient dans la synthèse du macromère fluoré non commercial MF8.

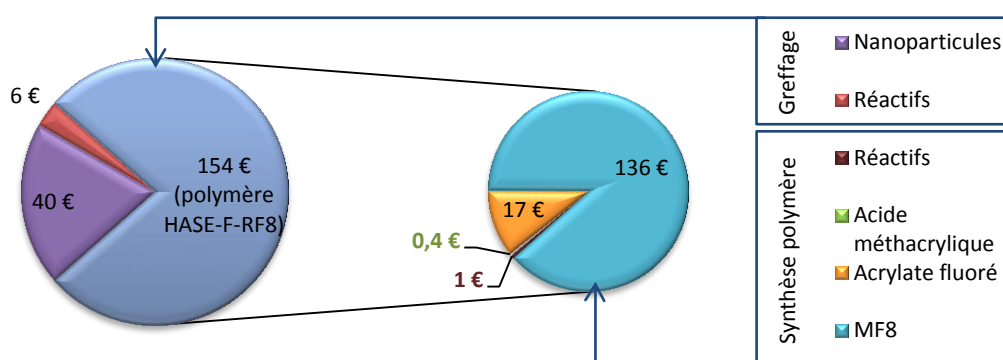


Figure 2-27 : Diagramme du coût de 10g de polymère HASE-F-RF8/NPs.

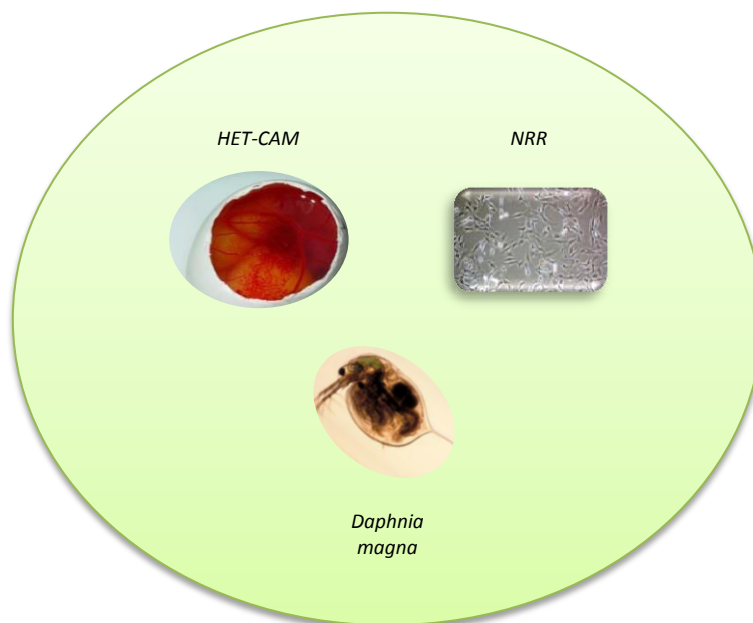
L'ensemble des actifs synthétisés (polymère greffés) seront donc utilisés pour les tests de formulation afin de trouver une formule filmogène efficace. Cependant, avant intégration dans les topiques il semble important de vérifier la compatibilité des actifs avec la peau et leur impact potentiel sur l'environnement. Le greffage d'un acide fluoré à longue chaîne a permis l'obtention de polymère aux nouvelles propriétés de mouillabilité intéressant pour notre application. Cependant, la mouillabilité est-elle un paramètre clef pour conférer une bonne efficacité à un topique ? Cette question sera abordée au Chapitre 4 avec l'étude des nouvelles formules en termes de mouillabilité et d'efficacité.

Références bibliographiques

1. Zenerino, A. Développement de nanoparticules polymérisées en réseau actif ou bioactif pour la protection ou la décontamination. Thèse 2012.
2. Zenerino, A., Amigoni, S., Taffin de Givenchy, E., Josse, D. & Guittard, F. New fluorinated hybrid organic/inorganic water soluble polymeric network. *Polymer* **54**, 6089–6095 (2013).
3. Zhou, T. H. *et al.* Performance improvement of nano-silica/polypropylene composites through in-situ graft modification of nanoparticles during melt compounding. *E-Polymers* 1–14 (2007).
4. Chao, H., Hagberg, B. a & Riggleman, R. a. The distribution of homogeneously grafted nanoparticles in polymer thin films and blends. *Soft Matter, Accept.* **10**, 8083–8094 (2014).
5. Zenerino, A., Amigoni, S., Taffin de Givenchy, E., Josse, D. & Guittard, F. Homogeneous dispersion of SiO₂ nanoparticles in an hydrosoluble polymeric network. *React. Funct. Polym.* **73**, 1065–1071 (2013).
6. Ng, W. ., Tam, K. . & Jenkins, R. . Rheological properties of methacrylic acid/ethyl acrylate co-polymer: comparison between an unmodified and hydrophobically modified system. *Polymer* **42**, 249–259 (2001).
7. Nagashima, K., Strashko, V., Macdonald, P. M., Jenkins, R. D. & Bassett, D. R. Diffusion of Model Hydrophobic Alkali-Swellable Emulsion Associative Thickeners. *Macromolecules* **33**, 9329–9339 (2000).
8. Dai, S., Tam, K. C. & Jenkins, R. D. Light Scattering of Hydrophobically Modified Alkali-Soluble Emulsion (HASE) Polymer: Ionic Strength and Temperature Effects. *Macromol. Chem. Phys.* **202**, 335–342 (2001).
9. Young, T. An essay on the cohesion of fluids. *Philos. Trans. R. Soc. London* **95**, 65–87 (1805).
10. Tsibouklis, J. & Nevell, T. G. Ultra-Low Surface Energy Polymers: The Molecular Design Requirements. *Adv. Mater.* **15**, 647–650 (2003).
11. Wenzel, R. N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *J. Ind. Eng. Chem.* **28**, 988–994 (1936).
12. Cassie, B. D. & Baxter, S. Wettability of porous surfaces. *Trans. Faraday Soc.* **40**, 546–551 (1944).
13. Darmanin, T. & Guittard, F. Superhydrophobic and superoleophobic properties in nature. *Mater. Today* **00**, 1–13 (2015).
14. Boutard, T. *et al.* Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO₂. *Mater. Lett.* **108**, 13–16 (2013).
15. Bellanger, H., Darmanin, T., Taffin De Givenchy, E. & Guittard, F. Chemical and physical pathways for the preparation of superoleophobic surfaces and related wetting theories. *Chem. Rev.* **114**, 2694–2716 (2014).

CHAPITRE 3

Réglementation, toxicité des nanoparticules & innocuité des polymères greffés



La mise sur le marché d'un produit est soumise à différentes réglementations dépendantes du pays et de l'application. Le premier texte réglementaire est le programme européen REACH¹. Ce texte de 2006 entré en vigueur le 1er juin 2007 concerne l'enregistrement, l'évaluation, les autorisations et restrictions de toutes les substances chimiques anciennes et nouvelles destinées à être mises sur le marché. REACH permet de rationaliser et d'améliorer l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne (UE) sur les produits chimiques. L'objectif principal de REACH est d'assurer la protection de la santé humaine et de l'environnement vis-à-vis de toutes les substances chimiques utilisées en Europe. Ce programme a également pour but de stimuler le développement de méthodes d'essai alternatives à l'utilisation des animaux, de promouvoir la libre circulation des substances au sein du marché intérieur et de renforcer la compétitivité et l'innovation. Les polymères ne font pas partie du périmètre du règlement REACH et sont donc exemptés d'enregistrement. Il n'est donc pas obligatoire de prouver l'innocuité de nos actifs vis-à-vis de la santé humaine et de l'environnement. Cependant, il tombe sous le sens de vérifier tout de même la compatibilité de nos actifs utilisés sous forme de crème barrière pour une application cutanée. Les tests d'innocuité pour la santé humaine viseront à démontrer le **potentiel irritant ou non** des composés greffés, et les tests de toxicité environnementale permettront d'en vérifier **l'impact sur les organismes** (*Daphnia magna*) constituant le **premier maillon de la chaîne alimentaire**.

I. INNOUITE CUTANEE DES POLYMERES GREFFES ET NANOPARTICULES

Le règlement cosmétique européen² interdit l'utilisation des animaux pour la commercialisation des produits. C'est pourquoi depuis de nombreuses années, la recherche de méthodes alternatives à l'expérimentation animale sous l'égide de différentes entités telles que l'ECVAM et de différentes commissions européennes comme le JRC (European Commission's Joint Research Centre) a été fortement motivée. De plus, l'expérimentation animale (*in vivo*) est souvent plus compliquée à mettre en œuvre et coûteuse (nourriture, cage, place et personnel dédiés, etc.) que l'expérimentation *in vitro*. De nombreux tests permettant l'évaluation d'un phénomène toxique sont maintenant mis au point et validés par les commissions européennes comme les Lignes Directrices OCDE³ (Organisation de coopération et de développement économique) ou les protocoles INVITTOX (ECVAM). Par exemple concernant l'évaluation de la tolérance cutanée et oculaire les méthodes validées sont les suivantes :

- Irritation cutanée : essai sur épiderme humain reconstitué (LD OCDE n° 439)⁴.

- Irritation oculaire :
 - Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (LD OCDE n°437)⁵.
 - Méthode d'essai sur œil de poulet isolé (LD OCDE n°438)⁶.
 - Test de cytotoxicité au rouge neutre : Neutral Red Uptake (NRU) (INVITTOX protocole n°46, 1992)⁷ ou Neutral Red Release (NRR) (INVITTOX n°54, 1992).
 - Méthode d'essais sur membranes chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule embryonné (HET-CAM) (INVITTOX protocole N°47, 1992)⁸.

Compte-tenu de la faible irritation oculaire dont les soins du visage doivent faire preuve les tests les plus répandues pour la mise sur le marché de ces produits sont les tests au rouge neutre et le HET-CAM (également les moins coûteux et compliqués à mettre en place). De plus, si une substance est non irritante pour les yeux elle le sera encore moins pour la peau. Il est souvent demandé de valider la sécurité du produit sur au moins deux tests d'innocuité différents.

Les trois actifs polymères (PSi, PCe et PTi) sont testés aux concentrations maximales de dispersion dans une solution aqueuse (eau ou sérum physiologique) : 18% pour le PSi et PTi et 13,3% pour le PCe. Egalement, les nanoparticules ont été testées (en pourcentage contenu dans le polymère dilué soit 8% pour la silice et 4,4% pour la cérine) afin de vérifier à quel ingrédient serait due une éventuelle toxicité. Peu de données de toxicité cutanée sont disponibles dans la littérature concernant les nanoparticules de cérium et silice. Au contraire, l'utilisation de particules de titane très répandue dans les produits solaires a mené le SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety de l'UE) à donner son opinion sur les formes nanométriques de dioxyde de titane⁹. La conclusion est la suivante : les formes de dioxyde de titane respectant les conditions suivantes sont considérées comme non toxiques et peuvent être utilisées dans un produit cosmétique :

- Pureté > 99,5%.
- Doivent contenir la forme rutil (photo-sable dont l'activité catalytique est inférieure à 10%) ou un mélange avec moins de 5% de la forme anatase (photo-instable et phototoxique).
- Peuvent être revêtus de certains éléments présents dans le document d'opinion.
- La surface spécifique en volume ne doit pas excéder $460\text{m}^2/\text{cm}^3$.
- Ratio d'aspect (rapport entre longueur et diamètre) compris entre 1,5 et 4,5 (correspondant à des formes plutôt rondes, non fibrillaires ou en aiguilles).

Les nanoparticules de titane (TiO_2) fournies par Lancaster respectent toutes ces conditions, il n'est donc pas nécessaire d'en révéifier l'innocuité. Seules les nanoparticules de silice (SiO_2) et cérine (CeO_2) seront donc testées pour en vérifier leur innocuité cutanée.

L'innocuité des nanoparticules de silice, des polymères HASE et polymère greffés silice P_{Si} ont été réalisés sur le test NRR et HET-CAM au sein de la société COTY-Lancaster partenaire du projet. Les polymères greffés cérine P_{Ce} et titane P_{Ti} ont été réalisés sur le test NRR par la société IDEA Test (prestataire de service).

1.1. TEST DU RELARGAGE AU ROUGE NEUTRE

Le principe de ce test repose sur la capacité des cellules à adsorber le rouge neutre dans ses lysosomes¹⁰. Brièvement des fibroblastes de cornée de lapin en monocouche cellulaire sont mis en contact avec une solution de rouge neutre qui va être absorbée par les cellules. Les produits à tester sont ensuite ajoutés. Selon leur cytotoxicité, les cellules vont mourir et relarguer le rouge neutre. L'ensemble est ensuite lavé, on élimine ainsi le produit testé et le rouge neutre des cellules mortes. Les cellules vivantes sont ensuite lysées et par lecture spectrophotométrique à 540nm la viabilité cellulaire est déterminée. La comparaison à un contrôle non exposé permet de déterminer la CI₅₀, la concentration entraînant 50% de mortalité dans la population cellulaire. Le protocole détaillé est disponible en annexe 3.1. Un produit ayant une CI₅₀ inférieure à 50% et une mortalité à 50% de l'échantillon testé inférieure à 20% est considéré comme non cytotoxique. Deux contrôles doivent être réalisés : le contrôle négatif non exposé, il ne doit pas être cytotoxique (DO ~ 1) et le contrôle positif SDS dont la CI₅₀ doit être comprise entre 0,01 et 0,2 %. Le protocole complet de ce test est disponible en annexe 3.1.

Les DOs du contrôle négatif (sérum physiologique) sont à 1.3, le contrôle négatif est validé. La CI₅₀ du contrôle positif SDS est de 0,144% (soit 1,44g/L) (Figure 3-1). La valeur est comprise entre 0.01% et 0.2% comme recommandé par les normes européennes, l'expérience est donc validée.

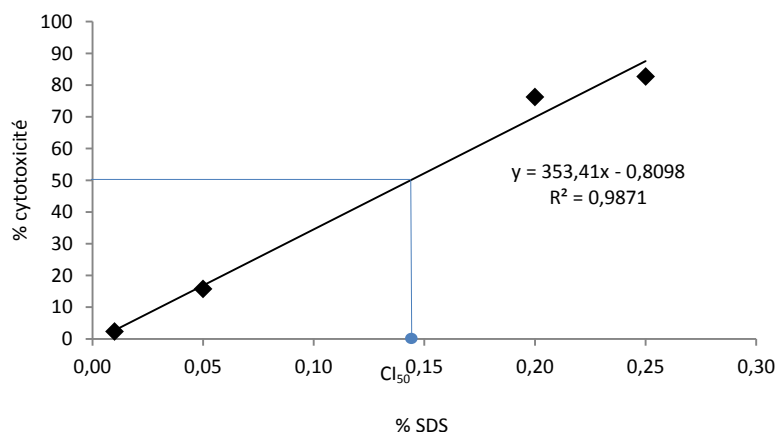


Figure 3-1 : Cytotoxicité du contrôle positif SDS.

La Figure 3-2 présente les résultats des échantillons testés : polymère (HASE), polymère greffé (PSi, PCe et PTi) et nanoparticules seules (silice et cérine). 100% de l'échantillon correspond aux concentrations maximales de dispersion.

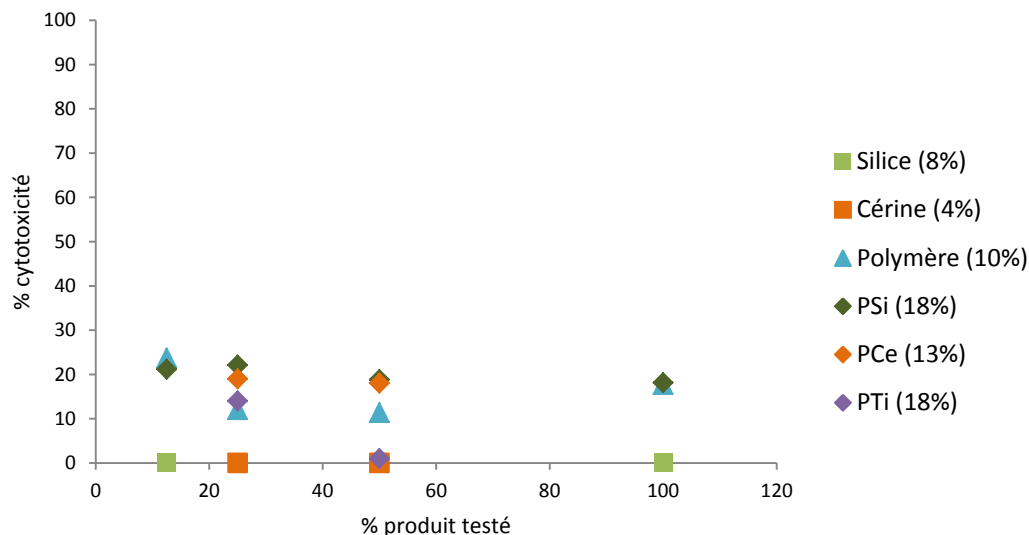


Figure 3-2 : Cytotoxicité des échantillons.

Pour les 6 échantillons aucune réponse dose-effet n'est observée. La CI50 est donc supérieure à 50% de l'échantillon testé. De plus, la mortalité à 50% de l'échantillon testé est inférieure à 20%. Ainsi d'après les normes européennes, l'ensemble des nanoparticules et des polymères testés sont classés comme non cytotoxique. Les valeurs de CI50 peuvent être déterminées comme supérieures à (50% x concentration maximum testée) :

- 90g/L pour les PSi et PTi
- 66g/L pour le PCe
- 50g/L pour le polymère non greffé HASE
- 40g/L pour les nanoparticules de silice
- 22g/L pour les nanoparticules de cérine

1.2. TEST HET-CAM

Le principe du test se base sur la réponse de la membrane chorio-allantoidienne (MCA, une membrane vascularisée) d'œuf de poule embryonné à l'application d'un produit. Les MCA sont mis en évidence en retirant délicatement la membrane sous coquillère (Figure 3-3). Les échantillons à tester sont appliqués purs, retirés après un court temps de contact et ensuite l'observation visuelle de la réponse de la MCA commence. Plusieurs phénomènes peuvent être identifiés :

- L'hyperémie : grossissement des capillaires ou vaisseaux sanguins existants
- L'hémorragie : rupture de la paroi des vaisseaux sanguins
- La coagulation qui regroupe 2 phénomènes : l'opacité de la MCA (formation d'un voile à la surface) ou la thrombose (disparition des capillaires et vaisseaux existants).

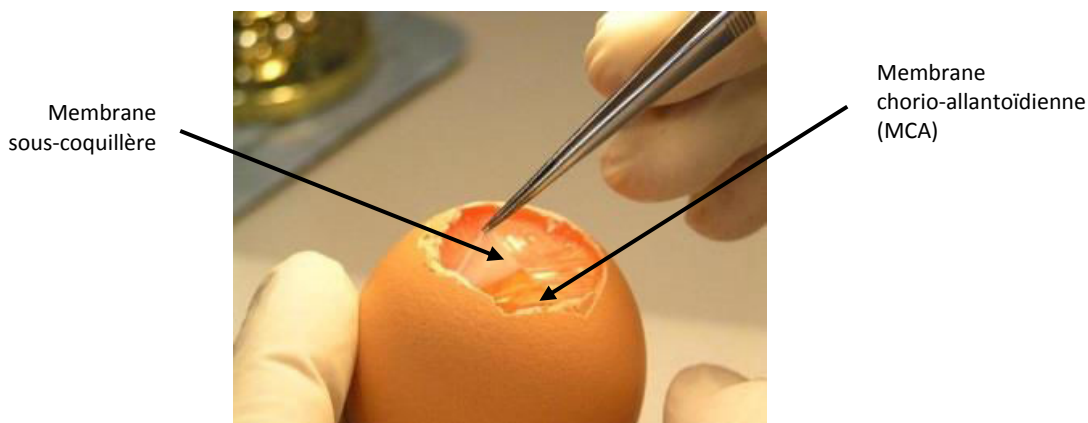


Figure 3-3 : Test HET-CAM et mise en évidence de la MCA.

Le temps d'apparition entre le retrait du produit et le phénomène ainsi que le type de phénomène sont notés et leur addition permet le calcul d'un score propre à chaque produit. Le protocole détaillé est disponible en annexe 3.2.

Les contrôles sont nécessaires pour valider l'expérience :

- un contrôle négatif non irritant, le sérum physiologique
- un contrôle positif en effet dose (faiblement irritant à irritant), le lauryl sulfobétaïne (SLB) de 0,05% à 3,2%.
- un contrôle positif très irritant : la chlorpromazine (CLP) à 1%.

Seul le polymère (HASE 10%), le polymère greffé silice (PSi 18%) et les nanoparticules de silice (8%) ont pu être testés. Les concentrations de produits sont les mêmes que pour le test de relargage au rouge neutre. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3-1 suivant.

L'expérience est valide car en accord avec les normes européennes :

- le contrôle négatif (sérum physiologique) a un score de 0, il est donc non irritant comme attendu.
- les scores du contrôle positif SBL augmentent en fonction de la concentration en SLB (de 0,05 à 3,2%) comme attendu : de faiblement irritant (pour 0,05%) à irritant (pour 0,4 et 3,2%).
- le contrôle positif CLP 1% (molécule fortement irritante) a un score de 21 et est donc classé comme irritant (car > 9) comme attendu.

Les scores de nos échantillons d'essais sont de 8 pour les PSi et HASE et 6,75 pour les nanoparticules de silice. Le polymère greffé est donc classé comme moyennement irritant.

Tableau 3-1 : Résultats de la réponse de la MCA à l'application des échantillons testés.

Echantillon	Œufs	Phénomène	Temps d'apparition		Score individuel	Score moyen	Classification finale
			minutes	secondes			
Contrôle négatif SP	1	Hyperémie	-	-	0	0	Valide (NI)
		Hémorragie	-	-	0		
		Coagulation	-	-	0		
	2	Hyperémie	-	-	0		
		Hémorragie	-	-	0		
		Coagulation	-	-	0		
Contrôle positif 0,05% SLB	1	Hyperémie	-	39	3	3	Valide (FI)
		Hémorragie	-	-	0		
		Coagulation	-	-	0		
	2	Hyperémie	-	45	3		
		Hémorragie	-	-	0		
		Coagulation	-	-	0		
Contrôle positif 0,4% SLB	1	Hyperémie	-	18	5	12	Valide (I)
		Hémorragie	-	26	7		
		Coagulation	-	-	0		
	2	Hyperémie	-	13	5		
		Hémorragie	-	26	7		
		Coagulation	-	-	0		
Contrôle positif 3,2% SLB	1	Hyperémie	-	6	5	19	Valide (I)
		Hémorragie	-	12	7		
		Coagulation	-	51	7		
	2	Hyperémie	-	3	5		
		Hémorragie	-	8	7		
		Coagulation	1	15	7		
Contrôle positif 1% CLP	1	Hyperémie	-	5	5	21	Valide (I)
		Hémorragie	-	8	7		
		Coagulation	-	15	9		
	2	Hyperémie	-	3	5		
		Hémorragie	-	27	7		
		Coagulation	-	9	9		
PSi 18%	1	Hyperémie	-	38	3	8	MI
		Hémorragie	1	27	5		
		Coagulation	-	-	0		
	2	Hyperémie	-	38	3		
		Hémorragie	1	49	5		
		Coagulation	-	-	0		
	3	Hyperémie	-	42	3		
		Hémorragie	1	7	5		
		Coagulation	-	-	0		
	4	Hyperémie	-	35	3		
		Hémorragie	1	10	5		
		Coagulation	-	-	0		
Polymère HASE-F-RF8 10%	1	Hyperémie	-	50	3	8	MI
		Hémorragie	1	12	5		
		Coagulation	-	-	0		
	2	Hyperémie	-	39	3		
		Hémorragie	1	9	5		
		Coagulation	-	-	0		
	3	Hyperémie	-	39	3		
		Hémorragie	1	10-	5		
		Coagulation	-	-	0		
	4	Hyperémie	-	42	3		
		Hémorragie	1	17	5		
		Coagulation	-	-	0		
Silice 8%	1	Hyperémie	-	37	3	6,75	MI
		Hémorragie	1	1	5		
		Coagulation	-	-	0		
	2	Hyperémie	-	31	3		
		Hémorragie	1	18	5		
		Coagulation	-	-	0		
	3	Hyperémie	-	33	3		
		Hémorragie	1	40	5		
		Coagulation	-	-	0		
	4	Hyperémie	1	5	3		
		Hémorragie	-	-	0		
		Coagulation	-	-	0		

1.3. CONCLUSION DES TESTS DE TOXICITE CUTANEE

Les **nanoparticules de silice et cérine** sont donc considérées comme **non cytotoxiques** par le test du relargage au rouge neutre et comme moyennement cytotoxiques (silice) par le HET-CAM. Ces résultats ne sont pas surprenants du fait que les nanoparticules ne sont pas connues pour induire une toxicité cutanée aiguë sur des peaux non lésées¹¹. En effet, le potentiel toxique des nanoparticules est lié à leur capacité à pénétrer facilement les barrières biologiques et en particulier les peaux lésées pour atteindre les organes cibles où ils pourront se bioaccumuler.

Le test du relargage au rouge neutre identifie tous les polymères et polymères greffés comme non cytotoxiques tandis que le test HET-CAM identifie le polymère et le polymère greffé silice comme moyennement irritant.

Ces tests représentent la toxicité oculaire. Les muqueuses oculaires étant connues pour être plus sensibles que les tissus cutanés, ces deux tests permettent de **valider l'innocuité des polymères et polymères greffés silice, cérine ou titane** et donc valider **leur biocompatibilité avec la peau et leur possible utilisation en tant qu'actif cosmétique ou dispositif médical**. Un test complémentaire sur épiderme humain reconstruit pourrait être réalisé afin de confirmer la non irritation cutanée des actifs.

Après la validation de la biocompatibilité des actifs avec la peau, il semble important de s'intéresser à l'impact de ces nouveaux actifs sur l'environnement et en particulier sur un des premiers maillons de la chaîne alimentaire aquatique : les Daphnies.

II. ETUDE DE L'ECOTOXICITE DES NANOPARTICULES ET POLYMERES GREFFES

Jusqu'à présent, les polymères ne font pas partie du périmètre du règlement REACH puisqu'aucune restriction n'est encore appliquée et qu'ils sont dispensés d'enregistrement quelle que soit la bande de tonnage. Cependant, par souci d'anticipation, nous avons souhaité observer l'impact potentiel des actifs sur des organismes environnementaux. Comme indiqué précédemment au Chapitre 1, la toxicité des nanoparticules pour l'environnement est encore très controversée tant au niveau de leur capacité à être bioaccumulées que leur toxicité intrinsèque¹²⁻¹⁵. En effet, selon une récente review concernant l'évaluation des nanoparticules de TiO₂, la disparité des méthodes ne permet pas une réelle conclusion quant à leur toxicité et leur bioaccumulation¹⁵. Le but de ce chapitre est donc d'évaluer la toxicité des nanoparticules utilisées avant et après fonctionnalisation, du polymère et des polymères greffés vis-à-vis du crustacée d'eau douce *Daphnia magna*.

De précédents tests de toxicité aigüe (*Daphnia magna*) et chronique (*Phaeodactylum tricornutum*) réalisés au laboratoire montrent que le greffage des nanoparticules de silice de 22 nm au polymère HASE-H-RH8 (homologue hydrocarboné à notre polymère) diminue la toxicité des nanoparticules¹⁶ (Figure 3-4). En effet, les nanoparticules sont liées au polymère et ne sont donc plus à l'état nanométrique (état où les nanoparticules de silice sont toxiques car bioaccumulable).

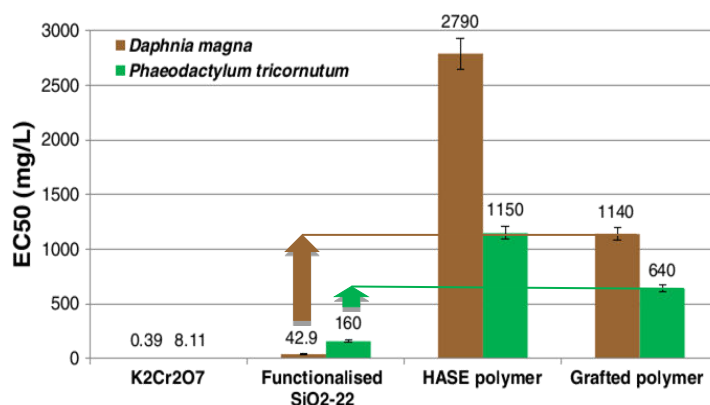


Figure 3-4 : EC50 des nanoparticules de silice et du polymère HASE-H-RH8 greffé¹⁶.

Nous étudierons donc dans un premier temps la toxicité des nanoparticules initiales (CeO₂ 10nm et TiO₂10-30nm) et après fonctionnalisation, puis la toxicité du polymère HASE-F-RF8 et des polymères greffés silice (Psi), cérine (PCe) et titane (PTi). Les tests sont réalisés sur *Daphnia magna* car ces organismes présentent (1) une grande facilité de mise en œuvre, (2) constitue les premiers maillons de la chaîne alimentaire aquatique et (3) sont des tests normés au niveau européen (ligne directrice OCDE n°202¹⁷).

2.1. PRINCIPE DU TEST ET PROTOCOLE

Les tests d'écotoxicité sont réalisés selon la ligne directrice OCDE n°202 à l'aide des kits DAPHTOKIT FTMMAGNA (R-Biopharm, France). Le principe du test consiste à mettre en contact les jeunes daphnies avec différentes concentrations de nanoparticules/polymères dispersés dans de l'eau synthétique (eau de rivière synthétique) afin de déterminer leur impact sur la mobilité des daphnies. Une daphnie qui ne bouge plus après 10 secondes d'observation est considérée comme morte. Le protocole est détaillé en annexe 3.3. L'EC50 est ensuite déterminée à l'aide du modèle PROBIT du logiciel XLSTAT. Les EC50 sont présentées à 24h et 48h comme recommandé par le fournisseur. Les données à 72h sont également présentées pour étayer la discussion.

2.2. ECOTOXICITE DES NANOPARTICULES

L'écotoxicité des nanoparticules avant et après fonctionnalisation est résumée dans le Tableau 3-2. Elle a été réalisée sur une gamme de concentrations très large avec une concentration maximale de 10g/L.

Tableau 3-2 : Ecotoxicité des nanoparticules.

Echantillons	EC50 (mg/L)		
	24h	48h	72h
CeO ₂	>10 000	>10 000	>10 000
CeO ₂ fonct.	>10 000	>10 000	1267
TiO ₂	>10 000	7 500	302
TiO ₂ fonct.	4 903	614	5

Les nanoparticules de cérine (CeO₂) peuvent être considérées comme non toxiques car l'EC50 est supérieure à 10 g/L après 72h de contact avec les daphnies. Après fonctionnalisation (CeO₂ fonct.) on observe une diminution significative de l'EC50 à 72h (1,3g/L). Les nanoparticules de titane (TiO₂) sont, elles, un peu plus toxiques que celles de cérine car des EC50 sont détectées à 48h (7,5 g/L) et 72h (0,3g/L). Après fonctionnalisation (TiO₂ fonct.), elles montrent une très forte augmentation de leur toxicité avec des EC50 de 12 (48h) à 60 (72h) fois plus faibles par rapport à TiO₂. L'accumulation des nanoparticules dans les daphnies à 72h (Figure 3-5) ne semble cependant pas être une cause de mortalité puisqu'elles sont très accumulées dans le tractus digestif ainsi que sur la tête et la queue de daphnies.

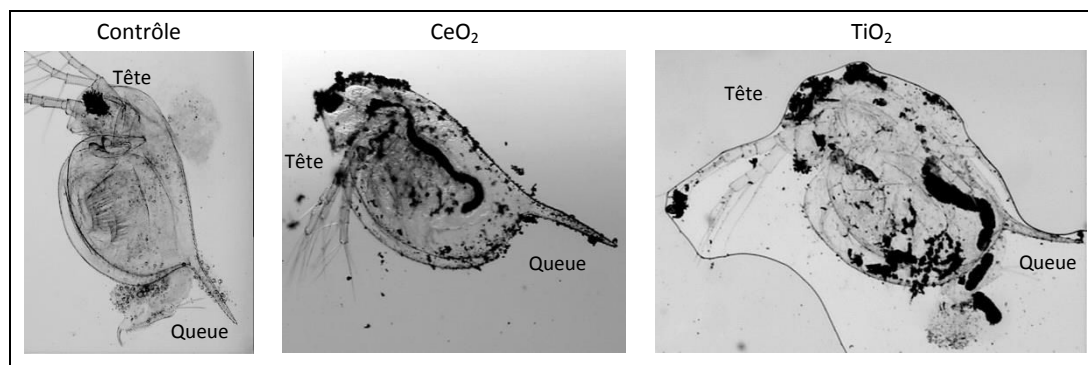


Figure 3-5 : Accumulation des nanoparticules à 72h.

Comme décrit plus tôt dans le texte, la toxicité des nanoparticules pour l'environnement est encore très controversée tant au niveau de leur capacité à être bioaccumulées que de leur réelle toxicité intrinsèque¹²⁻¹⁵.

Ici, nous démontrons donc que les nanoparticules de cérine 10nm ne sont pas toxiques pour les daphnies au contraire des nanoparticules de titane 10-30nm qui montrent une plus forte toxicité. Les caractéristiques physiques de ces nanoparticules diffèrent. Le dioxyde de titane a une densité de $4,23\text{g/cm}^3$ et montre un comportement superhydrophobe (angle de contact de 140°) tandis que le dioxyde de cerium a une densité de $7,65\text{g/cm}^3$ et montre un comportement superhydrophile (angle de contact inférieur à 10°). Ainsi, pour une même gamme de concentration, on observe la formation dans la partie supérieure des puits de tests une épaisse couche de titane faiblement dispersée dans l'eau synthétique. Les daphnies sont connues pour se nourrir de la surface, on peut donc émettre l'hypothèse que ces daphnies ont une exposition aux nanoparticules de titane supérieur à celles de cérine qui pourrait expliquer la différence de toxicité observée.

L'étape de fonctionnalisation semble rendre les nanoparticules plus toxiques, en particulier le titane. Il est donc intéressant de regarder de plus près les raisons pour lesquelles leur fonctionnalisation peut impacter leur toxicité. La fonctionnalisation des particules consiste en l'ajout de groupement amino-silane produisant des fonctions NH_2 libres (pKa 9,7) en surface des nanoparticules qui peuvent se protoner au pH de l'eau synthétique (pH 8,4). Les amines sont des sites réactionnels nucléophiles. Elles sont présentes dans l'environnement lorsqu'elles sont produites à partir de la biomasse mais également dans certaines industries. Une récente étude a évalué la présence des amines primaires à des taux inférieurs à $10\mu\text{g/L}$ dans les eaux douces et inférieurs à $1\mu\text{g/L}$ dans les eaux marines¹⁸. La toxicité de certaines amines sur les daphnies a été

réalisée : les EC50 sont comprises entre 7 et 90mg/L pour l'éthanolamine, le lauryl diméthylamine oxide, le myristyl diméthyl amine oxide et le cocoamidopropyl diméthyl amine oxide tandis qu'elles sont largement supérieures à 100 mg/L pour d'autres composés^{18,19}. L'ajout de ces fonctions amines présentant une toxicité en surface des nanoparticules pourrait donc expliquer la toxicité supérieure observée pour les nanoparticules fonctionnalisées. Cependant, les nanoparticules de titane (0.37mmol NH₂/g) étant deux fois moins fonctionnalisées que les particules de cérine (0.86mmol NH₂/g), la toxicité seule des groupements amines ne peut expliquer la plus grande différence de toxicité entre les particules de titane initiales et fonctionnalisées. Il a été observé que même après fonctionnalisation les nanoparticules de titane forment également une couche supérieure dans l'eau synthétique ce qui pourrait expliquer leur plus forte toxicité car les daphnies y sont plus exposées. Les nanoparticules fonctionnalisées de titane et cérine sont superhydrophobes après fonctionnalisation, ce qui est en accord avec les études trouvées dans la littérature qui démontrent le comportement hydrophiles des amines¹⁸.

2.3. ECOTOXICITE DES POLYMERES

L'écotoxicité des polymères est résumée dans la Figure 3-6. Le polymère HASE-F-RF8 présente une toxicité dépendante du temps de contact et 90 fois plus élevée que son homologue hydrocarboné (2,8g/L à 72h). Le fluor est un atome utilisé pour de nombreuses applications dans l'industrie (protection anti-feu, peinture et encres, additifs agricoles, antibuée, anti-opacité, anti-fouling, etc.). En effet, les liaisons C-F sont des liaisons très fortes conférant aux composés fluorés une très grande résistance thermique et chimique. Du fait de leur utilisation importante et de leur relargage dans l'environnement, un intérêt particulier pour l'écotoxicité de ces composés s'est développé depuis déjà 25ans. En effet, ces composés résistants sont persistants dans l'environnement et peuvent donc s'y accumuler, être bioaccumulés et induire des effets toxiques liés à leur toxicité intrinsèque²⁰⁻²⁵. Une étude évaluant l'écotoxicité sur Daphnies a montré qu'une gamme large de plus de 15 acides fluorés présentait des EC50 comprises entre 70 et 300mg/L et que la toxicité des acides fluorés était liée directement à la longueur de la chaîne fluorée²⁶. Le polymère HASE-F-RF8 présente des longues chaînes fluorées à 8 carbones, la toxicité observée semble due à la présence de fluor dans le polymère. Cependant, différentes études réalisées en Chine et aux Etats-Unis montrent que de manière générale, dans les eaux de surface (rivières, océans), souterraines, et dans les sédiments, le taux de composés perfluorés est généralement de l'ordre du nanogramme²⁷⁻³¹ et ne dépasse pas la dizaine de microgramme dans les zones contaminées³². **L'EC50 de notre polymère HASE-F-RF8 est donc bien plus élevée que les taux retrouvés dans l'environnement pour des composés fluorés déjà largement utilisés dans l'industrie.**

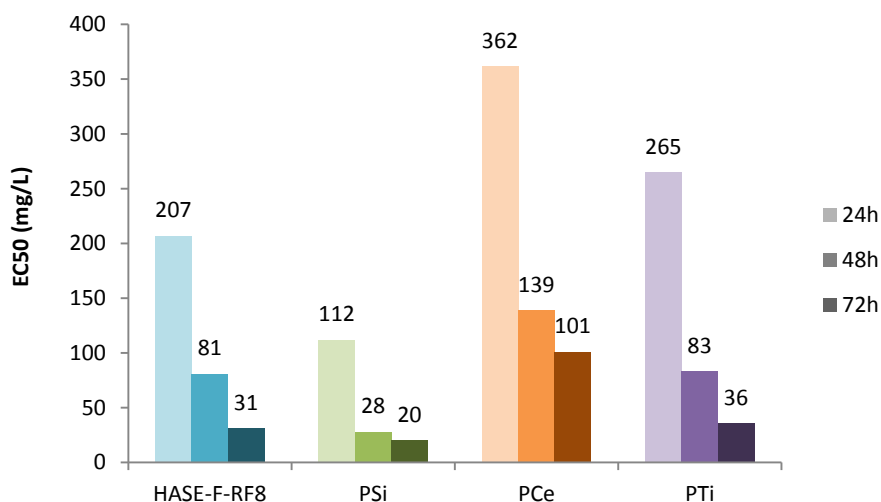


Figure 3-6 : Ecotoxicité des polymères.

Une autre hypothèse de toxicité induite par les polymères peut également être une gêne dans la mobilité des daphnies en raison du caractère visqueux des polymères modificateurs de rhéologie. Afin d'étudier la viscosité des polymères, des expériences de rhéologie en écoulement à faible taux de cisaillement ont été réalisées pour chaque polymère sur les concentrations maximales testées soit 400mg/L. Les polymères greffés répondent de la même manière que l'eau distillée (Figure 3-7). Le polymère HASE-F-RF8 semble lui un peu plus visqueux que l'eau distillée surtout pour des taux de cisaillement supérieur à $4s^{-1}$. Les polymères greffés étant composés à 30% de nanoparticules et 70% de polymère HASE-F-RF8, il est logique d'observer une légère baisse de viscosité des polymères greffés due à la diminution en quantité de polymère HASE-F-RF8. **Globalement, la plus forte des concentrations ne présente pas une viscosité telle qu'elle pourrait être la cause de la mortalité des daphnies.**

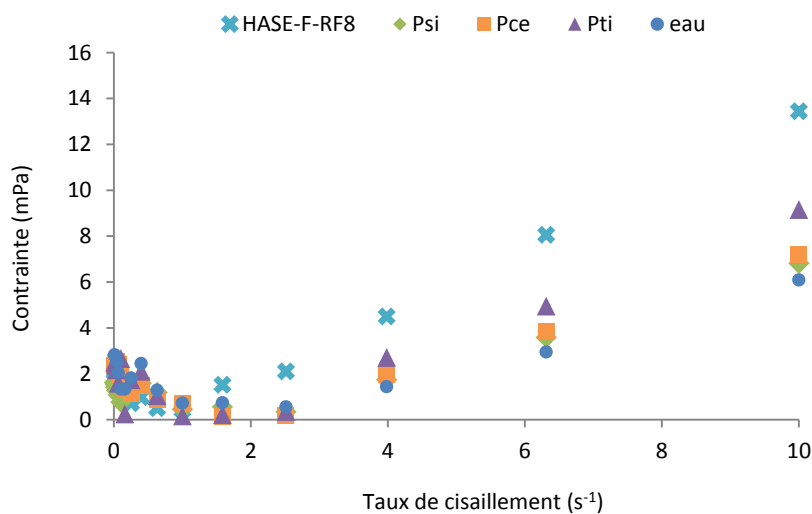


Figure 3-7 : Etude en écoulement des polymères testés.

La toxicité des polymères greffés semble globalement du même ordre que le polymère non greffé (Figure 3-6). Le polymère greffé étant composé de 30% de nanoparticules et de 70% de polymère HASE-F-RF8, on pourrait donc s'attendre à une toxicité 1/3 de fois moins élevée si celle-ci est seulement due au polymère.

Le P_{Si} est légèrement plus toxique que le polymère non greffé (surtout à 24h et 48h où l'EC₅₀ est diminué d'un facteur 2). Dans l'étude précédente concernant l'homologue hydrocarboné, le polymère greffé était également 2 fois plus toxique que le polymère non greffé¹⁶. On retrouve donc ici une partie de la toxicité apportée par les nanoparticules de silice.

Le P_{Ce} semble moins toxique que le polymère non greffé. Les nanoparticules fonctionnalisés présentant peu de toxicité (Tableau 3-2), le polymère greffé est environ 1/3 de fois moins toxique (surtout pour 24h et 48h) puisque composé à 30% de nanoparticules non toxiques.

Enfin concernant le P_{Ti}, le polymère présente la même toxicité que le polymère non greffé, il n'y a donc pas d'effet de toxicité des particules de titane sur ce polymère greffé. Les résultats à 72h sont ici intéressants car les nanoparticules fonctionnalisées présentent une EC₅₀ à 5mg/L (Tableau 3-2) tandis que le P_{Ti} a une EC₅₀ 7 fois plus élevée (36mg/L). Pour le polymère titane, on démontre donc qu'à 72h de contact, il y a un effet bénéfique du greffage des nanoparticules fonctionnalisées au polymère puisque cela permet de diminuer leur toxicité.

2.4. CONCLUSION DU TEST ENVIRONNEMENTAL

L'écotoxicité sur daphnies a montré que :

- les nanoparticules initiales de cérine 10nm et titane 10-30nm ne sont pas toxiques malgré leur accumulation dans les daphnies.
- la fonctionnalisation influence faiblement la mouillabilité et la toxicité des particules de cérine tandis qu'elle rend les particules de titane beaucoup plus toxique et modifie complètement leur mouillabilité et donc leur dispersion dans l'eau.
- le polymère HASE-F-RF8 présente une certaine toxicité comparée à son homologue hydrocarboné. Cette toxicité est sûrement due à la toxicité intrinsèque des longues chaînes fluorées.
- le greffage des nanoparticules au polymère ne permet de diminuer que la toxicité des nanoparticules de titane fonctionnalisées car ce sont les seules à présenter à 72h une toxicité plus importante que la toxicité intrinsèque du polymère fluoré. Le P_{Si} lui présente une toxicité un peu plus importante due aux particules de silice tandis qu'à l'inverse le P_{Ce} présente une toxicité moins importante du fait de l'absence de toxicité des nanoparticules de cérine.

Globalement, la dose impliquant une toxicité des polymères greffés est largement supérieure aux concentrations de composés fluorés bioaccumulés dans l'environnement. Ainsi, un potentiel relargage de ces composés dans l'environnement étant donné leur utilisation (plus faible que celle des composés fluorés très répandus) n'induirait pas d'écotoxicité.

L'innocuité cutanée a donc été vérifiée pour les actifs greffés silice, cérine et titane. La toxicité environnementale semble faible. La balance bénéfice / risque semble donc très élevée. Il s'agit maintenant d'intégrer ces nouveaux polymères protecteurs dans des formules filmogènes permettant de conserver l'efficacité des actifs et de conférer une barrière efficace contre la pénétration du paraoxon.

Références bibliographiques

1. Règlement (CE) no 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agenc. *J. Off. l'Union Eur. L 136/3* (2007).
2. Règlement (CE) N°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. *J. Off. l'Union Eur. L 342/59* (2009).
3. OECD Library. <http://www.oecd-ilibrary.org/>
4. Guideline for the testing of chemicals. In vitro skin irritation : Reconstructed Human Epidermis test method (n°439). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2010).
5. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. *OECD Guidel. Test. Chem.* (2013). doi:10.1787/9789264203846-en
6. Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage IN. *OECD Guidel. Test. Chem.* (2004). doi:10.1787/9789264203785-en
7. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity Based on Recommendations from an International Workshop Organized by ICCVAM and NICEATM. *Append. C SOP BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotox. Test* (2001).
8. ICCVAM tests method evaluation report: Current validation status of in vitro test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products. *Append. B3 ICCVAM-Recommended Protoc. Futur. Stud. Using Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membr. Test Method* (2010).
9. Opinion on Titanium Dioxide (nano form). COLIPA n°S75. *Sci. Comm. Consum. Saf.* (2013).
10. Zuang, V. The neutral red release assay: A review. *ATLA* **29**, 575–599 (2001).
11. Park, Y. H. *et al.* Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model. *Toxicology* **267**, 178–181 (2010).
12. Yang, W. *et al.* TiO₂ nanoparticles act as a carrier of Cd bioaccumulation in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 7568–7575 (2014).
13. Gao, J., Bonzongo, J.-C. J., Bitton, G., Li, Y. & Wu, C.-Y. Nanowastes and the environment: using mercury as an example pollutant to assess the environmental fate of chemicals adsorbed onto manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 808–10 (2008).
14. Yu, R., Fang, X., Somasundaran, P. & Chandran, K. Short-term effects of TiO₂, CeO₂, and ZnO nanoparticles on metabolic activities and gene expression of *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere* **128**, 207–215 (2015).

15. Minetto, D., Libralato, G. & Volpi Ghirardini, A. Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: an overview. *Environ. Int.* **66**, 18–27 (2014).
16. Clément, L. *et al.* Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **450-451**, 120–8 (2013).
17. Test No. 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test. *OECD Guidel. Test. Chem.* (2004).
18. Poste, A. E., Grung, M. & Wright, R. F. Amines and amine-related compounds in surface waters: A review of sources, concentrations and aquatic toxicity. *Sci. Total Environ.* **481**, 274–279 (2014).
19. García, M. T., Campos, E. & Ribosa, I. Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere* **69**, 1574–1578 (2007).
20. Martin, J. W., Mabury, S. a, Solomon, K. R. & Muir, D. C. G. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 196–204 (2003).
21. Shaw, S. *et al.* Specific accumulation of perfluorochemicals in harbor seals (*Phoca vitulina concolor*) from the northwest Atlantic. *Chemosphere* **74**, 1037–1043 (2009).
22. Lau, C. *et al.* Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* **99**, 366–394 (2007).
23. Quinete, N. *et al.* Specific profiles of perfluorinated compounds in surface and drinking waters and accumulation in mussels, fish, and dolphins from southeastern Brazil. *Chemosphere* **77**, 863–869 (2009).
24. Zhao, Y. G., Wong, C. K. C. & Wong, M. H. Environmental contamination, human exposure and body loadings of perfluorooctane sulfonate (PFOS), focusing on Asian countries. *Chemosphere* **89**, 355–368 (2012).
25. Senthilkumar, K., Ohi, E., Sajwan, K., Takasuga, T. & Kannan, K. Perfluorinated compounds in river water, river sediment, market fish, and wildlife samples from Japan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **79**, 427–431 (2007).
26. Ding, G. H., Frömel, T., van den Brandhof, E. J., Baerselman, R. & Peijnenburg, W. J. G. M. Acute toxicity of poly- and perfluorinated compounds to two cladocerans, *Daphnia magna* and *Chydorus sphaericus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 605–610 (2012).
27. Wang, P., Wang, T., Giesy, J. P. & Lu, Y. Perfluorinated compounds in soils from Liaodong Bay with concentrated fluorine industry parks in China. *Chemosphere* **91**, 751–757 (2013).
28. Yang, L., Zhu, L. & Liu, Z. Occurrence and partition of perfluorinated compounds in water and sediment from Liao River and Taihu Lake, China. *Chemosphere* **83**, 806–814 (2011).
29. Bao, J. *et al.* Perfluorinated compounds in urban river sediments from Guangzhou and Shanghai of China. *Chemosphere* **80**, 123–130 (2010).

30. Schultz, M. M., Barofsky, D. F. & Field, J. A. Fluorinated Alkyl Surfactants. *Environ. Eng. Sci.* **20**, 487–501 (2003).
31. Zareitalabad, P., Siemens, J., Hamer, M. & Amelung, W. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater - A review on concentrations and distribution coefficients. *Chemosphere* **91**, 725–732 (2013).
32. Post, G. B., Cohn, P. D. & Cooper, K. R. Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: A critical review of recent literature. *Environ. Res.* **116**, 93–117 (2012).

CHAPITRE 4

Formulation et screening de l'efficacité



Les actifs synthétisés dans le Chapitre 2 ne sont pas utilisables seuls en solution car ils craquent au séchage. L'objectif de ce chapitre est d'intégrer les polymères greffés avec des nanoparticules de silice (SiO_2 – P_{Si}), cérine (CeO_2 – P_{Ce}) ou titane (TiO_2 - P_{Ti}) dans des formules **filmogènes** permettant de créer une barrière homogène sur la peau contre la pénétration du paraoxon. Les conditions auxquelles devront répondre les formules sont les suivantes : **(1)** la formulation doit conserver le **réseau tridimensionnel** de nanoparticules (dispersion homogène de celles-ci dans la formule) ; **(2)** la formulation doit former une **barrière filmogène** sur la peau ; **(3)** la formule doit être **stable** ; **(4)** la formule doit conserver les **propriétés de protection** des polymères greffés vis-à-vis du paraoxon. Les formules réalisées sont ensuite testées lors d'un premier screening sur **membranes siliconées *in vitro***. A la fin de ce chapitre est réalisée une étude rhéologique et de stabilité des formules sélectionnées.

I. FORMULATION ET SELECTION DES CREMES A TESTER

1.1. METHODE DE FORMULATION

La formulation a pour but de former des réseaux de polymères stables, homogènes et filmogènes c'est-à-dire qui ne craquent pas au séchage. Les polymères greffés peuvent être classés en deux types de catégorie : (1) gélifiant : P_{Si} ou P_{Ce} et (2) très faiblement gélifiant : P_{Ti}. Les formules réalisées sont des gels monophasiques dont le polymère peut jouer le rôle de gélifiant/stabilisant (P_{Si}/P_{Ce}). Selon les propriétés rhéologiques des actifs, les ingrédients sont donc choisis pour leur potentiel filmogène et/ou épaississant.

Principes actifs : les actifs sont les polymères greffés avec des nanoparticules de SiO_2 , CeO_2 ou TiO_2 .

Ingrédients : les ingrédients ont tous été choisis pour leur capacité à apporter un caractère filmogène à une formule. Ce sont des agents filmogènes, rétenteurs, épaississants, etc. sélectionnés après étude de leur compatibilité avec le polymère et de leur protocole d'utilisations (% et méthode d'intégration). L'étude de la mouillabilité des ingrédients montre qu'ils sont tous oléophiles, c'est donc le polymère HASE-F-RF8 qui apportera les propriétés de répulsion de par sa teneur en fluor (Tableau 4-1).

pH : le pH des formules est fixé à 7 à l'aide d'une solution aqueuse de soude 1N.

Tableau 4-1 : Liste des ingrédients utilisés pour la formulation et leurs propriétés.

Ingrédient	Nom commercial	Forme/pureté	Utilisation	Propriétés lipophobes
Silicone	Rore Fluide SF 350 (Rore Technologies)	liquide	pouvoir filmogène (liposoluble)	-
Silicone	Dow Corning 2501 (DowCorning)	pâte	pouvoir filmogène (hydrosoluble)	39±9
Polymère acrylique (PA)	Fixate™ Superhold Polymer (Lubrizol)	30% (p/p) dans l'eau	pouvoir fixant/filmogène agent gélifiant/épaississant	41±6
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Plasdone K29/32 (Ashland Inc.)	poudre	pouvoir filmogène	23±2
Polymère acrylique (PA)	Daitosol 5000STY (Daito Kasei)	50% (p/p) dans l'eau	pouvoir filmogène	18±4
Polymère acrylique (PA)	Carbopol Ultrez 20 (Lubrizol)	poudre	agent gélifiant/épaississant	21±2
Polyalcool	Glycérine (Sigma)	liquide	pouvoir rétenteur	-

La mouillabilité des ingrédients (propriétés lipophobes via l'angle de contact mesuré par goniométrie) vis-à-vis de l'huile d'olive (4,9µL) a été réalisée par étalement des liquides et pré-dispersion des poudres dans l'eau. Les ingrédients ont été étalés à 5mg/cm² sur plaque de verre et sécher avant mesure. Le silicone RORE et la glycérine n'ont pas séchés et n'ont pas pu être mesurés.

Ces formules sont réalisées sur 1-1,5g d'actif pour obtenir 15 à 20g de formule finale.

1.2. METHODE D'ANALYSE DES FORMULES

1.2.1. Choix de la méthode de dépôt des formules

Parmi les méthodes de dépôts possibles, les deux les plus utilisées sont l'étalement à la spatule en silicone ou par la méthode du doigt de gant (Figure 4-1). L'homogénéité de ces méthodes peut être discutée. En effet, la méthode du doigt de gant est peu homogène du fait du mouvement circulaire sur l'explant. Ainsi, selon où le toxique sera déposé l'efficacité pourra être impactée (couche plus ou moins épaisse). La spatule en silicone est une méthode d'étalement plus homogène si elle est bien réalisée. Pour cela on positionne la spatule dans son sens le plus large, on dépose le topique sur un côté puis on l'étale en conservant la spatule toujours à la même hauteur par rapport à la membrane afin d'avoir un dépôt ayant une épaisseur homogène sur toute la membrane. La méthode de la **spatule en silicone** est donc choisie pour l'ensemble de l'étude des formulations et des **tests d'efficacité**.

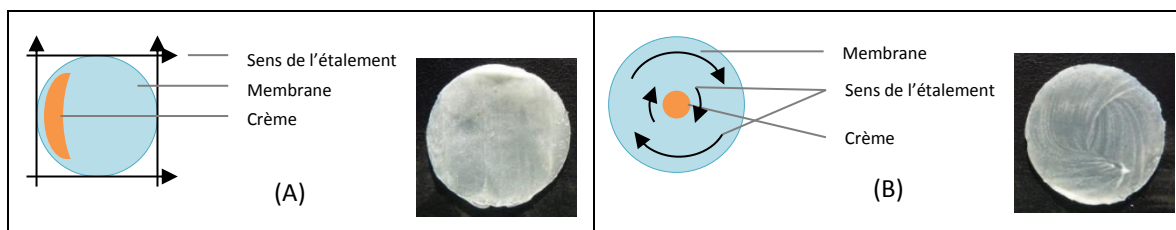


Figure 4-1 : Méthodes d'étalements des formules : étalement à la spatule en silicone (A), méthode du doigt de gant (B).

1.2.2. Aspect visuel et microscopique des formules

Plus de 80 formules ont été réalisées pour améliorer l'aspect des dépôts. Les formules qui craquèlent en séchant à température ambiante ou à 32°C (température des expériences d'efficacité) sont donc discriminées par simple aspect visuel (dose appliquée de 27mg/cm²) (Figure 4-2). L'homogénéité et l'aspect des formules sont ensuite étudiés par microscopie. Ces observations sont additionnelles, **le critère discriminant pour la sélection des formules sera l'observation visuelle.**

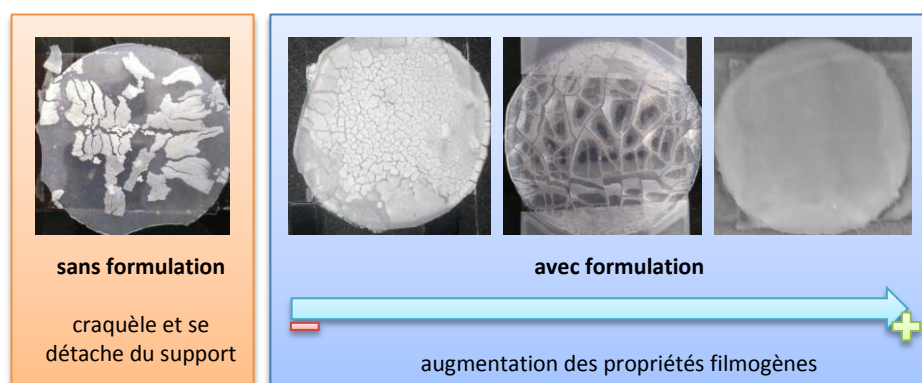


Figure 4-2 : Processus des objectifs de formulation.

Sur la figure suivante (Figure 4-3) on peut observer les microgouttelettes de silicone dans une formule à base de silicone avant séchage et son aspect microscopique après séchage et craquellement.

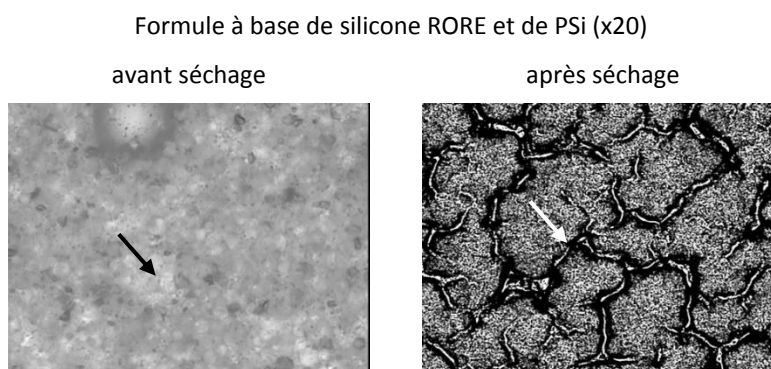


Figure 4-3 : Observations microscopiques des dépôts de formules.

1.3. SELECTION DES FORMULES A BASE DE POLYMERE GREFFE SILICE

Le Tableau 4-2 résume les 19 formules réalisées pour le PSi. Les ingrédients sont intégrés à différents pourcentages (recommandé par les fournisseurs ou classiquement utilisé en cosmétique). Les taux de glycérine (SI01, SI02), de Fixate (SI03, SI07) ou de silicones (SI18, SI19) ont dû être augmentés pour rendre les formules homogènes et filmogènes après séchage. Le PVP à 4% (SI12) et le Daitosol à 5% (SI14) n'ont pas suffi à rendre la formule filmogène, c'est pourquoi ces formules ont été additionnées de glycérine (SI13, SI15). Egalement, le Fixate, un polymère épaississant a dû être intégré à 8% pour obtenir un aspect filmogène (SI07, SI10) ce qui a rendu la formule trop compacte pour être étalée correctement, c'est pourquoi les formules contenant moins de Fixate et non filmogène (SI03, SI05) ont également été additionnées de glycérine (SI04, SI06). **Les formules filmogènes et étalables facilement ont été sélectionnées pour les tests d'efficacité (en gras dans le tableau).**

Tableau 4-2 : Formulations du PSi.

Formule	Polymère (p/p)	Ingrédients (p/p)	Aspect/remarques	Aspect après séchage sur membranes siliconées
SI01	PSi 10%	Glycérine 2%	très fluide	craquèle
SI02	PSi 13%	Glycérine 3,7%	fluide	ne craquèle pas
SI03	PSi 10%	Fixate 3%	compact	craquèle
SI04	PSi 9,8%	Fixate 3% Glycérine 2,8%	compact mais facile à étaler	ne craquèle pas
SI05	PSi 10%	Fixate 4%	compacte	craquèle
SI06	PSi 9,8%	Fixate 4% / Glycérine 2,2%	trop compacte pour être étalé de manière homogène	ne craquèle pas
SI07	PSi 9%	Fixate 8%	très compact, très viscoélastique	ne craquèle pas
SI08	PSi 8,8%	Fixate 7,8% Glycérine 4,7%	trop compacte pour être étalé de manière homogène	ne craquèle pas
SI09	PSi 10,1%	Fixate 8,4% Glycérine 5,1%	trop compacte pour être étalé de manière homogène	ne craquèle pas
SI10	PSi 9%	Fixate 11%	trop compacte pour être étalé de manière homogène	ne craquèle pas
SI11	PSi 10%	PVP 2%	fluide avec plein de bulles	craquèle
SI12	PSi 10%	PVP 4%	fluide avec plein de bulles	craquèle à 32°C
SI13	PSi 9,6%	PVP 3,8% Glycérine 4,1%	fluide	ne craquèle pas
SI14	PSi 10%	Daitosol 5%	fluide, beaucoup de bulle	craquèle à 32°C
SI15	PSi 9,5%	Daitosol 5% Glycérine 4,3%	très fluide, facile à étaler	ne craquèle pas
SI16	PSi 9%	Silicone RORE 350 9%	compact	craquèle
SI17	PSi 14%	Silicone RORE 350 14%	compact	craquèle
SI18	PSi 14%	Silicone DOW 3%	compact	craquèle
SI19	PSi 15%	Silicone DOW 15%	très fluide	ne craquèle pas

1.4. SELECTION DES FORMULES A BASE DE POLYMERE GREFFE CERINE

Le Tableau 4-3 résume les 14 formules réalisées pour le polymère greffé cérine. Pour le polymère greffé cérine le mélange d'ingrédients n'a pas été nécessaire car chaque ingrédient individuellement (<5%) a été suffisant pour rendre la formule filmogène. En effet, il a été observé que le PSi brut craquelait plus que le PCe brut (Figure 4-4). Ce dernier a donc été plus facile à formuler. Toutes les formules réalisées à base de PCe sont filmogènes, leur efficacité sera donc évaluée.

Tableau 4-3 : Formulations du PCe.

Formule	Polymère (p/p)	Ingrédient (p/p)	Aspect/remarques	Aspect après séchage sur membranes siliconées
CE01	PCe 10%	-	fluide	craquèle à 32°C
CE02	PCe 13%	Glycérine 3,7%	viscoélastique	ne craquèle pas
CE03	PCe 9%	Glycérine 3,7%	fluide	ne craquèle pas
CE04	PCe 6%	Glycérine 3,7%	très fluide	ne craquèle pas
CE05/06/07*	PCe 3%	Glycérine 3,7%	liquide et déphase	ne craquèle pas
CE08	PCe 3%	Glycérine 14%	liquid et déphase	ne craquèle pas
CE09	PCe 10%	Fixate 2%	viscoélastique	ne craquèle pas
CE10	PCe 10,3%	PVP 2%	très fluide, présence de bulle	ne craquèle pas
CE11	PCe 10%	Daitosol 5%	viscoélastique	ne craquèle pas
CE12	PCe 10%	Silicone RORE 350 2%	assez fluide, facile à étaler	ne craquèle pas
CE13	PCe 12.6%	Silicone RORE 350 13%	compact	ne craquèle pas
CE14	PCe 9,5%	Silicone DOW 2%	très fluide	ne craquèle pas

*les nanoparticules utilisées pour la formulation sont de 10 nm et ne sont pas dopées. Pour la formule CE06, les nanoparticules sont dopées avec du calcium et pour la formule CE07 les nanoparticules sont de 50nm (non dopées) afin d'observer l'effet du dopage et/ou de la taille sur l'efficacité.

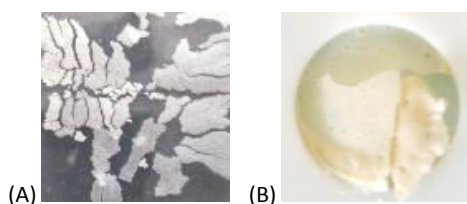


Figure 4-4 : Craquellement des polymères silice (A) et cérine (B) après séchage complet.

1.5. SELECTION DES FORMULES A BASE DE POLYMERE GREFFE TITANE

Le dioxyde de titane est déjà largement utilisé pour la protection cutanée vis-à-vis des rayons UV. Deux formes existent : l'anatase, photo-instable et phototoxique et le rutile photo-sable. Du fait de la phototoxicité de la forme anatase¹, les nanoparticules présentes dans les produits cosmétiques sont

soit des mélanges de deux formes soit des particules enrobées pour limiter leur réactivité aux UV. L'intérêt du dioxyde de titane pour la protection cutanée vis-à-vis des agents chimiques réside dans sa capacité à dégrader les produits chimiques dont certains pesticides et agents chimiques de guerre²⁻⁸.

Le dioxyde de titane utilisé provient de la société cosmétique COTY-Lancaster. Ce dioxyde de titane a plusieurs avantages : (1) il est 100% rutile, il ne présentera donc pas de potentiel phototoxique et donc de danger pour notre application ; (2) il est enrobé de silice, le pouvoir absorbant de ces particules pourra être potentiellement augmenté ; (3) il est hydrophobe tout comme le polymère fluoré.

Le greffage des nanoparticules de titane a été réalisé, il a donc été lyophilisé pour être intégré dans une formule. Cependant, la formulation n'a pas été un succès, des études complémentaires seraient nécessaires.

1.6. SÉLECTION DES FORMULES A BASE DE MÉLANGES DE POLYMERES PSI/PCE

Un effet synergique entre nanoparticules serait particulièrement intéressant (notamment pour diminuer la quantité de cérine qui n'est actuellement pas disponible de manière commerciale contrairement aux nanoparticules de silice). Le Tableau 4-4 résume les formules en mélange qui ont été réalisées. Ces trois formules sont filmogènes, elles seront donc testées en efficacité.

Tableau 4-4 : Formulations à base de mélanges.

Formule	Polymères (p/p)	Ingrédients (p/p)	Aspect/remarques	Aspect après séchage sur membranes siliconées
M01	PCe5%; PSi 4,6%,	Fixate 5,2%	très compact, difficile à étaler	ne craquèle pas
M02	PCe 5% Psi 5%	Daitosol 5%	très fluide, facile à étaler	ne craquèle pas
M03	PCe 5% Psi 5%	Glycérine 3,7% PVP 1,9%	fluide, étalable	ne craquèle pas

1.7. ÉTUDE DE LA MOUILLABILITÉ DES DÉPÔTS DE TOPIQUES

L'hypothèse formulée ici est la suivante : plus une formule tend vers l'oléophobie (angle de contact > 90°) plus la formule repousse le toxique et devrait être efficace vis à vis d'agents comme le paraoxon. On observe sur membranes siliconées lors de l'addition d'ingrédients comme les silicones (SI19, CE13, CE12), une tendance de la formule à être plus lipophile (Figure 4-5). On perd donc ainsi la capacité du polymère fluoré à repousser les toxiques lipophiles (comme le paraoxon ou le VX). Si la mouillabilité a un impact significatif sur l'efficacité les meilleures formules devaient être SI07 (78±1°)

et SI04 ($68 \pm 3^\circ$) pour le PSi et CE02 ($69 \pm 1^\circ$) pour le PCe. Egalement BD ($87 \pm 3^\circ$) devrait être la formule la plus efficace.

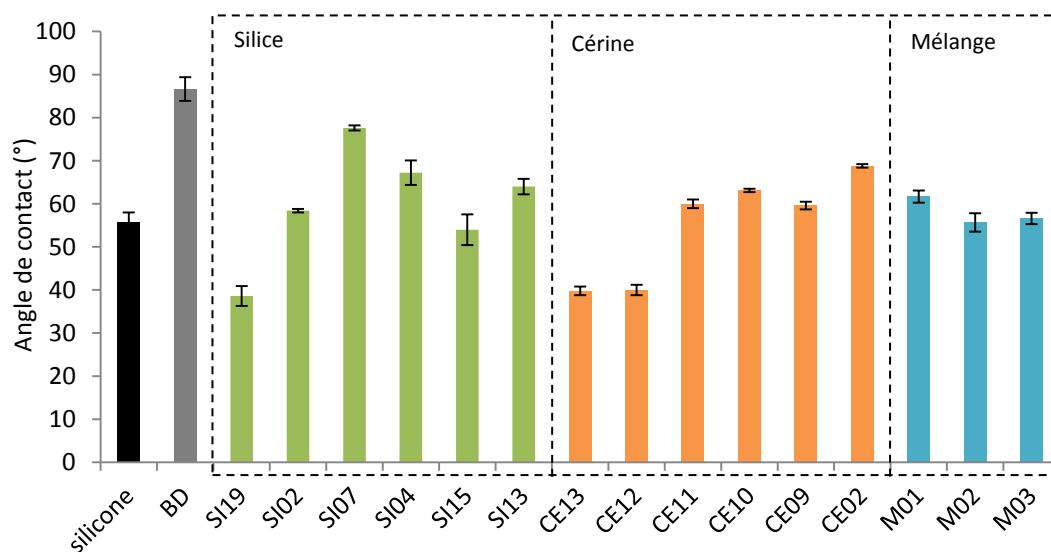


Figure 4-5 : Mouillabilité des formules sélectionnées.

1.8. CONCLUSION

Les formules filmogènes suivantes ont donc été sélectionnées pour être testées vis-à-vis de leur efficacité contre la pénétration du paraoxon :

- PSi : **SI02, SI04, SI07, SI13, SI15, SI19**
- PCe : **CE02, CE09, CE10, CE11, CE12, CE14**
- Mélange : **M01, M02, M03**

Les tests d'efficacité réalisés pour cette étude seront décrits ci-après. Selon les résultats de mouillabilité les formules SI04, SI07, CE02 et BD devraient être les plus efficaces.

II. SCREENING *IN VITRO* SUR MEMBRANES SILICONEES VIS-A-VIS DU PARAOXON

Un test d'efficacité comme tout test toxicologique et biologique doit être réalisé en prenant en compte la faisabilité, le coût, la facilité de mise en œuvre et la pertinence du modèle. Nous suivrons donc le schéma suivant pour l'efficacité des formules sélectionnées : screening *in vitro* sur membranes artificielles puis analyses *in vitro* détaillées des formules sélectionnées et enfin validation de leur efficacité sur peau humaine *in vitro* (Figure 4-6). Les tests *in vivo* n'ont pas été réalisés au cours de ce projet mais constituent une étude nécessaire supplémentaire afin de valider l'efficacité des nouvelles formules candidates.

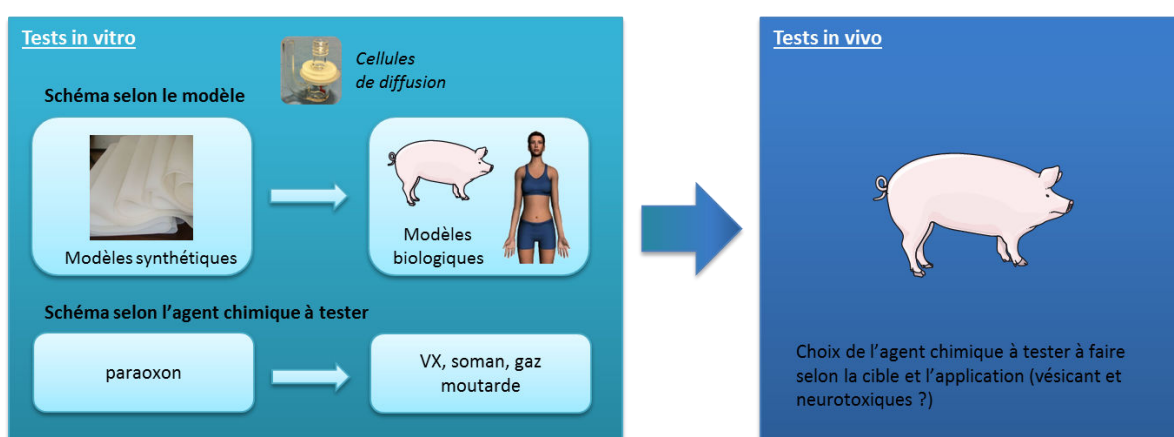


Figure 4-6 : Schéma envisagé pour le screening des formules.

Le premier screening *in vitro* réalisé sur membranes siliconées est donc présenté dans ce chapitre. Une évaluation de la pénétration sur 3 réplicats après 6h de contact avec le paraoxon permet une rapide sélection des formules efficaces. Les crèmes candidates sont testées à 50mg/cm² pour les formules à base de P_{Si} et 27mg/cm² pour les formules à base de P_{Ce} et les mélanges et entièrement séchées avant dépôt du toxique (2-3h). Les protocoles de mesure de l'efficacité des formules et de dosage sont détaillés en annexe 4.1 et 4.2. Une crème efficace diminue significativement la quantité de paraoxon retrouvée dans le milieu récepteur à la fin de l'expérience (confirmé sur 3 autres réplicats). Des études plus poussées sur la cinétique de pénétration des formules sélectionnées seront réalisées dans le Chapitre 5 pour les formules sélectionnées.

2.1. EFFET DES INGREDIENTS SUR LA PENETRATION DU PARAOXON

Parmi les ingrédients testés seuls les résultats les plus prometteurs sont présentés ici (Figure 4-7). Une formule à base de glycérine et d'eau n'est pas étalable sur membrane siliconée, c'est pourquoi elle a été intégrée dans la crème contrôle BarrierDerm. Cette crème commerciale n'ayant

aucun effet protecteur (BarrieDerm, même lot et stable dans le temps donc non variable d'une expérience à l'autre) est également utilisée comme contrôle négatif pour valider la méthode d'étalement. L'utilisation d'un contrôle positif tel que la crème AG-7 serait également intéressante. Aucun des ingrédients testés ne diminue la pénétration du paraoxon après 6h d'exposition par rapport aux membranes non protégées (barre noire) ce qui permet de conclure qu'aucun ingrédient n'a d'effet protecteur significatif sur 6h. Ainsi, un effet protecteur des formules sera dû uniquement à la présence de l'actif dans la formule.

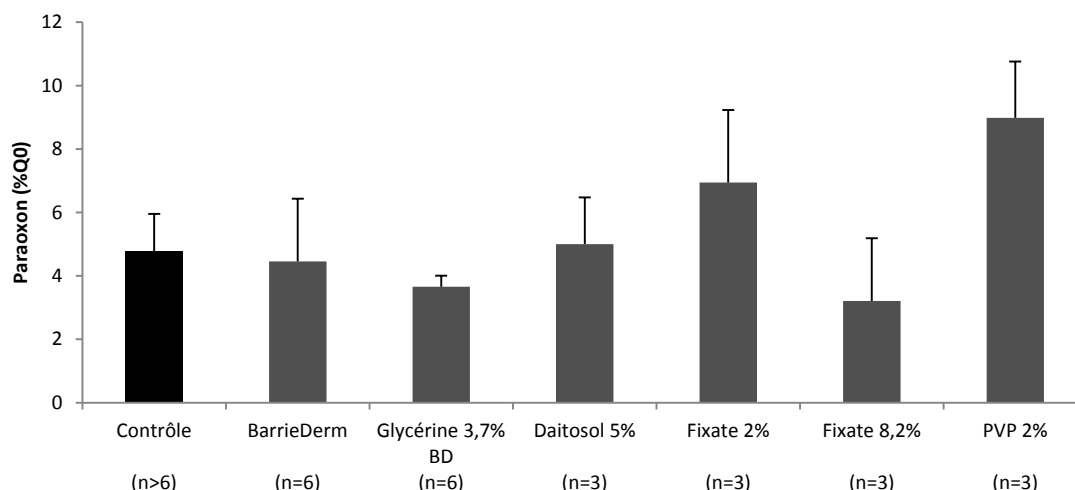


Figure 4-7 : Effet des ingrédients sur la pénétration du paraoxon (quantité = 50mg/cm²).

(contrôle = membrane siliconée non protégée).

2.2. SÉLECTION DES FORMULES À BASE DE POLYMERE GREFFE SILICE

La Figure 4-8 présente les résultats d'efficacité à T6h des formules à base de PSi. Ces formules contiennent toutes environ 10% d'actif.

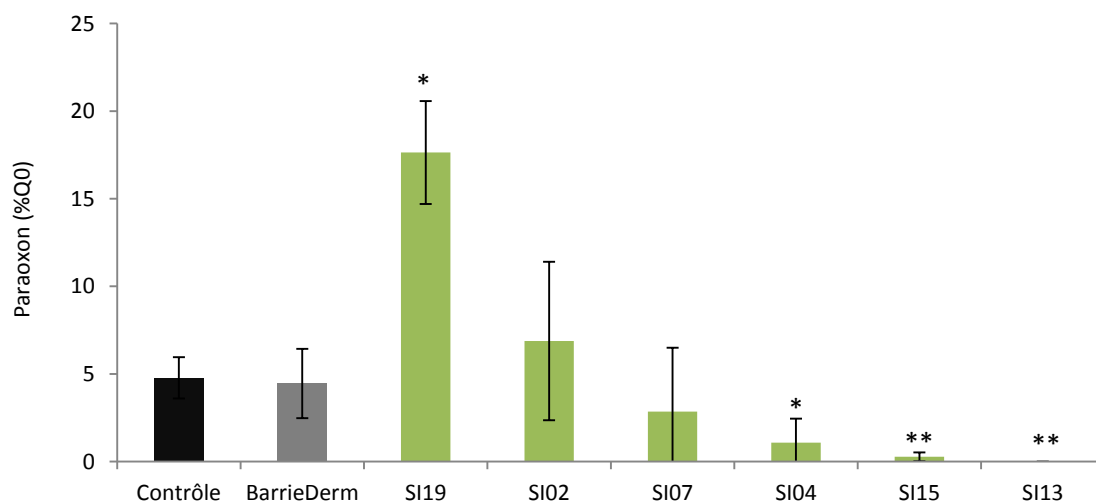


Figure 4-8 : Efficacité des formules à base de SiO₂ à T6h vis-à-vis de la pénétration du paraoxon (TPC = 50mg/cm²).

(*indiquent une différence significative (n=6) avec les membranes non protégées (Contrôle) ; *p<0,05, ** p< 0,001).

La première observation est que la formule à base de silicone (SI19) favorise la pénétration comme cela était prévu par la mesure de l'angle de contact de la formule.

L'utilisation d'ingrédient individuellement (Glycérine – SI07 et Fixate – SI02) ne permet pas de diminuer significativement la pénétration du paraoxon (le Daitosol et le PVP, ne permettant pas d'avoir un dépôt filmogène, n'ont pu être testés seuls en efficacité). Egalement, les formules à base de Fixate sont très compactes et difficiles à appliquées. La glycérine est un ingrédient qui permet d'obtenir une formule plus lisse et fluide. De plus, elle peut être facilement ajoutée en fin de formulation et seulement 2% suffisent à obtenir une formule filmogène, c'est pourquoi elle a été choisie pour être mélangée avec d'autres ingrédients. Trois formules avec un mélange d'ingrédients ont donc été réalisées (Figure 4-8). La première est un mélange **Fixate-Glycérine** (SI04). En effet, le Fixate est un agent épaississant qui doit être intégré à une forte concentration pour obtenir un effet filmogène (>8%) ce qui donne un aspect très compact à la formule et une difficulté à l'étaler. L'ajout de Glycérine dans cette formule a permis de diminuer la quantité de Fixate et d'obtenir une formule filmogène, plus fluide, plus facile à appliquer et plus efficace ($1,1 \pm 1,4 \%Q0$) que la formule à base de Fixate ($2,9 \pm 3,6 \%Q0$) ou de glycérine seule ($6,9 \pm 4,5 \%Q0$). Egalement, l'addition de **glycérine** sur les formules à base de **Daitosol** et **PVP** (non filmogènes) a permis d'obtenir des formules filmogènes et efficaces (SI15 : $0,21 \pm 0,12 \%Q0$ et SI13 : $0,0002 \pm 0,0001 \%Q0$).

Selon les résultats de mouillabilité, SI07 devait être la plus efficace (angle de contact = 78°). C'est cependant SI15 (angle de contact = 54°), SI13 (angle de contact = 64°) et SI04 (angle de contact = 67°) qui présentent les meilleures propriétés de protection. Par contre c'est la formule la plus oléophile, SI19 (angle de contact = 39°) qui présente la moins bonne protection (favorise la pénétration). **Le phénomène de pénétration ne s'explique pas seulement par l'état de surface. Il est dépendant également de différents facteurs physico-chimiques et dépendant du modèle utilisé (diffusion du toxique au travers du réseau polymère de la formule et de la membrane, différence d'affinité du paraoxon entre la formule et la membrane, type de nanoparticules, etc.).** On peut donc conclure que la mouillabilité peut être utilisée pour discriminer les TPC candidats à faible angle de contact (mouillabilité élevée), ceux-ci montreront surement une faible efficacité mais ce paramètre ne pourra pas être utilisé pour prédire l'efficacité de formules tendant vers l'hydrophobie.

La formule la plus efficace est SI13, elle est donc sélectionnée pour être étudié plus en détail.

2.3. SÉLECTION DES FORMULES A BASE DE POLYMERE GREFFE CERINE

La Figure 4-9 résume les résultats des formules à base de polymères greffés avec des nanoparticules de cérine de 10 nm.

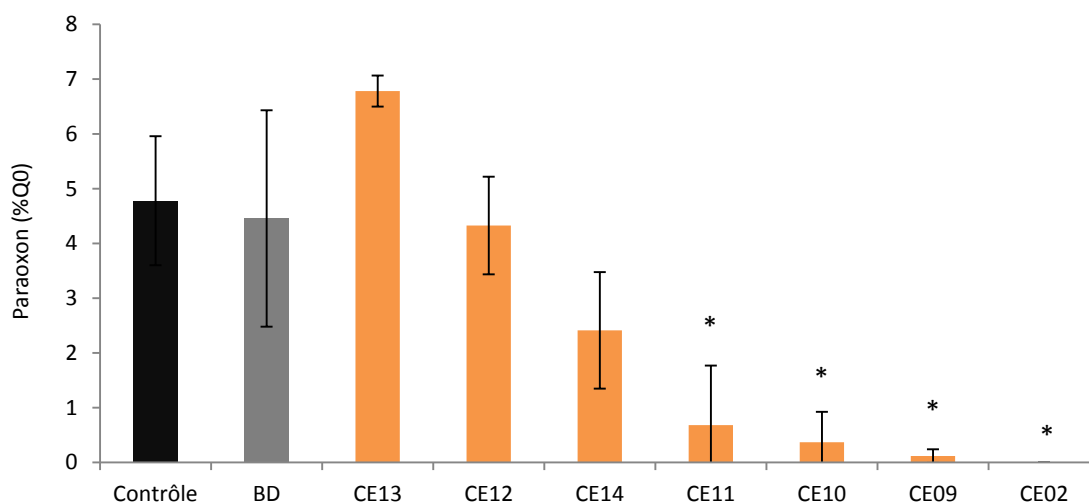


Figure 4-9 : Efficacité des formules à base de CeO₂ à T6h vis-à-vis de la pénétration Paraoxon (TPC = 27mg/cm²).

(n>3, *indique une différence significative avec les membranes non protégées contrôle, p<0,005).

Tout comme le PSi, les formules à base de silicone ne sont pas efficaces. Néanmoins, la présence de silicone n'augmente pas significativement la pénétration du paraoxon contrairement à ce qui a pu être observé pour la silice (CE13 et CE12, angles de contact = 40°). L'impact des silicones sur la pénétration du paraoxon au travers de la formule est donc lié au type de nanoparticules greffées au polymère.

Les 4 autres formules à base des ingrédients suivants sont efficaces : **Daitosol** (0,7 ± 1,1 %Q0) < **PVP** (0,4 ± 0,6 %Q0) < **Fixate** (0,12 ± 0,12 %Q0) < **Glycérine** (0,00012 ± 0,00011 %Q0) (Figure 4-9). Nous observons donc ici que la Glycérine à elle seule suffit à obtenir une crème très protectrice lorsque mélangée au PCe (Figure 4-9) contrairement au PSi qui nécessite l'addition d'un ingrédient supplémentaire à 3.8% (le PVP) pour obtenir la même efficacité (Figure 4-8).

Ici, les 4 formules plus efficaces présentent une mouillabilité plus importante (CE11 = 60°, CE10 = 63°, CE09 = 60°, CE02 = 69°). L'efficacité n'est encore une fois pas proportionnelle à l'augmentation de l'angle de contact. Cependant, pour la cérine c'est la formule présentant le plus grand angle de contact qui montre la meilleure protection (CE02). Ainsi, pour le PCe tout comme les formules à base de PSi, la mouillabilité permettra de discriminer les formules à faible angle de contact.

La formule la plus efficace est CE02, elle est donc sélectionnée pour être étudiée plus en détail.

Comme observé dans le chapitre 2.3. l'ajout de glycérine n'a pas d'effet sur le PSi. Il est intéressant d'étudier l'influence des propriétés physicochimiques intrinsèques des nanoparticules (nature, taille, type de traitement). La Figure 4-10 permet d'étudier l'impact de la taille (nanoparticules de cérine de 10nm ou 50nm), du traitement (nanoparticules non dopée PCe ou dopée au calcium PCe/Ca²⁺) ou de la nature (cérine 10nm PCe vs silice 22nm PSi) sur l'efficacité à T6h de formules additionnées de glycérine (%p/p indiqués sur la figure). La seule formule efficace reste celle

contenant les nanoparticules de cérine de 10nm (PCe 10nm). **Ainsi la taille, le traitement ou la nature sont des facteurs majeurs conférant l'efficacité à une formule.**

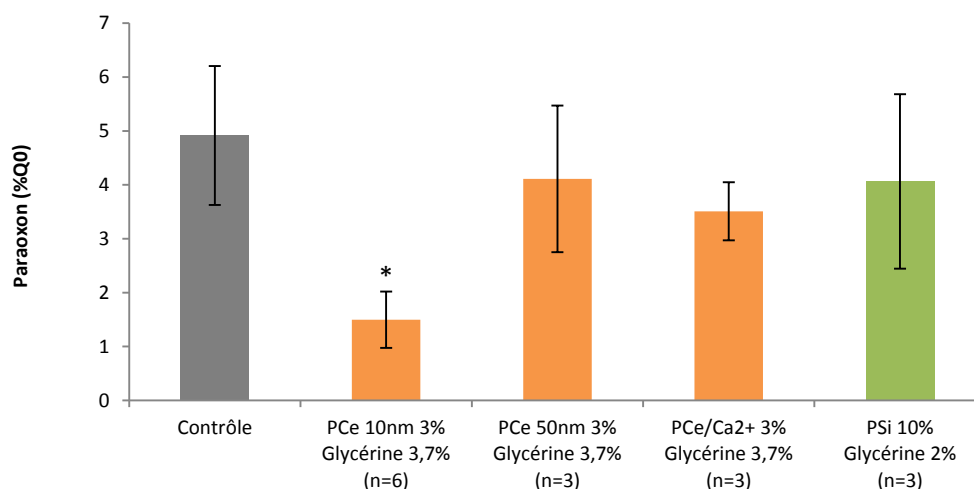


Figure 4-10 : Influence des particules sur l'efficacité à T6h (TPC = 27mg/cm²).

(n=6, *indique une différence significative avec les membranes non protégées contrôle, $p < 0,005$).

2.4. ETUDE DU POTENTIEL SYNERGIQUE DES NANOPARTICULES

Dans cette partie le potentiel synergique de mélange de nanoparticules en formulation est étudié. Trois formules à actifs mixtes ont été réalisées et comparées à leurs formules contenant soit du PSi soit du PCe (Figure 4-11).

L'efficacité de la formule à base **Fixate** et contenant l'actif PSi est très variable ($2,85 \pm 3,65$ %Q0) du fait de l'aspect de la crème (très visqueux et difficile à appliquer car 8% minimum de Fixate sont nécessaires pour obtenir un aspect filmogène par rapport à 2% pour l'actif cérine). Pour la formule contenant l'actif PCe l'efficacité est bonne et reproductible ($0,12 \pm 0,12$ %Q0). Lorsque l'on mélange les polymères greffés en formulation pour obtenir le même taux final (~10% d'actif), l'efficacité par rapport à l'actif PSi seul est augmentée mais par rapport à l'actif PCe seul elle est diminuée. L'augmentation d'efficacité par rapport à l'actif PSi peut être expliquée par l'amélioration de l'aspect homogène et filmogène de la crème (Fixate à 5%) et la diminution de l'efficacité par rapport à l'actif PCe seul peut être expliquée par la différence de concentration en actif spécifique (10% vs 5% PCe).

L'efficacité de la formule à base de **Daitosol** et d'actif PSi n'a pas pu être testée car non filmogène. L'efficacité de la formule contenant l'actif PCe seul ou un mélange PCe/PSi (Figure 4-11) est la même (respectivement $0,68 \pm 1,09$ %Q0 et $0,94 \pm 1,14$ %Q0). Aucun effet synergique entre les polymères greffés avec des nanoparticules de silice et de cérine n'est observé.

La dernière formule est un mélange des deux formules les plus efficaces (SI13 pour PSi et CE02 pour PCe), elle semble perdre un tout petit peu de son efficacité lorsque mélangé (0,01 vs

<0,001%Q0). Cela peut être dû à une synergie entre les ingrédients et les principes actifs qui sont spécifiques. En effet, entre SI13 et M03 (mélange PVP/Glycérine) il y a une perte de 2% de PVP. Cet ingrédient est-il essentiel à l'efficacité malgré que seul il n'apporte aucune efficacité (2.2. Effet des ingrédients sur la pénétration du paraoxon) ?

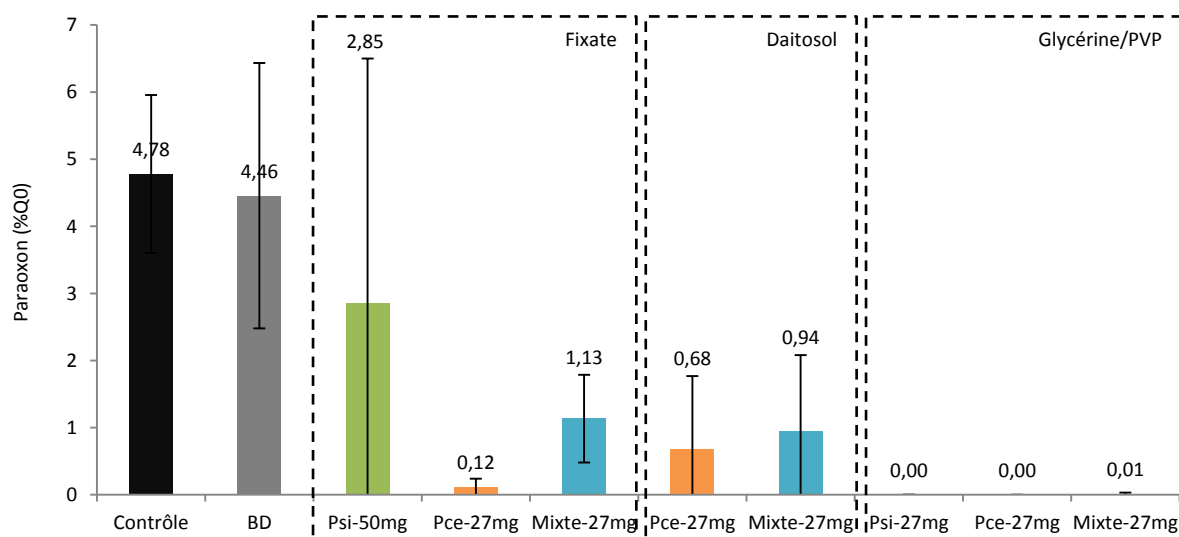


Figure 4-11 : Efficacité des formules en mélange à T6h (TPC = 27mg/cm²).

(contrôle = membrane non protégées, contrôle négatif = BD, n>3).

Une piste serait de faire des mélanges contenant 10% de chacun des actifs pour voir si l'efficacité est augmentée. Cependant, l'ajout d'actif en une telle quantité nécessite un travail de formulation complémentaire (mélange d'ingrédients filmogènes et fluidifiants) qui ne reflètera donc pas l'efficacité des actifs individuellement.

2.5. CONCLUSION

Selon les études de **mouillabilité** les meilleures crèmes sont BD, SI07, SI04 et CE02. Dans le cas du contrôle négatif BD qui présente le meilleur angle de contact vis-à-vis de l'huile d'olive sur membranes siliconées parmi toutes les formules, la mouillabilité ne reflète pas son efficacité. De même pour SI07 et SI04 qui ne sont pas les formules à base de PSi les plus efficaces. Pour PCE, la formule la plus efficace (CE02) est bien celle présentant le meilleur angle de contact. **Globalement, on peut conclure que la capacité d'une formule à repousser l'huile d'olive seule n'est pas représentative de son efficacité vis-à-vis du paraoxon.**

De ces **premières expériences d'efficacité** *in vitro* sur membranes siliconées, nous pouvons également conclure que **l'efficacité** d'une crème est **dépendante** :

- De la **nature intrinsèque** de l'actif. En effet, la glycérine rend le PCe efficace mais pas le PSi, on peut en conclure que la nanoparticule en elle-même, du fait de son activité intrinsèque, influence l'efficacité de la formule : pour une même formule à base de glycérine, la cérine qui absorbe et dégrade les produits chimiques⁹ (et le paraoxon) est plus efficace que la silice qui a la propriété d'absorber seulement. De même, les paramètres physicochimiques des particules comme la **nature** (CeO₂, SiO₂, TiO₂, etc.) ainsi que la **taille** et le **traitement** (dopé ou enrobé par exemple) sont importants.
- L'efficacité est également dépendante de la **compatibilité** des **ingrédients** avec les **actifs**. En effet, le polymère forme un réseau 3D de nanoparticules, il est aisé d'imaginer que l'ajout d'ingrédient peut venir favorablement ou défavorablement influencer ce réseau 3D.

Ainsi, les nanoparticules et les ingrédients présents dans la formule sont importants et sont spécifiques les uns aux autres pour former un réseau 3D de nanoparticules et polymères performant.

Les deux formules suivantes **SI13** (PSi) et **CE02** (PCe) ont montré la meilleure efficacité à 27mg/cm². Celles-ci sont sélectionnées pour être étudiées vis-à-vis de leur **stabilité** et de leur comportement **rhéologique**. La **Chapitre 5** abordera également une **étude détaillée** de leur **efficacité** et de leur **résistance**.

III. FORMULATION EN GRANDE QUANTITE

Les deux formules sélectionnées pour leur efficacité (SI13 et CE02) sont formulées en plus grosse quantité (150-200g) pour les besoins des différentes études à réaliser. SI13 sera la première formule réalisée ou F1 (PSi) et CE02 la deuxième formule ou F2 (PCe). Les paramètres suivants seront étudiés dans ce chapitre : aspect microscopique des dépôts pour observer la structuration de surface des formules, mouillabilité et rugosité des dépôts, rhéologie et stabilité des formules au cours de leur vieillissement.

3.1. FORMULATION

3.1.1. *Formule 1 : F1*

La formulation du gel monophasique F1 est réalisée à température ambiante (~22°C) à l'aide de l'agitateur mécanique IKA®-WERKE EUROSTAR selon les deux étapes suivantes :

- (1) Dispersion complète du polymère PVP dans l'eau (agitation jusqu'à solubilisation complète) et du polymère PSi (agitation ON - 650tr/min).
- (2) Neutralisation et intégration des conservateurs/agents filmogènes (500 à 2000tr/min).

Le pH en fin de formulation est de 7,40 (23°C).

Tableau 4-5 : Composition de F1.

Nom commercial	Nom INCI	Rôle	% (p/p)
Eau distillée	Water	solvant	81,6%
Plasdone™ K-29/32 polymer (lot 080326645)	PVP	agent filmogène	3,8%
Polymère greffé silice (CSMNP1)	-	actif à propriétés gels	9,5%
Bronopol (Jan Dekker, Lot 1239009)	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-diol	conservateur	0,1%
Sodium Hydroxide Pastille (Sigma, 55881, lot SZBE1620V)	Sodium Hydroxide	neutralisant	0,9%
Glycerol (Sigma, 49770, lot CBRF3863V)	Glycerin	agent filmogène	4,2%
Total			100,0%

3.1.2. *Formule 2 : F2*

Tout comme F1, la formulation du gel monophasique F2 est réalisée à température ambiante à l'aide de l'agitateur mécanique IKA®-WERKE EUROSTAR selon les deux étapes suivantes :

- (1) Dispersion et réhydratation du polymère PCe (agitation ON - 350tr/min).

- (2) Intégration du conservateur 1 et neutralisation (500 à 1400 tr/min).
- (3) Intégration du conservateur pré-dispersé dans la glycérine (mélange chauffé pour solubilisation) (1400tr/min).

Le pH en fin de formulation est de 7,02 (23°C).

Tableau 4-6 : Composition de F2.

Nom commercial	Nom INCI	Rôle	% (p/p)
Eau distillée	Water	solvant	81,6%
Polymère greffé cérine (CBP39)	-	actif à propriétés gels	13%
Microcare® PE (lot RP289757-1511)	Phenoxyethanol	conservateur 1	0,6%
Glycerol (Sigma, 49770, lot CBRF3863V)	Glycerin	agent filmogène	3,7%
Sodium Hydroxide Pastille (Sigma, 55881, lot SZBE1620V)	Sodium Hydroxide	neutralisant	0,7%
Microcare®CLG (lot RP299225-1703)	Caprylyl glycol	conservateur 2	0,3%
Total			100,0%

Afin de caractériser ces formules différentes analyses seront donc réalisées (microscopie, rugosité, mouillabilité, rhéologie, vieillissement).

3.2. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE

Les images de **Microscopie Electronique à Balayage** (MEB) (Figure 4-12) montrent une dispersion homogène des nanoparticules de silice (cercles noirs) dans la formule à la fois en coupe transversale et vues de dessus. Les mêmes images sont obtenues quel que soit le dépôt (5, 15 ou 27mg/cm²). La formule permet donc de garder les propriétés de réseau nanoparticulaire du polymère greffé. Les nanoparticules de cérine sont moins faciles à observer, néanmoins la Figure 4-13 B montre quelques nanoparticules dispersées (cercles noirs) dans le dépôt de F2. Ces images apportent donc une information qualitative quant à la bonne homogénéité des dépôts et de la dispersion des nanoparticules.

Grâce aux coupes transversales (Figure 4-12 C), l'épaisseur des dépôts secs de F1 peut également être déterminée. Les résultats suivants sont obtenus : 17±1µm pour 5mg/cm², 22±3 pour 15mg/cm² et 31±3µm pour 27mg/cm². L'épaisseur n'est pas proportionnelle à la quantité déposée : un dépôt de 2 fois moins de quantité (27 vs 15mg/cm²) ne signifie pas une épaisseur divisée par deux, idem pour un dépôt de 3 fois moins de quantité (15 vs 5mg/cm²). Les coupes transversales de F2 n'ont pas pu être réalisées par manque de formule.

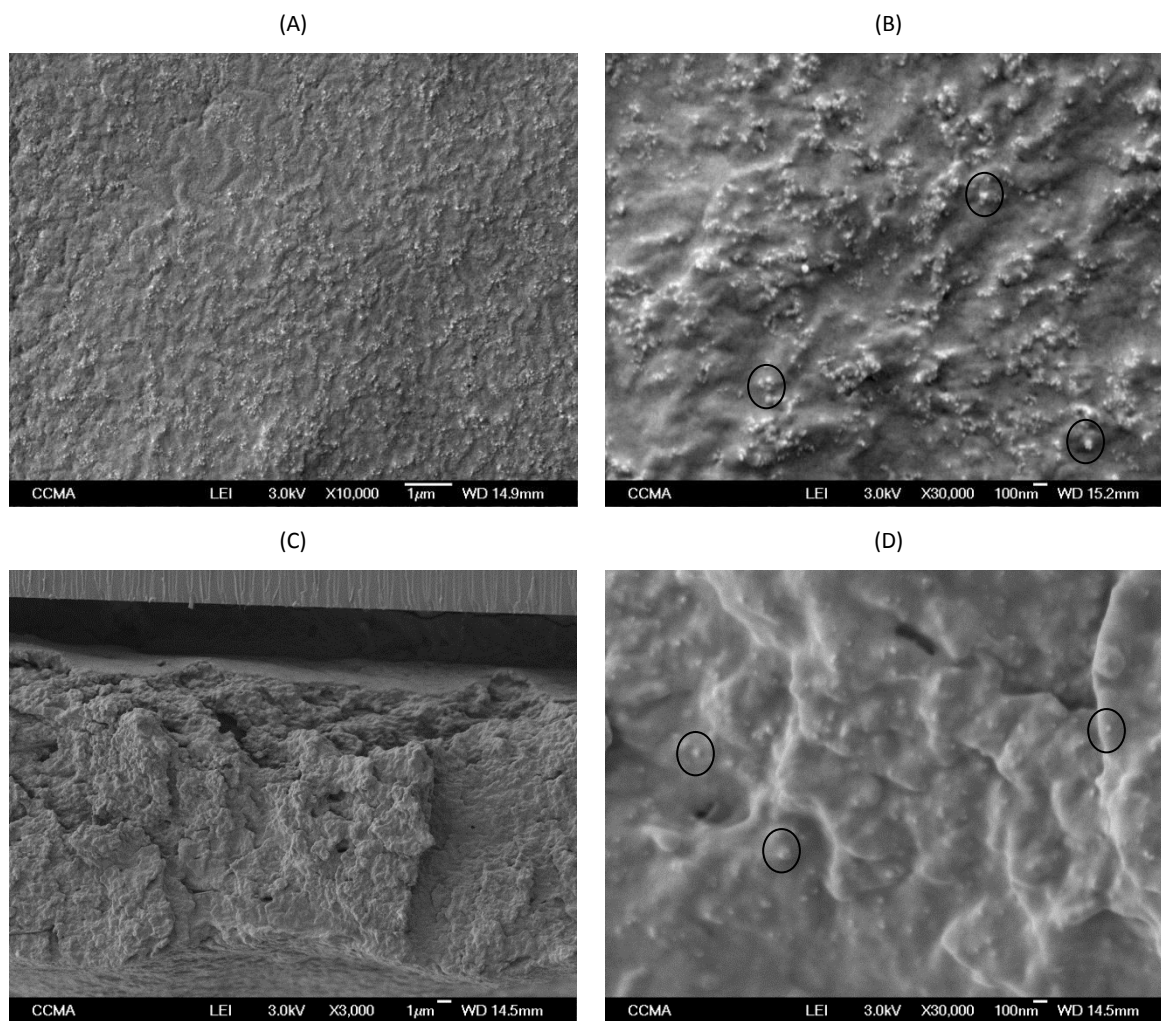


Figure 4-12 : Images MEB de dépôts de F1.

(A, B : membranes siliconées, vue de dessus ; C,D : verre, coupe transversale).

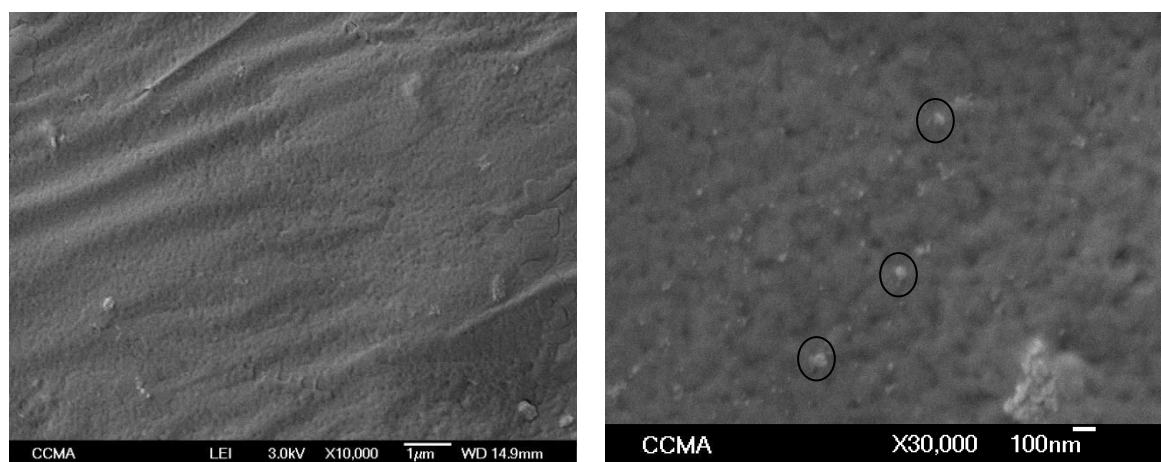


Figure 4-13 : Images MEB de dépôts de F2 sur verre.

3.3. STABILITE ET ETUDE RHEOLOGIQUE DES FORMULES F1 ET F2

L'étude rhéologique des formules apporte des informations qualitatives quant à la structuration et la force du réseau de polymère au sein de la formule. Ces mesures sont réalisées à l'état initial et après vieillissement accéléré afin d'étudier son évolution.

3.3.1. Principe et définition de la rhéologie

La rhéologie est l'étude de la **déformation** et de l'**écoulement** de la matière sous l'effet des contraintes qui lui sont appliquées. Elle permet de caractériser des matériaux au comportement intermédiaire entre le solide élastique parfait ou solide de Hooke (ex : l'acier) et le fluide idéal newtonien (ex : l'eau)¹⁰.

Un fluide est dit newtonien si sa viscosité est indépendante de la contrainte qui lui est appliquée. Il répond à l'équation de Newton :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (eq. 4)$$

η = viscosité en Pa.s, τ = contrainte de cisaillement en Pa et $\dot{\gamma}$ = vitesse de cisaillement en s^{-1})

Il existe également des fluides dits non-newtoniens dont les deux grands comportements sont :

- rhéo-fluidifiant : le fluide montre une réduction de la viscosité avec l'augmentation de la contrainte qui lui est appliqué.
- rhéo-épaississant : à l'inverse, la viscosité augmente avec l'augmentation du taux de cisaillement.

Leur prédiction par des modèles mathématiques est plus complexe mais le profil de leur courbe permet une classification rapide (Figure 4-14).

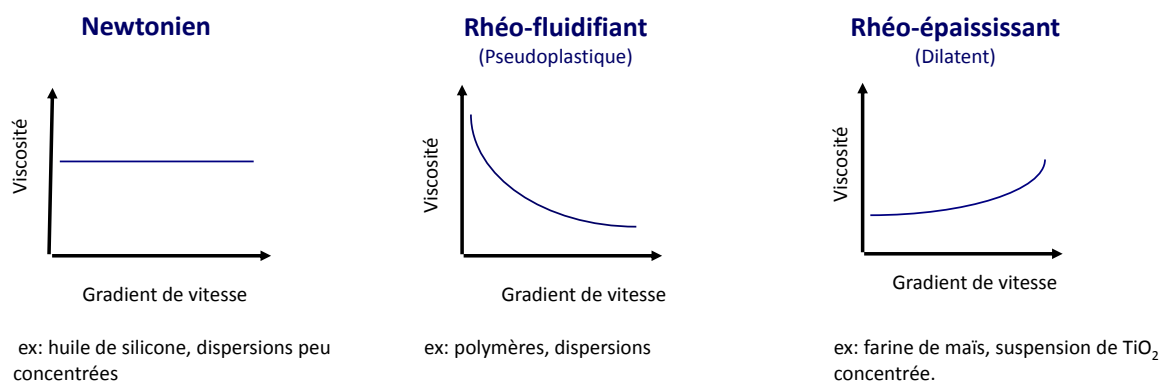


Figure 4-14 : Profil rhéologique des fluides types (figure inspirée de Couarazze *et al.*¹¹).

Les fluides newtoniens soumis à une contrainte s'écoulent à l'infini, leur caractère est dit « liquide » ou « visqueux ». Dans le cas de fluides complexes (non-newtoniens), la viscosité seule ne suffit plus à caractériser ces matériaux puisqu'elle ne prend pas en compte le caractère « solide ». Il

faut alors s'intéresser au comportement viscoélastique des matériaux qui analyse à la fois la part de viscosité (caractère liquide) et la part d'élasticité (caractère solide). Le caractère liquide correspond donc aux propriétés d'écoulement du matériau soumis à une contrainte tandis que l'élasticité se manifeste lorsque l'on applique ou supprime une contrainte et correspond à l'état transitoire de l'échantillon pendant lequel sa structure évolue avant de se stabiliser.

Dans le cas de suspensions de polymère, l'application d'une contrainte va forcer les chaînes polymériques à passer d'un état de repos à transitoire au cours duquel les chaînes vont être étirées et emmagasiner une énergie dite élastique avant de retourner à un état d'équilibre en dissipant cette énergie¹¹. Le comportement viscoélastique d'une crème constituée de polymères et d'autres ingrédients (glycérine par exemple) est le résultat de la modification des interactions plus ou moins fortes (liaisons hydrogènes et interactions de Van der Waals) et nombreuses entre ses différents constituants. La viscoélasticité est caractérisée par plusieurs grandeurs physiques et l'équation de Hooke (τ = contrainte appliquée (Pa), γ = ampleur de la déformation, G , module de cisaillement en Pa) :

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (eq. 5)$$

Le module de cisaillement peut être décomposé en composante **élastique** ou module de *stockage* et se symbolise par G' et en composante **visqueuse** ou module de *perte* (G'') qui mesure la déstructuration du réseau et sa rigidité ou liberté au cours de l'état transitoire¹².

De ces deux composantes peut être calculé le **facteur de perte** ou **facteur d'amortissement** donnant des informations précieuses sur la caractérisation du produit :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (eq. 6)$$

Si $\tan \delta > 1 \rightarrow G'' > G' =$ le caractère visqueux ou liquide prédomine.

Si $\tan \delta < 1 \rightarrow G'' < G' =$ le caractère élastique ou solide prédomine.

Ainsi l'étude rhéologique des nouvelles formules va nous permettre d'analyser la résistance des crèmes, leur stabilité et leur évolution au cours de leur vieillissement. La stabilité des formules dans le temps est réalisée par vieillissement accéléré en incubant les formules 4 semaines à 45°C. Plusieurs paramètres sont pris en compte pour évaluer la stabilité des formules :

- l'aspect visuel ou observations macroscopiques qui permettent de voir l'évolution de la couleur de l'homogénéité et de la consistance de la formule
- le pH
- la viscosité
- l'évolution des paramètres rhéologiques

3.3.2. Etude des crèmes à T0

L'étude de la courbe d'écoulement (Figure 4-15 A) montre que pour les deux crèmes, la contrainte présente une forte élévation (et donc une forte viscosité) dans les faibles cisaillements et atteint un comportement newtonien dans les hauts gradients de vitesse ($>600\text{s}^{-1}$). Ceci caractérise le comportement rhéofluidifiant des formules. Autant dans les faibles que les forts cisaillements, F1 présente toujours une contrainte plus élevée que F2. Il est à noter qu'à très faibles cisaillements ($<0,6\text{s}^{-1}$) et donc quasiment au repos F2 présente une viscosité plus élevée que F1 (Figure 4-15 B). Les deux crèmes n'ont pas le même comportement : F1 a globalement une viscosité plus élevée que F2 sauf au repos.

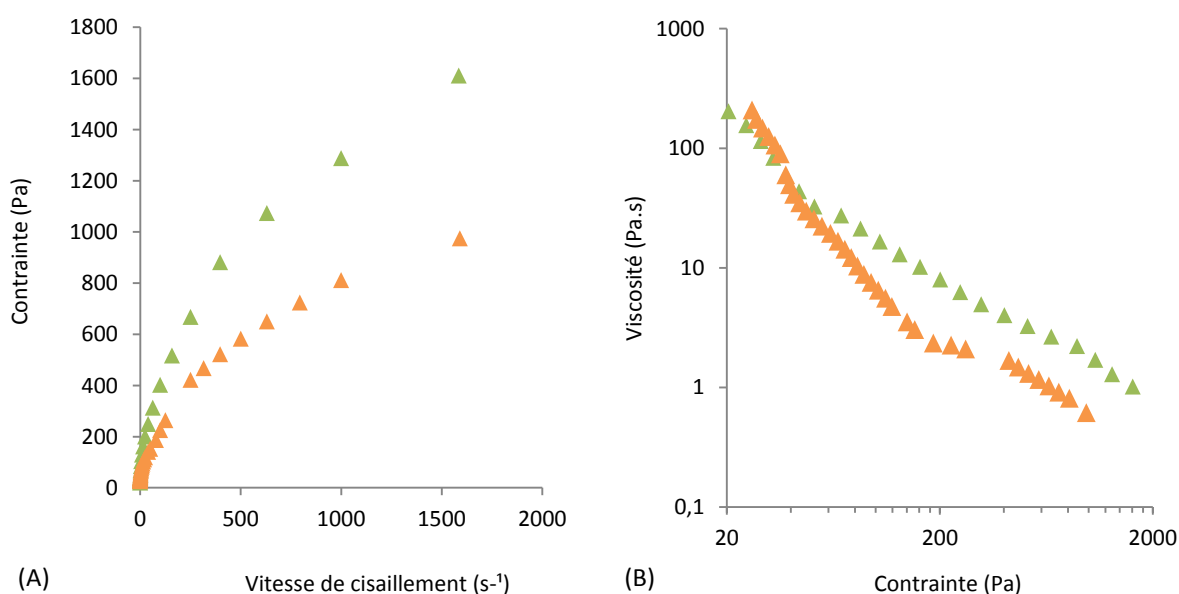


Figure 4-15 : Expérience d'écoulement pour les formules initiales (▲ : F1 ; ▲ : F2).

Les études de viscoélasticité permettent d'observer les caractères élastiques (ou solides) et visqueux (ou liquides) d'une crème : le balayage en amplitude à une fréquence constante va permettre d'analyser la déstructuration du réseau et donc plutôt son caractère liquide ; le balayage en fréquence à une amplitude fixe va permettre d'observer la réponse d'une crème à une sollicitation non destructrice et son retour à l'état initial et donc sa réponse élastique¹⁰.

Le balayage en amplitude montrent qu'à l'état initial (contrainte = 0,1 Pa), G'' est inférieur à G' , le caractère élastique (ou solide) des deux crèmes prédomine à ces contraintes (Figure 4-16 A).

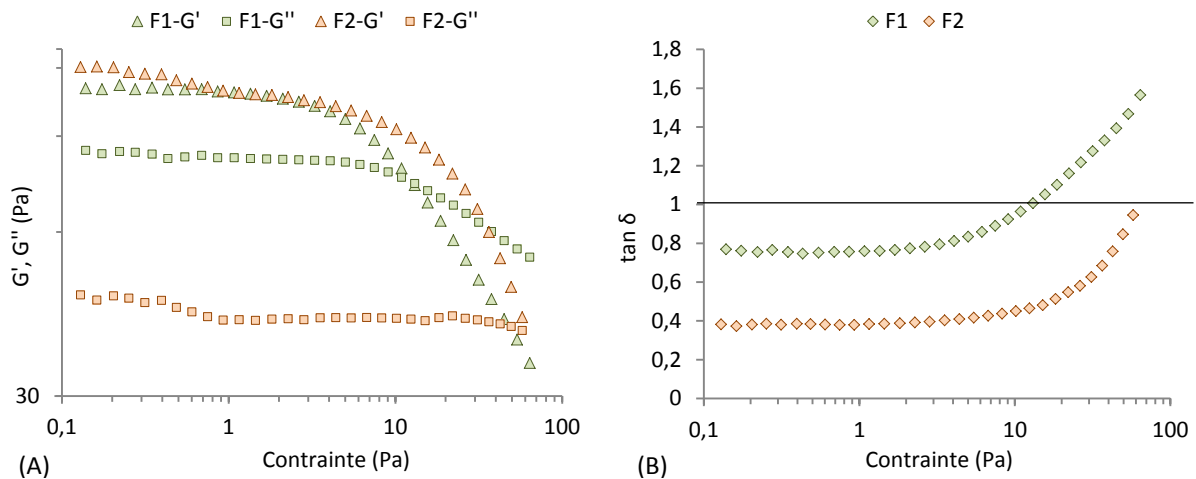


Figure 4-16 : Balayage en amplitude à fréquence fixe 1 Hz. (A) Evolution des modules élastiques et visqueux. (B) Evolution du facteur d'amortissement.

L'augmentation constante de la contrainte sur la crème va mener à la déstructuration de son réseau qui se produira lors de la très forte décroissance des modules élastiques et visqueux jusqu'à inversion des propriétés viscoélastiques, c'est-à-dire quand le caractère visqueux de la crème prédominera sur sa réponse élastique ($G'' > G'$ et donc $\tan \delta$ (facteur d'amortissement) > 1). Le domaine précédent cette déstructuration est appelé domaine linéaire ou newtonien. La contrainte nécessaire pour faire apparaître les propriétés visqueuses de la crème est appelé seuil d'écoulement. Pour F1, le seuil d'écoulement est atteint à 9 Pa et pour F2, G' est toujours supérieur à G'' , cependant il semblerait que pour la déformation maximale (100%), on tende vers une égalité des deux modules, le seuil d'écoulement semble donc être proche de 58 Pa. Ces seuils d'écoulement peuvent être également déterminés sur des études d'écoulement simple (étude de viscosité) en exprimant la viscosité en fonction de la contrainte (Figure 4-15 B). Pour F1, le seuil d'écoulement ne peut y être déterminé car il intervient avant la première contrainte mesurée. Pour F2 il correspond à la brusque perte de viscosité observée vers les 60 Pa.

Le module visqueux (G'') de F1 est plus élevé que celui de F2 (Figure 4-16 A), ce qui se traduit également par un facteur d'amortissement plus élevé (Figure 4-16 B). Ces résultats donnent des informations sur les interactions du réseau et les forces intervenant. F1 présente donc des propriétés viscoélastiques plus élevées que F2.

De cette expérience peut être conclue que :

- **F1 est plus viscoélastique que F2 et son seuil d'écoulement est plus faible : son réseau présente donc des interactions plus fortes et moins nombreuses.**
- **F2 est moins viscoélastique que F1 et son seuil d'écoulement est plus élevé : son réseau présente donc des interactions moins fortes mais plus nombreuses.**

Les propriétés viscoélastiques d'une crème sont importantes pour connaître la résistance d'une crème à son étalement et les propriétés optimales d'application de celle-ci. Théoriquement, on considère l'application d'une formule à une vitesse constante (et donc un cisaillement constant). En réalité, les mouvements de cisaillements liés à l'application d'une crème peuvent être considérés comme périodiques selon des mouvements d'aller-retour où la fréquence est variable (de 0,1 à 10Hz)¹². Le balayage en fréquence à une amplitude fixe (choisie dans le domaine linéaire, 1Pa) des deux topiques montre que G' est supérieur à G'' ce qui indique la prédominance du caractère élastique des formules (Figure 4-17). Le facteur d'amortissement (G''/G') est constant sur toute la gamme de fréquence ce qui met en exergue la stabilité des crèmes. Néanmoins, ce rapport est différent d'une formulation à l'autre. En effet, dans le cas de F1 ce rapport est plus important que dans le cas de F2. De plus l'allure globale des courbes est différente puisque l'on remarque une augmentation plus importante de la valeur des modules dans le cas de la formulation F2. Ces observations font état d'un comportement différent des deux formulations lorsque toutes les deux sont soumises aux mêmes sollicitations. Il nous est donc possible d'affirmer que ces deux formulations ont un comportement différent.

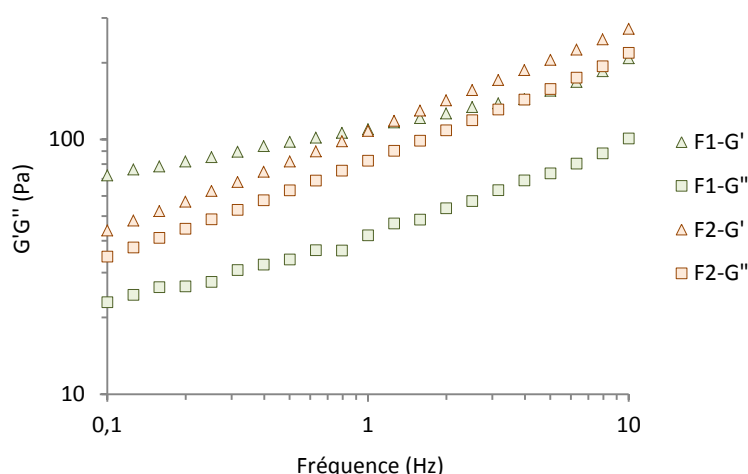


Figure 4-17 : Balayage en fréquence à amplitude fixe 1Pa.

3.3.3. Vieillessement accéléré de F1

Le vieillissement accéléré à 45°C change l'aspect de la formule F1. En effet, dès la première semaine d'incubation, la formule jaunie/fonce de manière intense pour garder la même couleur à la fin des 4 semaines d'incubation (Figure 4-18 A). Egalement la formule semble plus consistante. Aucune odeur caractéristique d'un développement bactérien n'est détectée. De plus, le pH varie de moins d'une unité au cours des 4 semaines et reste proche de 7 qui est le pH optimum de dispersion des nanoparticules par le polymère dans la formule¹³ (Figure 4-18 B). **Ces résultats montrent donc que le système de conservation utilisant 0,1% de Bronopol est validé.**

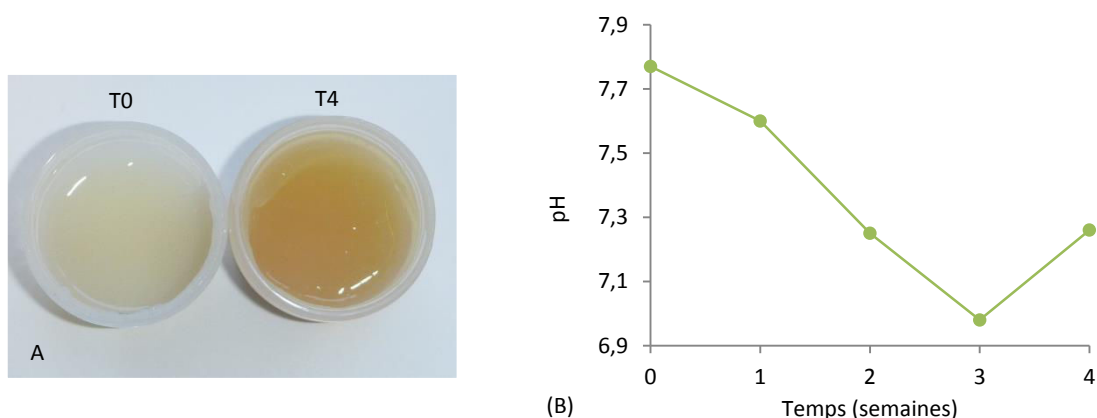


Figure 4-18 : Evolution visuelle de F1 (A) et du pH (B) au cours du vieillissement accéléré.

L'évolution de la viscosité montre dès les faibles vitesses de cisaillement un shift de la viscosité vers le haut de T0 à T4 (Figure 4-19) : F1 présente une augmentation de la viscosité au cours du temps. **Le réseau semble donc évoluer au cours du vieillissement.** Ces résultats sont cohérents avec les observations concernant l'aspect de la formule.

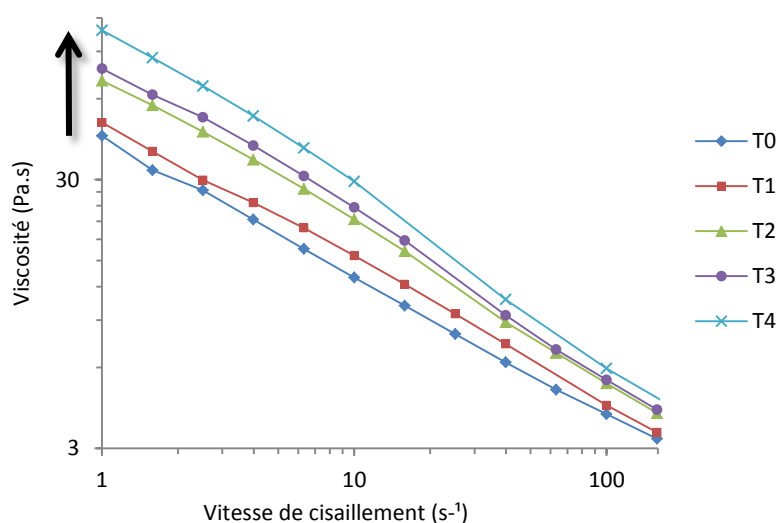


Figure 4-19 : Evolution de la viscosité de F1 au cours du vieillissement.

Le balayage en amplitude (Figure 4-20) montre que la réponse viscoélastique de F1 diminue au cours du vieillissement (diminution de $\tan \delta$), la formule perd donc ses propriétés viscoélastiques. Cependant, le seuil d'écoulement est atteint à des contraintes plus élevées au cours du vieillissement : T0 = 13Pa, T1 = 22Pa, T2 = 40Pa, T3 = 49Pa, T4 > 100Pa. De même que pour la comparaison des crèmes à l'état initial, il peut être conclu qu'il y a une évolution globale du réseau : **le nombre des interactions diminue au cours du vieillissement (réponse viscoélastique plus faible) mais leur force augmente (seuil d'écoulement à des contraintes plus élevées).**

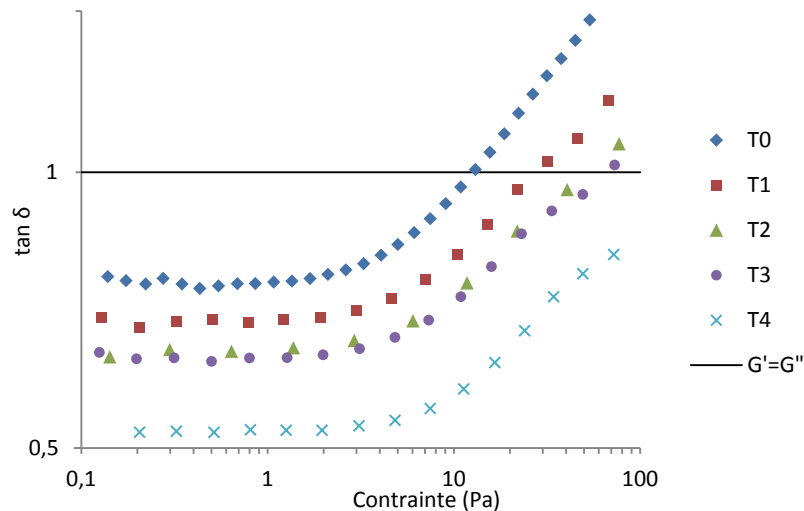


Figure 4-20 : Balayage en amplitude à fréquence fixe 1Hz de F1 au cours du vieillissement : évolution du facteur d'amortissement.

Le balayage en fréquence sur une gamme de 0,1 à 100Hz traduit l'évolution des interactions présentes dans la formule. De ces graphes, des temps de relaxation (T_r) peuvent être déterminés. Ils sont atteints aux fréquences pour lesquelles $G' = G''$ ou lorsque la courbe décrivant G' atteint un maximum au même moment où G'' décrit un point d'inflexion et sont calculés selon l'équation suivante :

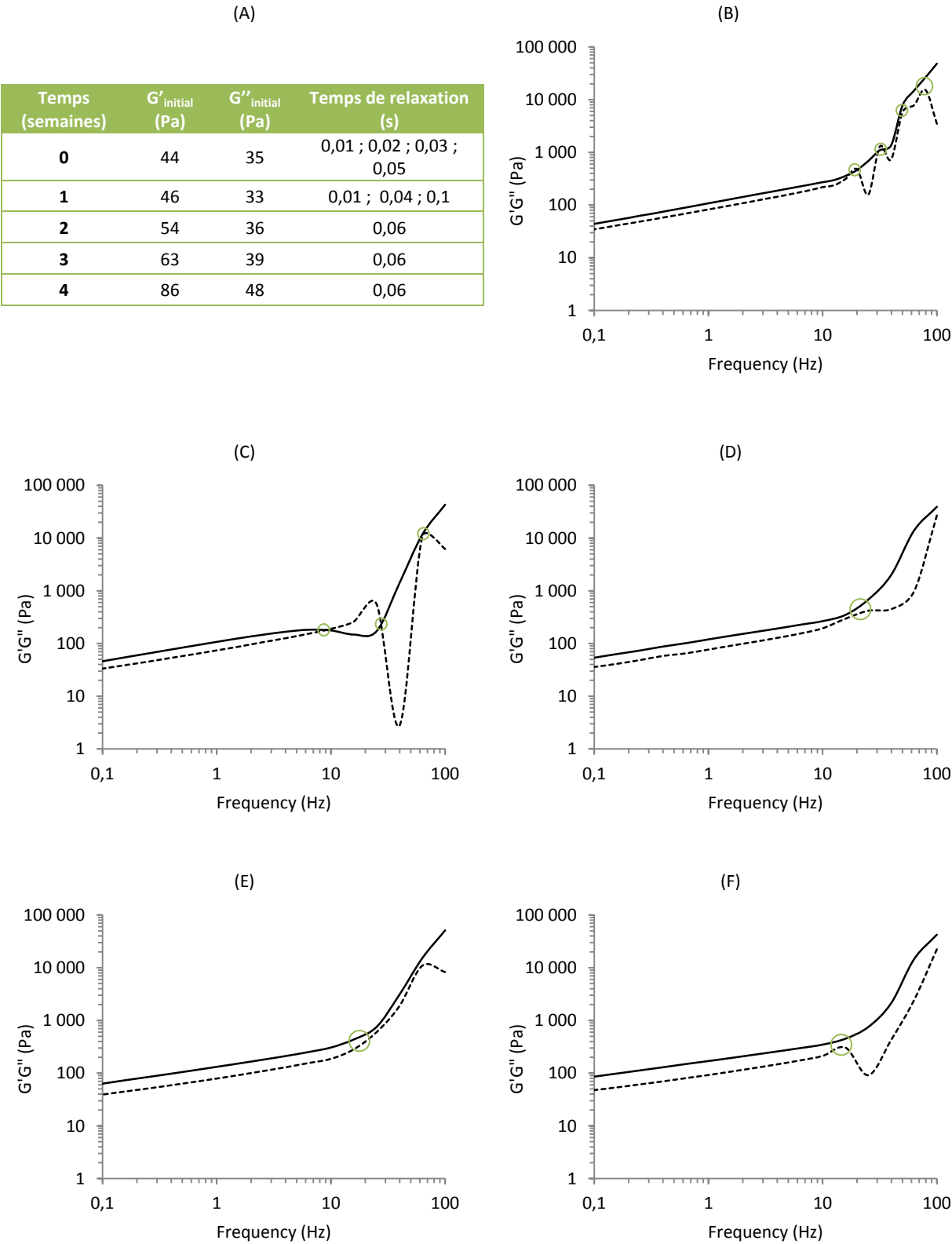
$$T_r = \frac{1}{F} \quad (\text{eq. 7})$$

T_r : temps de relaxation (s), F : fréquence (Hz)

Ces temps de relaxation correspondent au temps que met chaque interaction à se régénérer après la perturbation oscillatoire. Plus le temps de relaxation est court, plus l'interaction est forte car le réseau met moins de temps pour revenir à l'état initial et donc plus le caractère élastique marqué.

Le Tableau 4-7 présente l'évolution de ces interactions au cours du vieillissement, les temps de relaxation sont mis en évidence par les ronds verts. Le nombre de temps de relaxation diminue au cours du vieillissement, ce qui signifie que le nombre d'interactions formées et détruites au cours de la sollicitation diminue. Les interactions sont donc plus fortes et moins perturbées par cette sollicitation. On observe donc au cours du vieillissement une **consolidation** et une **stabilisation du réseau**. De plus, G' augmente d'un facteur 2 de T0 à T4, F1 gagne donc en caractère élastique au cours du vieillissement. Ces résultats rejoignent le fait qu'il y a moins de temps de relaxation et donc de perturbation du réseau pour cette gamme de mesure.

Tableau 4-7: Balayage en fréquence (amplitude fixe 1Pa) de F1.
Evolution des modules initiaux et du temps de relaxation (A).
Evolution des modules élastiques (G' , —) et visqueux (G'' , ---) initiaux (B) et après 1 (C), 2 (D), 3 (E) et 4 (F) semaines d'incubation à 45°C.



Les expériences de rhéologie montrent que le réseau de F1 se consolide au cours du vieillissement (viscosité plus élevée, seuil d'écoulement plus haut, et diminution de la perturbation des interactions).

3.3.4. Vieillissement accéléré de F2

Le vieillissement accéléré à 45°C ne change pas la couleur de la formule (léger blanchissement) mais un relargage d'eau est observée en surface (Figure 4-21). Cependant, aucune odeur caractéristique d'un développement bactérien n'est détectée. De plus, tout comme F1, le pH varie de moins d'une unité au cours des 4 semaines et reste proche de 7, pH optimum de dispersion des nanoparticules par le polymère¹³ (Figure 4-22). **Ces résultats montrent donc que le système de conservation utilisant 0,3% phenoxyethanol / 0,6% caprylyl glycol est validé.**

Cependant concernant la stabilité de crème, le relargage d'eau en surface montre une certaine instabilité du réseau de F2.

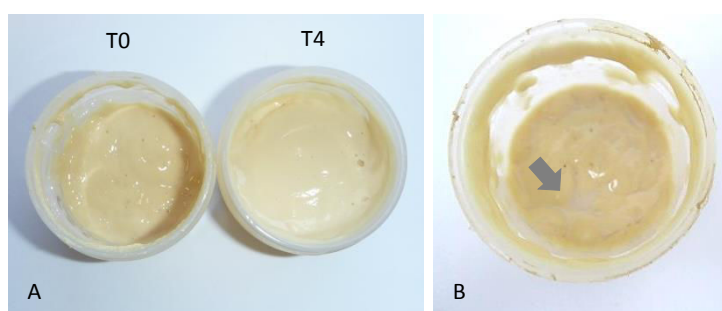


Figure 4-21 : Observation visuelle de F2.

(A) différence entre T0 et T4 ; (B) relargage d'eau en surface à T1.

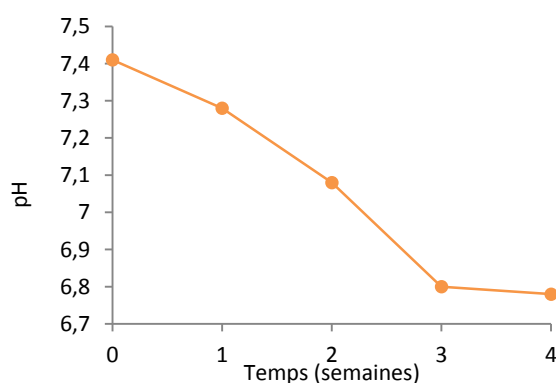


Figure 4-22 : Evolution du pH de F2 au cours du vieillissement accéléré.

La viscosité de F2 ne semble pas augmenter au cours du temps. Seul un léger shift dès la première semaine d'incubation à 45°C est observé (Figure 4-23). **Le réseau ne semble donc pas évoluer au cours du vieillissement.**

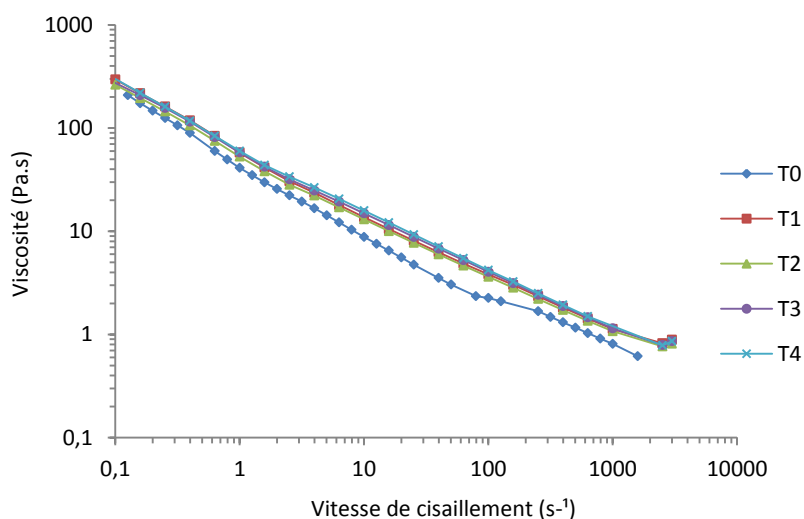


Figure 4-23 : Evolution de la viscosité de F1 au cours du vieillissement.

Concernant les analyses de viscoélasticité à fréquence fixe (1Hz), F2 ne montre également pas d'évolution des modules élastiques et visqueux (Figure 4-24). De plus, le seuil d'écoulement est supérieur à 100% de la déformation (atteint vers 60-70Pa). **Le réseau ne semble donc pas évoluer.**

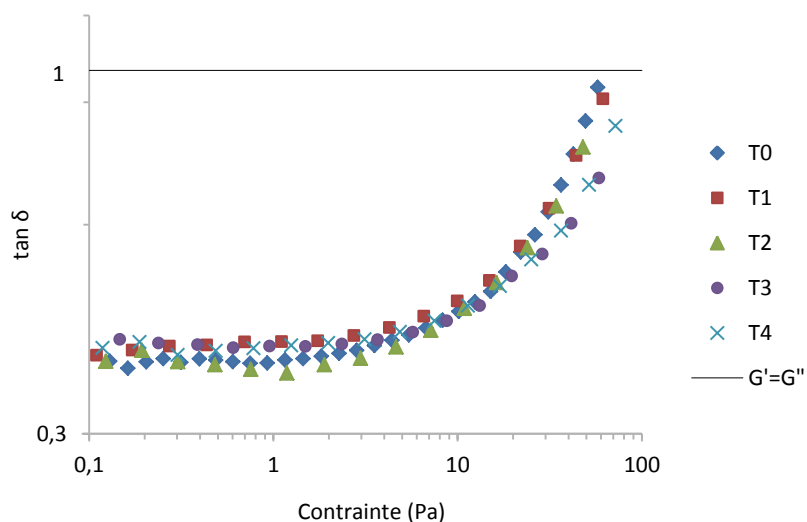


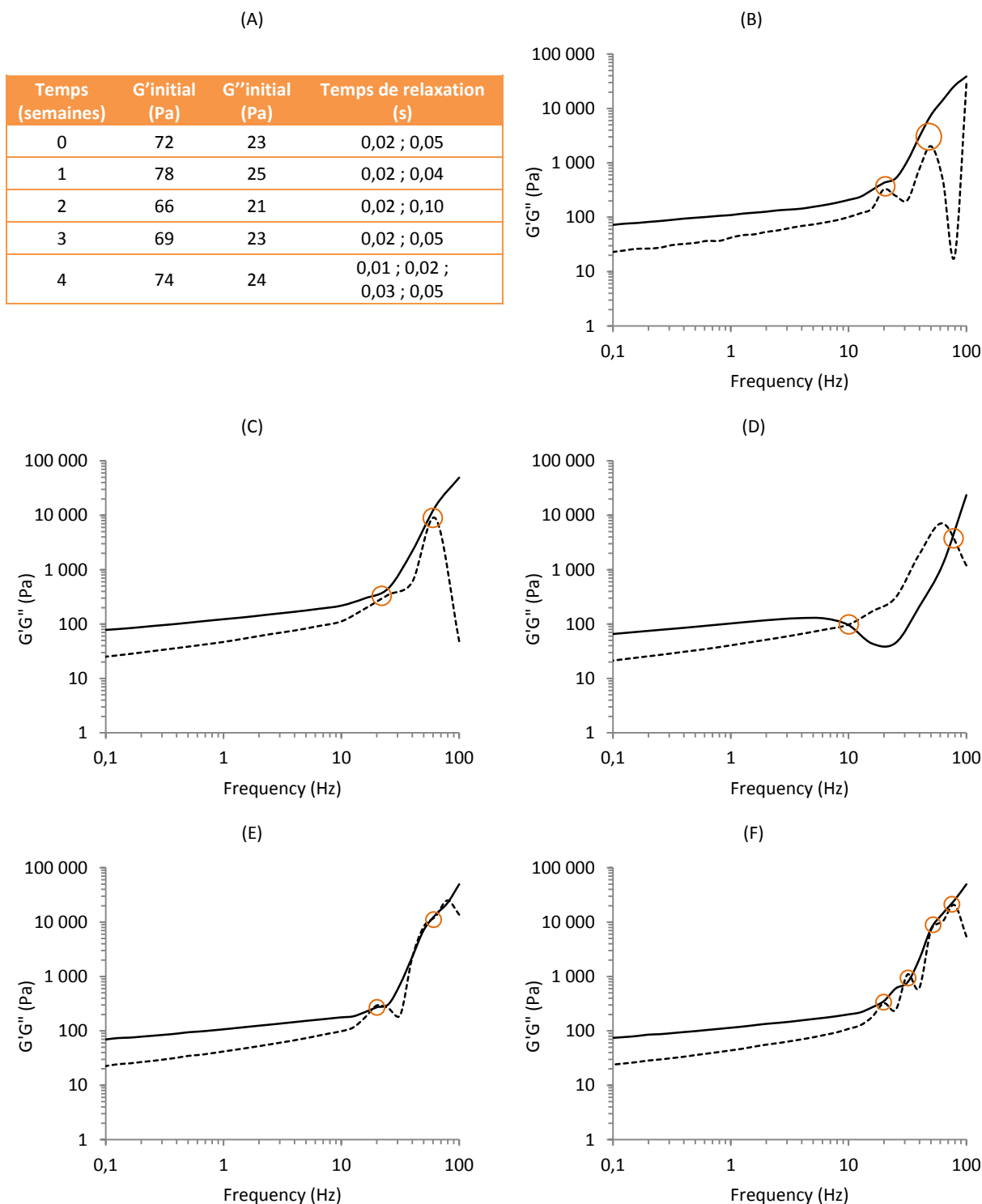
Figure 4-24 : Balayage en amplitude à fréquence fixe 1Hz de F2 au cours du vieillissement : évolution du facteur d'amortissement.

Le balayage en fréquence (Tableau 4-8) montre que le caractère élastique de F2 est prédominant et qu'il n'y a pas d'évolution des modules initiaux au cours du vieillissement. Le réseau de F2 **n'évolue que peu au cours du temps**. A l'inverse de F1, le nombre de temps de relaxation augmente au cours du vieillissement de F2, cela signifie qu'il y a donc plus d'interactions perturbées pour la même sollicitation et donc qu'il y a **déstabilisation du réseau de la formule** au cours du vieillissement.

Tableau 4-8: Balayage en fréquence (amplitude fixe 1Pa) de F1.

Evolution des modules initiaux et du temps de relaxation (A).

Evolution des modules élastiques (G' , —) et visqueux (G'' , ---) initiaux (B) et après 1 (C), 2 (D), 3 (E) et 4 (F) semaines d'incubation à 45°C.



Les expériences de rhéologie montrent que le réseau de F2 ne se consolide pas au cours du temps et tend même vers une déstabilisation de la formule.

3.3.5. Conclusion

A l'état initial (T0) F1 a une consistance et une viscosité plus élevée que F2. Son réseau semble mieux structuré : le réseau de F1 présente des interactions plus nombreuses (propriétés viscoélastiques plus élevées) mais moins forte que F2 (seuil d'écoulement plus bas).

Au cours du vieillissement, F1 présente un renforcement de son réseau : augmentation de la viscosité, augmentation du seuil d'écoulement et diminution du nombre d'interactions perturbées ; le réseau gagne en élasticité. Egalement, la formule jaunie et fonce au cours du temps, ce qui tend à penser qu'elle s'oxyde en vieillissant. L'ajout d'agents antioxydants pourrait palier à ce problème. Il sera intéressant de voir l'impact du vieillissement et donc l'évolution de ces propriétés rhéologique sur l'efficacité de la crème.

A l'inverse, le réseau de F2 semble se déstabiliser au cours du temps. On observe un relargage d'eau en surface le nombre d'interactions perturbées au cours d'une même sollicitation augmente. Une solution consisterait alors à ré-homogénéiser F2 avant application. Egalement, il sera intéressant de voir l'impact du vieillissement sur l'efficacité de la crème.

3.4. RUGOSITE ET EPAISSEUR DES DEPOTS DE FORMULES

Comme détaillé dans le Chapitre 2, la profilométrie permet la mesure de la rugosité des dépôts. 3 points sont mesurés et la moyenne est calculée, on peut donc également déterminer l'homogénéité des dépôts : un faible écart-type montre une bonne homogénéité (coefficient de variation (%) = écart-type / moyenne).

Les crèmes ont été testées en efficacité à de fortes doses (27 et 50mg/cm²). Il s'agit ici de voir si la dose appliquée a un effet sur la rugosité et l'homogénéité des dépôts. Les doses testées sont : 5, 10, 15 et 27mg/cm². Egalement, il serait intéressant de voir l'impact du vieillissement sur la rugosité et l'homogénéité des dépôts. L'étude complète de rugosité n'a pu être réalisée que sur F1 car il restait peu de formule F2. La Figure 4-25 montre les résultats de rugosité : il n'y a aucun effet dose ni un effet du vieillissement. **L'ensemble des dépôts est homogène car les coefficients de variation sont inférieurs à 10%.**

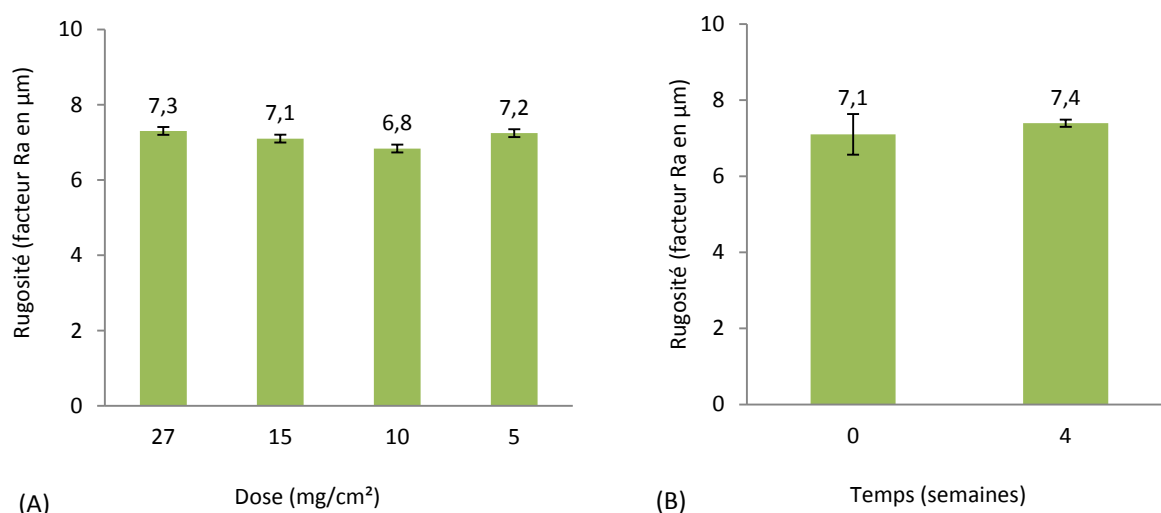


Figure 4-25 : Rugosité des dépôts de F1.

(A) Effet dose ; (B) Effet vieillissement.

La Figure 4-26 montre les images obtenues pour F2 à $27\text{mg}/\text{cm}^2$ (seule dose testée). La valeur de rugosité moyenne est $2.33 \pm 0.12 \mu\text{m}$, le dépôt est donc très homogène car le coefficient de variation est inférieur à 10%.

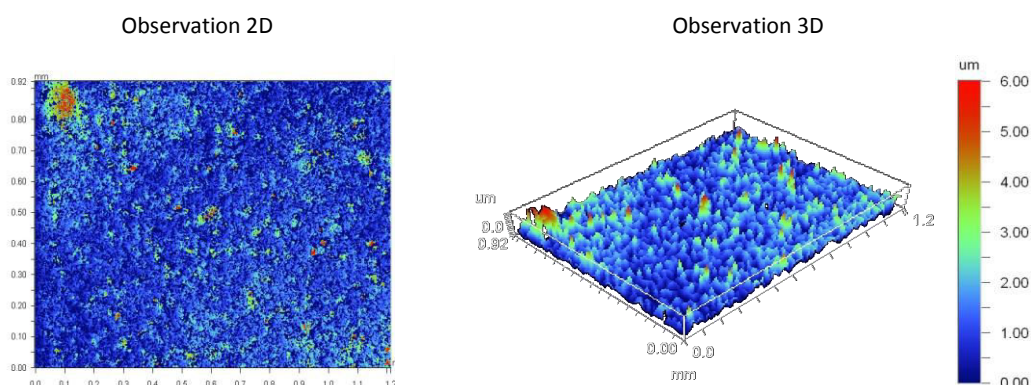


Figure 4-26 : Homogénéité du dépôt de F2 à $27\text{mg}/\text{cm}^2$ par profilométrie.

3.5. MOUILLABILITE DES FORMULES

Bien que dans la partie 2 de ce chapitre nous avons conclu que la mouillabilité n'était pas le seul paramètre représentatif de l'efficacité vis-à-vis du paraoxon, il est néanmoins intéressant d'étudier plus en détail les propriétés de répulsion des formules F1 et F2. La **mouillabilité** des formules a donc été réalisée selon plusieurs conditions :

- Effet dose (dépôt sec) : 5, 10, 15 et $27\text{mg}/\text{cm}^2$ (F1 et F2)
- Effet temps (dépôt sec) : $15\text{mg}/\text{cm}^2$, les mêmes gouttes sont mesurées de 0 à 24h (F1 et son équivalent sans nanoparticules de silice Base1).

- Effet vieillissement (dépôt sec) : 15mg/cm² (F1 et F2 après incubation à 45°C durant 4 semaines).
- Effet séchage (dépôt non sec) : 15mg/cm² les mêmes gouttes sont mesurées de 0 à 6h (F1).

Les **liquides sondes** suivants ont été choisis :

- Ethylène glycol (tension superficielle (TS) = 72 N/m²) proche de l'eau pour mesurer le pouvoir hydrophobe des formules.
- Hexadécane (TS = 51 N/m²) et diiodométhane (TS = 27,5 N/m²) ayant des tensions intermédiaires.
- Huile d'olive (TS = 21,7 N/m²) dont le comportement en mouillabilité est proche du paraoxon¹⁴, notre molécule chimique d'étude.

3 gouttes sont réalisées par test et les résultats sont présentés par la moyenne ± écart-type.

3.5.1. Effet dose

Pour F1 et vis-à-vis de l'huile d'olive, notre liquide sonde d'intérêt, il n'y a qu'un très faible effet dose : 5, 10 et 15mg/cm² ont un angle de contact de 70° et la plus forte dose montre le moins bon angle de contact : 60° (Figure 4-27 A).

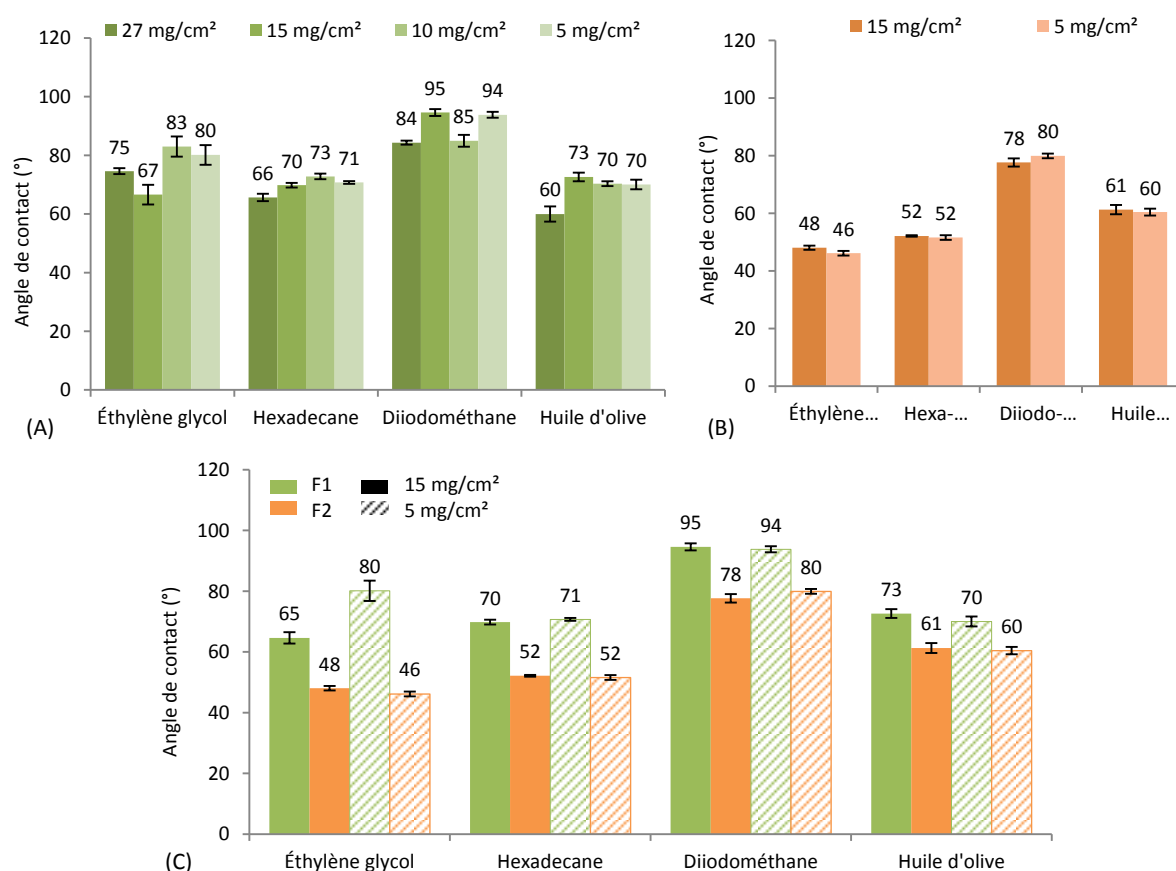


Figure 4-27 : Mouillabilité : effet dose.

(A) F1 ; (B) F2 ; (C) Comparaison F1 et F2.

Au cours du séchage des réarrangements de structure interne se font. Il se peut que lorsque la couche est épaisse, ces réarrangements orientent les groupements plutôt oléophiles vers la surface expliquant cette légère baisse de 10° . Pour F2 et vis-à-vis de l'huile d'olive, il n'y a aucune différence entre les deux doses testées (Figure 4-27 B). La comparaison des deux formules permet de mettre en évidence une meilleure capacité de F1 à repousser les liquides hydrophiles (éthylène glycol) et oléophiles (huile d'olive) ainsi que les liquides au comportement intermédiaire (hexadécane et diiodométhane) (Figure 4-27 C).

3.5.2. Effet temps

La mouillabilité de F1 et sa base est identique au cours du temps (Figure 4-27), **il y a donc peu d'impact des nanoparticules de silice sur les propriétés de mouillabilité**. Il y a une très forte décroissance de la capacité de la crème à repousser l'huile d'olive au cours du temps : en 5 min l'angle décroît d'environ 6 à 10° , en 6h d'environ 25 à 30° , pour se stabiliser à 12h avec une perte d'environ 30 à 40° . L'hypothèse est ici que pour une étude cinétique de la pénétration sur 24h il y ait une perte d'efficacité entre 0, 6 et 24h. Cette partie sera abordée dans le Chapitre 5.

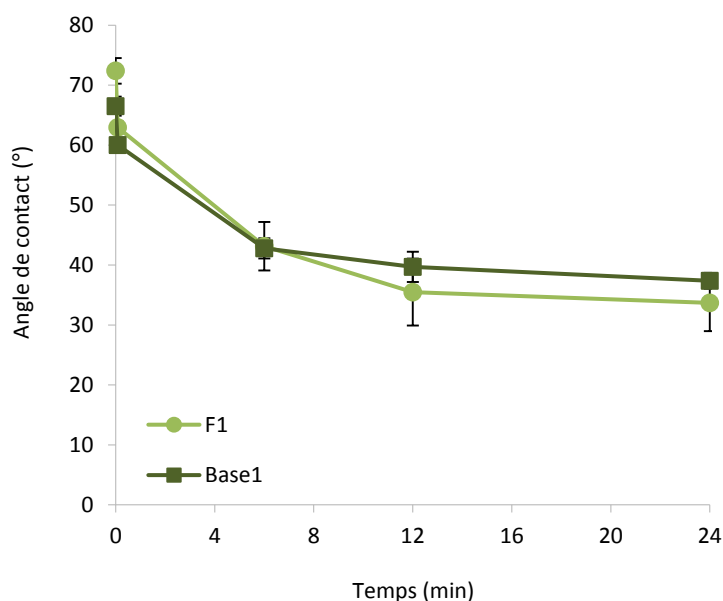


Figure 4-28 : Mouillabilité : effet temps.

3.5.3. Effet vieillissement

Pour les 4 liquides sondes et les deux formules il y a peu de différence entre T0 et T4semaines (Figure 4-29). **Le vieillissement des crèmes pendant 4 semaines à 45°C n'a pas modifié leur capacité à repousser l'huile d'olive (et donc le paraoxon).**

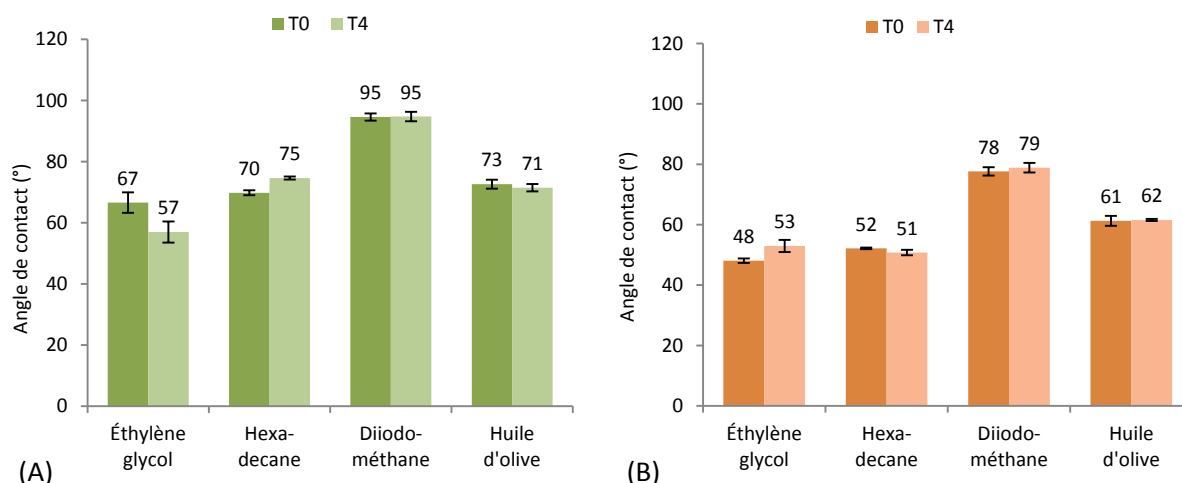


Figure 4-29 : Mouillabilité : effet vieillissement.
(A) F1 ; (B) F2.

3.5.4. Effet séchage

La mouillabilité du dépôt non sec est identique à 0 et 5min, il n'y a donc pas d'effet du séchage sur le dépôt initial. Après 6h, l'angle de contact du dépôt non sec initialement ne diminue que très peu et présente donc les meilleures propriétés de répulsion vis-à-vis de l'huile d'olive. Pour l'ensemble des études du Chapitre 5, les dépôts seront séchés avant application du paraoxon pour des raisons de mise en œuvre pratique mais **cette expérience nous montre que potentiellement F1 pourrait montrer les mêmes capacités de répulsion dès son application.**

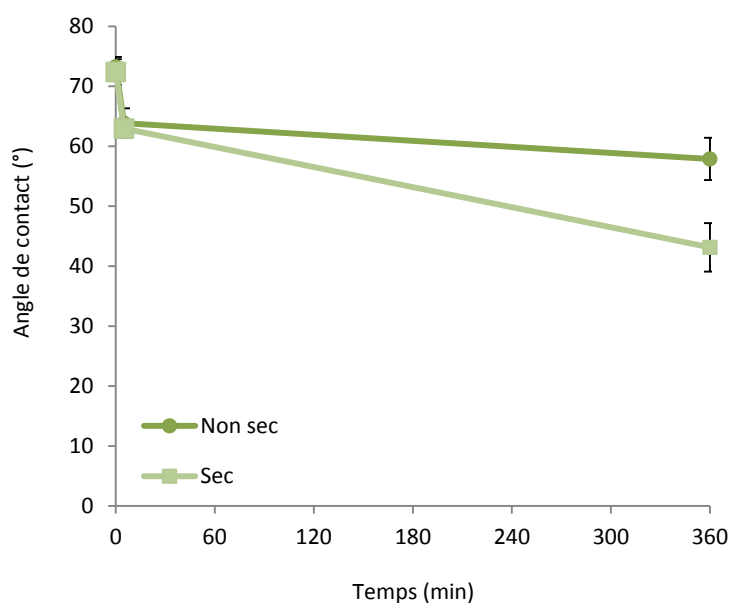


Figure 4-30 : Mouillabilité : effet séchage.

IV. CONCLUSION

La formulation des actifs PSi et PCe a permis de sélectionner 2 formules très efficaces : **F1 et F2**. Les analyses par MEB ont permis de démontrer que le **réseau** de **nanoparticules après formulation** restait **dense** et les nanoparticules **individualisées** tant pour le PSi que pour le PCe. La stabilité des deux crèmes a été étudiée : **F1 semble stable tandis que F2 semble se déstabiliser** au cours du vieillissement de la crème, l'effet du vieillissement sur l'efficacité sera donc abordé dans le Chapitre 5. Les analyses de surface ont montré que la **mouillabilité** des dépôts et leur rugosité étaient **indépendantes** de la **quantité** de formule appliquée et du **vieillissement** de celles-ci. Ainsi, dès 5mg/cm² les deux nouvelles crèmes barrières semblent induire une modification de surface. La comparaison de F1 et sa base permet de conclure que les **propriétés de mouillabilité** sont **conférées** par le **polymère** et non par les nanoparticules. Les études de mouillabilité au cours du temps montrent que la goutte tend à s'étaler de plus en plus sur la surface mais également qu'il y a aucune différence de comportement mouillabilité au cours du séchage, **F1 pourrait donc montrer les mêmes capacités de répulsion dès son application**. Globalement, **F1 présente les meilleures propriétés de répulsion** par rapport à F2. Cependant, il a été démontré également que la mouillabilité seule n'est pas le paramètre clef qui permettrait de prédire l'efficacité d'une crème car celle-ci dépend d'un processus plus complexe incluant des paramètres physico-chimiques et dépendant de la membrane et du type d'actif ou d'ingrédient utilisé. Il sera donc intéressant de comparer les efficacités de F1 et F2.

L'efficacité des deux formules sélectionnées va être étudiée en détail au chapitre suivant.

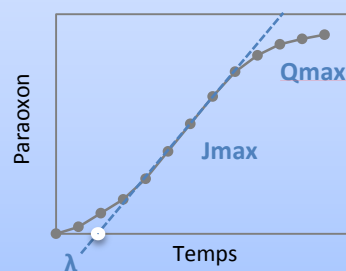
Références bibliographiques

1. Opinion on Titanium Dioxide (nano form). COLIPA n°S75. *Sci. Comm. Consum. Saf.* (2013).
2. Šteng, V. *et al.* Reaction of sulfur mustard gas, soman and agent VX with nanosized anatase TiO₂ and ferrihydrite. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 754–758 (2005).
3. Zhang, Y., Zhou, Z., Chen, T., Wang, H. & Lu, W. Graphene TiO₂ nanocomposites with high photocatalytic activity for the degradation of sodium pentachlorophenol. *J. Environ. Sci.* **26**, 2114–2122 (2014).
4. Kadam, a. N., Dhabbe, R. S., Kokate, M. R., Gaikwad, Y. B. & Garadkar, K. M. Preparation of N doped TiO₂ via microwave-assisted method and its photocatalytic activity for degradation of Malathion. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **133**, 669–676 (2014).
5. Gomathi Devi, L. N. & Krishnamurthy, G. Photocatalytic degradation of the herbicide pendimethalin using nanoparticles of BaTiO₃/TiO₂ prepared by gel to crystalline conversion method: a kinetic approach. *J. Environ. Sci. Health. B.* **43**, 553–61 (2008).
6. Chen, H., Shen, M., Chen, R., Dai, K. & Peng, T. Photocatalytic degradation of commercial methyl parathion in aqueous suspension containing La-doped TiO₂ nanoparticles. *Environ. Technol.* **32**, 1515–22 (2011).
7. Martyanov, I. & Klabunde, K. J. Photocatalytic oxidation of gaseous 2-Chloroethyl Ethyl Sulfide over TiO₂. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 3448–3453 (2003).
8. Thompson, T. L., Panayotov, D. a., Yates, J. T., Martyanov, I. & Klabunde, K. Photodecomposition of adsorbed 2-chloroethyl ethyl sulfide on TiO₂: Involvement of lattice oxygen. *J. Phys. Chem. B* **108**, 17857–17865 (2004).
9. Braue, E. H., Hobson, S. T., White, J. & Bley, R. Actives topical skin protectants using polyoxometallates. US Patent 6,420,434 B1 (2002).
10. Reeve, P. & Amigoni, S. La rhéologie: Un outil précieux pour la formulation cosmétique. *Actual. Chim.* 89–98 (2008).
11. Couarraze, G., Grossiord, J.-L. & Huang, N. *Initiation à la rhéologie : bases théoriques et applications expérimentales.* (2014).
12. Coussot, P. & Grossiord, J.-L. *Comprendre la rhéologie : de la circulation du sang à la prise du béton.* (2002).
13. Zenerino, A., Amigoni, S., Taffin de Givenchy, E., Josse, D. & Guittard, F. New fluorinated hybrid organic/inorganic water soluble polymeric network. *Polymer.* **54**, 6089–6095 (2013).
14. Millerioux, J. *et al.* Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicol. Vitro.* **23**, 127–33 (2009).

CHAPITRE 5

Etude des deux formules sélectionnées :

F1 et F2



Les formules F1 et F2 sélectionnées dans le Chapitre 4 ont donc été formulées en plus grande quantité afin de réaliser une étude approfondie de leur efficacité concernant l'intérêt de la présence des nanoparticules et de leur greffage au polymère ainsi que de chaque ingrédient et/ou actif. Les études de mouillabilité et de rugosité ont montré que la dose et le vieillissement ne modifiaient pas la mouillabilité et la capacité de la formule F1 à repousser l'huile d'olive mais qu'il y avait un effet du temps de contact sur la mouillabilité : F1 perd un peu sa capacité de répulsion entre 0, 6h et 24h.

Les tests de pré-screening ont été réalisés avec une dose de TPC de 27mg/cm² formant une couche de TPC sec d'environ 31±3µm, il est intéressant de mesurer jusqu'à quelle dose les TPC confère une protection suffisamment efficace (la mouillabilité n'étant pas impactée, un paramètre comme l'épaisseur du dépôt pourrait être à l'origine d'une modification de l'efficacité). Il a également été observé que F1 était stable après un vieillissement accéléré de 4 semaine à 45°C du à la construction continue de son réseau à l'inverse de F2. L'impact du vieillissement sur les formulations sera également évalué afin de voir jusqu'à quel moment les crèmes après ouverture conserve leur efficacité.

Enfin, dans le cas d'une application en condition réelle, c'est-à-dire en dessous de vêtements de protection, il semble important de mesurer la résistance des TPC candidats à l'occlusion.

La première partie de ce chapitre (Etude 1) va se consacrer à l'étude détaillée des formules sur membranes artificielles (protocole idem au screening des formules du Chapitre 4, annexes 4.1 et 4.2). Deux types de membranes artificielles sont utilisées : les membranes siliconées déjà utilisées comme méthode de screening *in vitro* des nouveaux TPC^{1,2} et des nouvelles membranes fabriquées par Millipore : Strat-M. Les membranes Strat-M sont des membranes bicouches dont l'argument de vente est leur similarité en termes de propriétés diffusion avec l'épiderme humain (Figure 5-1 A). De plus, leur mouillabilité vis-à-vis de l'eau, du diiodométhane et de l'huile d'olive (liquide sonde dont les propriétés de mouillabilités sont identiques au paraoxon) semble plus proche de la peau humaine que les membranes siliconées (Figure 5-1 B) c'est pourquoi il est également intéressant de tester l'efficacité des formules sur ces membranes. Les tests finaux seront réalisés sur peau humaine dermatomée (Etude 2).

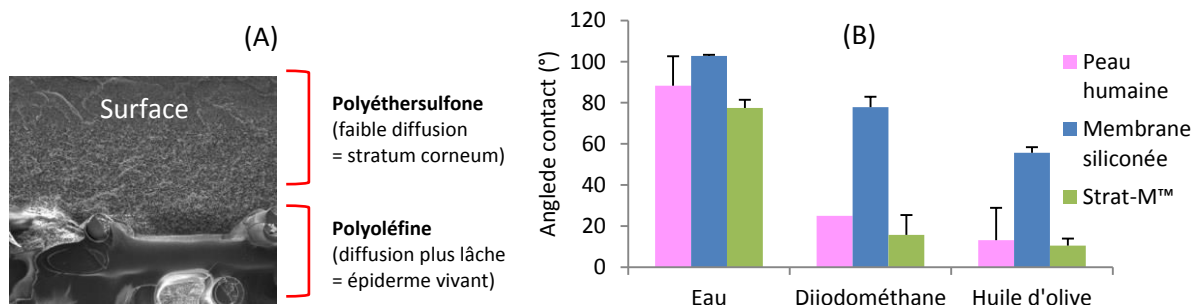


Figure 5-1: Les différentes membranes utilisées.

(A) Composition d'une membrane Strat-M et (B) mouillabilité des différents supports (eau et huile d'olive : mesures *in vivo* sur l'avant-bras de volontaire (pH et température contrôlés), diiodométhane : données de la littérature³).

Les formules sont étalées à la spatule en silicone et l'efficacité mesurée au cours de 6 ou 24h de contact avec le paraoxon. Les flux maximum ($J_{\max}$) et temps de latence (λ) seront obtenus à partir des cinétiques de pénétration (annexe 4.2). Classiquement le flux maximum est exprimé en $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, dans ce chapitre la zone d'exposition étant la même pour les différentes membranes utilisées ($1,13\text{cm}^2$), il sera exprimé en $\mu\text{g}/\text{h}$. La dose maximale retrouvée dans le liquide récepteur à la fin de l'expérience est nommée $Q_{\max}$ (en $\%Q_0$). A l'aide de ces paramètres les 2 ratios suivants pourront être calculés PR et E⁴ :

$PR \text{ (protective ratio)} = \frac{Q_{\max_{\text{témoin}}}}{Q_{\max_{\text{protégé}}}}$ (rapport des moyennes) (<i>éq. 4</i>)	$E \text{ (ratio E)} = \frac{\% \lambda}{\% J_{\max}}$ (% calculé par rapport à la moyenne des contrôles non protégés) $\% J_{\max(\text{ou } \lambda)} = \frac{J_{\max(\text{ou } \lambda) \text{ essai}}}{J_{\max(\text{ou } \lambda) \text{ membrane non protégé}}} * 100$ (<i>éq. 5</i>)
--	--

Les équations 1 et 2 du Chapitre 1 permettent d'établir la relation suivante entre les paramètres $J_{\max}$ et λ :

$$J = \frac{Km e \Delta c}{6\lambda} \quad (\text{éq. 6})$$

Une formule est efficace si elle diminue le flux maximum ($J_{\max}$) et $Q_{\max}$ et augmente le temps de latence (λ) car le coefficient de diffusion D diminue. Ainsi, plus une formule est efficace plus $J_{\max}/Q_{\max}$ sont petits et λ grand et donc PR ou E sont grands (et significativement supérieur à 1). PR et E sont des ratios calculés afin de mettre en évidence les effets protecteurs des crèmes. Cependant, c'est l'étude de la mesure des paramètres $Q_{\max}$, λ , $J_{\max}$ qui permettront conclure quant à l'effet protecteur des candidats.

Lorsque la méthode enzymatique ne permet pas de détecter de paraoxon (limite inférieure = 5nM) dans le milieu récepteur à la fin de l'expérience la formule est très efficace mais aucun $J_{\max}$, λ , $Q_{\max}$ et E ne peut être calculé, nd est alors noté dans le texte. Egalement le coefficient de variation (CV) peut être calculé pour évaluer la reproductibilité des résultats selon la formule suivante :

$$CV (\%) = \frac{\text{ecart type}}{\text{moyenne}} * 100 \quad (\text{éq. 7})$$

I. ETAPE 1 : ETUDE DETAILLEE DES TPC CANDIDATS SUR MEMBRANES ARTIFICIELLES

1.1. FORMULE 1 : F1

1.1.1. *Part d'activité des nanoparticules sur l'efficacité*

Il est important de déterminer la part d'activité des nanoparticules sur l'efficacité globale de la crème. Pour cela, la formule Base1 contenant les mêmes pourcentages en ingrédient et polymère HASE a été réalisée. Le polymère greffé contient 2/3 de polymère HASE (p/p) et 1/3 de nanoparticules de silice (p/p) (remplacées dans Base1 par de l'eau). Les conservateurs correspondant ont été également ajoutés. Ainsi, la formule Base1 est la suivante : 6.8% polymère, 3.9% PVP, 4.4% de Glycérine, 0.1% Bronopol, 18.4% NaOH 1N, 65.5% d'eau distillé (pH 7). Différentes conditions (6h et 24h, occlusives) ont été réalisées pour voir l'intérêt de l'utilisation des nanoparticules dans les nouveaux TPC. Le Tableau 5-1 résume l'ensemble des paramètres de cinétique comparant l'efficacité des formules Base1 et F1 aux membranes non protégées.

A 6h d'exposition sur membranes siliconées, F1 et sa base montrent la même efficacité : $J_{\max}$, λ et $Q_{\max}$ identiques et statiquement inférieure au contrôle. Sur membranes Strat-M, $J_{\max}$ et $Q_{\max}$ sont statiquement inférieures au contrôle non protégé et non différents. La grande variabilité du temps de latence de F1 ne permet pas de le différencier du contrôle mais ses valeurs faibles de $J_{\max}$ et $Q_{\max}$ prouvent son efficacité. **Ainsi F1 et sa base à 5mg/cm² montrent la même efficacité quel que soit le type membrane, la présence des nanoparticules n'a donc aucun effet positif sur l'efficacité de la formule pour 6h d'exposition au paraoxon sur membranes artificielles.**

Les tests à 24h d'exposition ayant été réalisés sur 3 réplicats nous ne pouvons pas démontrer statistiquement une modification de l'efficacité mais des tendances peuvent être conclues :

- Sur membranes siliconées, $J_{\max}$ diminue d'un facteur 13 et $Q_{\max}$ d'un facteur 30 tandis que λ semble être plus élevé d'un facteur 1,4. Les résultats de Base 1 sont peu reproductible par rapport F1 : le coefficient de variation est supérieur à 120% pour les paramètres $J_{\max}$ et $Q_{\max}$.
- Sur membrane Strat-M, $J_{\max}$ diminue d'un facteur 3 et $Q_{\max}$ d'un facteur 4 tandis que λ semble être plus élevé d'un facteur 1,3. Egalement sur ces membranes, les résultats de Base 1 sont peu reproductibles (CV> 110% pour les paramètres $J_{\max}$ et $Q_{\max}$).

Les calculs de PR montrent les résultats suivants (silicone/Strat-M): $PR(\text{Base1}) = 1,7/4$ et $PR(\text{F1}) = 50/16$. **F1 semble donc bien plus efficace que Base1.** Ces résultats devront être confirmés sur 3 réplicats supplémentaires. **Ainsi, pour une exposition à 24h, la présence des nanoparticules a un effet positif sur l'efficacité de la formule.** Les études de mouillabilité du Chapitre 4 (3.5) ont montré

que Base1 et F1 ont le même comportement de mouillabilité sur 24h. Ainsi, tout comme décrit au Chapitre 4 ce n'est pas la mouillabilité qui permet de discriminer l'efficacité d'une crème, il semblerait qu'elle soit donc conférée par la présence de polymère HASE-F-RF8 dans la formule et que ce paramètre ne prenne pas en compte les nanoparticules et leur impact positif sur l'efficacité.

Tableau 5-1 : Comparaison de l'efficacité de F1 et sa base (6h : TPC = 5mg/cm², 24h et occlusion : TPC = 15mg/cm²).

Membranes siliconées

Protection	6h (n>5)			24h (n=3)			Occlusion (n=3)		
	J _{max} (µg/h)	λ (min)	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (µg/h)	λ (h)	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (µg/h)	λ (min)	Q _{max} (%Q ₀)
-	55±13 ^a	40±11 ^c	5±1 ^e	55±13	0,7±0,2	5±1	37±10	31±7	4±1
Base1	7±7 ^b	103±20 ^d	0,5±0,9 ^f	13±16	14±2	3±5	20±6	192±122	1,09±0,91
F1	5±3 ^{*, b}	208±64 ^{*, d}	0,3±0,2 ^{*, f}	1±0^{**}	20±0^{**}	0,1±0^{**}	8±4	91±22	0,68±0,33

valeurs calculées sur *n=8/9 et **n=2/3, nd pour les autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace).
les lettres minuscule indiquent une différence significative pour chaque paramètre (p<0,05).

Membranes Strat-M

Protection	6h (n>5)			24h (n=3)			Occlusion (n=3)		
	J _{max} (µg/h)	λ (min)	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (µg/h)	λ (h)	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (µg/h)	λ (min)	Q _{max} (%Q ₀)
-	37±3 ^A	41±11 ^C	3,1±0,4 ^E	105±30	5±1	16±2	69±44	94±48	4,5±2,6
Base1	2±2 ^B	156±70 ^D	0,1±0,1 ^F	23±26	12±0	4±5	5±1	124±13	0,39±0,04
F1	4±3 ^B	142±123 ^{C,D}	0,3±0,3 ^F	7±8	16±3	1±1	3±0	123±17	0,19±0,05

les lettres majuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre (p<0,05).

En condition occlusives et sur les deux types de membranes, J_{max} semble légèrement inférieur à celui de Base1 (facteur 2,5 pour les membranes siliconées et facteur 1,7 pour les membranes Strat-M). Egalement sur Strat-M, la dose maximum de F1 est deux fois moins élevée que Base1. **Ainsi en condition occlusive, il semblerait que l'ajout de nanoparticules ait un effet positif sur l'efficacité.**

Il peut être conclu de cette expérience que les nanoparticules apportent un effet positif sur l'efficacité sur des longues expositions (>6h) et/ou en conditions occlusives.

1.1.2. Effet dose de la quantité de dépôt

La formule F1 a été choisie pour sa très grande efficacité à 27mg/cm² après 6h d'exposition au paraoxon. La dose de 27mg/cm² est plus de 10 fois supérieure aux doses classiquement utilisées pour les tests de protection solaire en cosmétique (2mg/cm²)⁵. Il serait donc intéressant de voir jusqu'à quelle dose F1 reste efficace. Le Tableau 5-2 résume les résultats d'efficacité selon la dose de F1 appliquée : 5mg/cm² (17±1µm), 10 mg/cm², 15mg/cm² (22±3µm), 27mg/cm² (31±3µm) et 50mg/cm².

Tableau 5-2 Effet dose de l'efficacité de F1.

Membranes siliconées

Quantité TPC (mg/cm ²)	n	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-	30	55±13	40±11	1	5±1
5	8	5±3 ^a	208±64 ^c	270±443 (>16)	0,3±0,2 ^d
10*	3/6	1±0 ^b	190±67 ^c	277±125 (>146)	0,04±0,02 ^e
15*	3/9	3±4 ^b	170±80 ^c	194±226 (>49)	0,12±0,09 ^e
27*	0/6	nd	nd	nd	nd
50*	0/6	nd	nd	nd	nd

*valeurs calculées sur n réplicats, nd (non déterminé) pour les autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace). les lettres minuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre (p<0,05).

Membranes Strat-M

Quantité TPC (mg/cm ²)	n	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-	8	37±3 ^A	41±11 ^C	1 ^E	3,1±0,4 ^G
5	5	4±3 ^B	142±123 ^{C,D}	72±33 ^E	0,26±0,25 ^H
15*	3/6	0,07±0,02 ^B	229±38 ^D	2968±460 ^F	<0,01 ^H

*valeurs calculées sur n réplicats, nd pour les autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace). les lettres majuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre (p<0,05).

Sur membrane siliconées, on observe une différence significative des paramètres J_{max}, λ et Q_{max} entre les groupes de dose (1) 0mg/cm², (2) 5mg/cm² et (3) 10-15mg/cm². A 27-50mg/cm² la quantité ayant pénétré est inférieure à la limite de détection (5nM = 0,0001%Q₀), ces doses sont les plus efficaces. **On peut donc classer l'efficacité des doses de la manière suivante : 5 < (10 = 15) < (27 = 50)mg/cm².** Le ratio E est présent à titre indicatif, aucune différence significative n'est trouvée entre les différentes doses et les membranes non protégées. En effet, les quantités retrouvées dans le milieu récepteur sont tellement faibles qu'il y a une grande variabilité des résultats ce qui limite la pertinence des analyses statistiques.

Sur membranes Strat-M, deux doses significativement différentes sur membranes siliconées ont été testées : 5 et 15mg/cm². De même que pour les membranes siliconées, J_{max}, λ et Q_{max} sont statistiquement différents des membranes non protégées. De plus, ici les ratios E sont significativement différents des membranes non protégées et entre eux. **L'efficacité des doses sur membranes Strat-M peut être classées de la manière suivante : 5 < 15mg/cm².**

Dès 5mg/cm² une efficacité significative est observée, c'est à 27mg/cm² que l'efficacité est la plus importante.

1.2. FORMULE 2 : F2

1.2.1. Impact de la formulation sur l'efficacité

Avant la formulation en grande quantité de F2 (160g), une mini formule (MF2, 20g) a été réalisée afin de tester l'impact de l'ajout des conservateurs. Ces deux formules sont identiques en terme de composition : PCe 13%, Glycérine 3.7% + conservateurs, pH 7. La différence réside dans la méthode de formulation : agitation magnétique 1 nuit puis neutralisation à la main pour la première et agitation mécanique 4h et neutralisation pour la deuxième.

Sur membranes siliconées, à 5 mg/cm² F2 ne présente aucune efficacité tandis que MF2 retarde à minima la pénétration d'un facteur 4 (Figure 5-2 et Tableau 5-3). Sur membranes Strat-M la différence entre les deux formules est encore plus grande, MF2 retarde (diminution de $J_{\max}$ d'un facteur 7) et limite (augmentation du λ d'un facteur 5) la pénétration du paraoxon par rapport à F2. Sur Strat-M F2 à 5mg/cm² est néanmoins efficaces comparés aux résultats sur membranes siliconées.

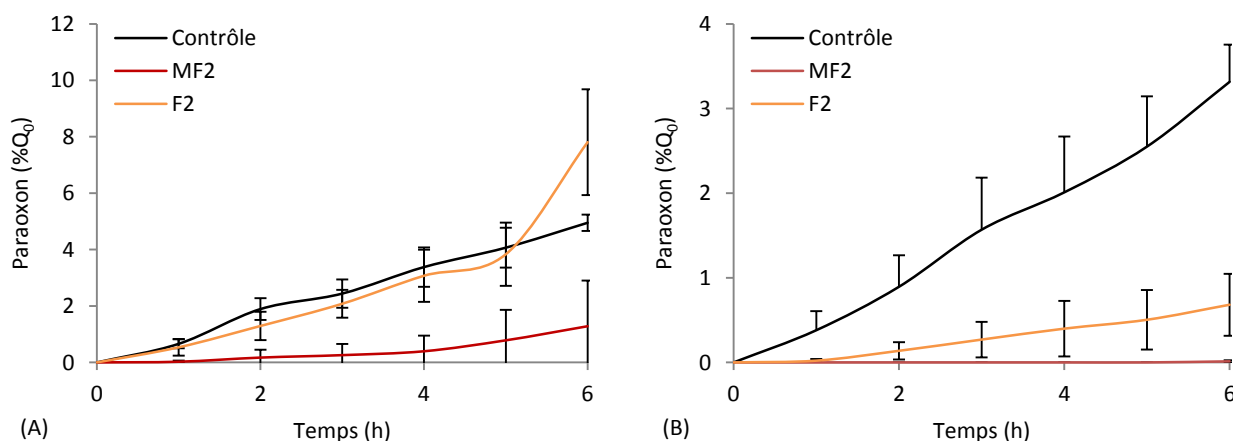


Figure 5-2 : Effet de la formulation sur l'efficacité de F2.

(TPC = 5mg/cm², contrôle = membranes non protégées : (A) membranes siliconées et (B) Strat-M).

La formulation en grosse quantité de F2 n'a pas permis d'obtenir l'efficacité des mini-formules, elle est donc à retravailler. Cependant, pour le reste de l'étude la formule F2 sera utilisée car l'étude en vieillissement accéléré nécessite des quantités de l'ordre de 100g.

Tableau 5-3 : Efficacité de MF2 et F2 contre la pénétration du paraoxon (TPC = 5mg/cm²).*Membranes siliconées*

Protection	n	J _{max} (μg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-		55±13	40±11	1	5±1
MF2	3	27±29	224±42	23±17	1±2
F2	6	73±9	67±9	1±0	8±1

Membranes Strat-M

Protection	n	J _{max} (μg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-		37±3	41±11	1	5±1
MF2	3	1±1	295±9	799±743	0,01±0,01
F2	3	7±4	62±18	10±8	0,7±0,1

1.2.2. Part d'activité des nanoparticules sur l'efficacité

De même que pour F1, une formule Base2 a été réalisée pour étudier l'impact de la présence des nanoparticules de cérium sur l'efficacité. La formule Base2 est la suivante : 8,7% polymère, 3,8% de Glycérine, 23,2% NaOH 1N et 64,3% d'eau distillée (pH 7). De plus, une formule contenant les nanoparticules mais non greffées au polymère a été réalisée pour étudier l'impact du greffage. Celle-ci contient les mêmes ingrédients et actifs que F2 soit : 8,6% de polymère et 4,3% de nanoparticules de CeO₂ correspondant aux 13% de PCE et 3,8% de Glycérine. Les nanoparticules ont été dispersées dès le début à l'aide du polymère afin d'obtenir une crème la plus homogène possible. La Figure 5-3 et le Tableau 5-4 résument les résultats obtenus.

A 27 mg/cm² F2 confère la protection maximale puisque moins de 5nM (nd) de paraoxon sont détectés à 6h tandis que Base2 ne fait que retarder la pénétration (facteur 3-4). **L'ajout de nanoparticules de cérium dans la formule augmente significativement l'efficacité.**

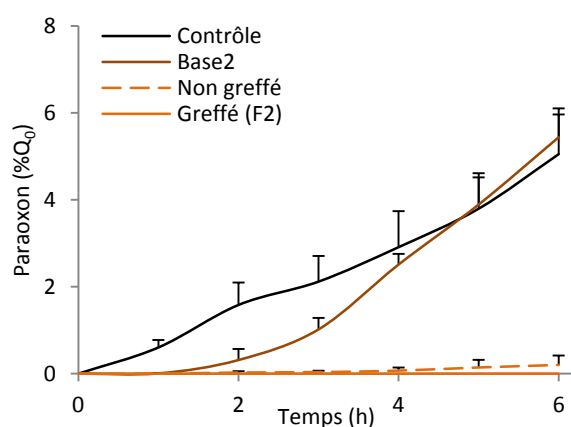


Figure 5-3 : Pénétration du paraoxon sur membranes siliconées.
(TPC = 27mg/cm², contrôle = membranes non protégées).

Tableau 5-4: Effet des nanoparticules et du greffage sur l'efficacité des polymères sur membranes siliconées (TPC = 27mg/cm²).

Protection	J _{max} (μg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
Contrôle (n=9)	55±13	40±11	-	5±1
Base2 (n=6)	82±10	137±3*	2±0	5±1
Non greffé (n=3)	5±5	171±108	115±99 (>25)	0,2±0,2
F2 (n=6)	nd	nd	nd	nd

*indique une différence significative avec le contrôle non protégé (p<0.05). nd (non déterminé) car inférieur à la limite de détection (très efficace).

La formule « Non greffé » montre une efficacité certaine : elle semble retarder (facteur 4) et diminuer (facteur 10) la pénétration du paraoxon. Cependant cette efficacité n'est pas comparable à F2 qui ne laisse rien passer à 6h. **Le greffage des nanoparticules de cérium au polymère HASE-F-RF8 augmente leur effet protecteur.**

1.2.3. Effet dose des actifs/nanoparticules sur l'efficacité

La formule F2 a été choisie pour sa très grande efficacité à 27mg/cm² après 6h d'exposition au paraoxon. Il serait intéressant de voir l'évolution de l'efficacité en fonction de :

- La concentration en polymère greffé : peut-on diminuer la quantité d'actif ?
- La dose appliquée : conserve-t-on l'efficacité de F2 à de faible dose ?

- **Etude de la variation d'actif**

Pour cette étude, 3 formules supplémentaires ont donc été réalisées contenant chacune 9, 6 et 3% de PCe et ont été testées à 27mg/cm² (quantité de TPC la plus efficace) (Tableau 5-5).

Plus la quantité d'actifs augmente plus l'efficacité augmente :

- 1% de nanoparticules (3% de PCe) ne permettent que de retarder la pénétration du paraoxon.
- 3 et 2% (correspondant à 9 et 6% de PCe) permettent à la fois de retarder et diminuer la pénétration.
- 13% de PCe équivalent à 4% en terme de nanoparticule de CeO₂ est le plus efficace puisque rien ne pénètre.

Tableau 5-5 : Effet dose de la quantité de nanoparticules de dioxyde de cérium dans la crème sur l'efficacité mesuré sur membranes siliconées (TPC = 27mg/cm², n=6).

% polymère greffé	% NPs de CeO ₂	J _{max} (µg/h)	λ (min)	Q _{max} (%Q ₀)
13%	4%	nd	nd	nd
9%	3%	2±2*	134±23*	0,1±0,1*
6%	2%	2±1*	252±36*	0,05±0,04*
3%	1%	46±2	219±2*	2±0*
0%	0%	55±13	40±11	5±1

* indique une différence significative avec le contrôle non protégé (p<0.05). NPs = nanoparticules

L'optimum est donc obtenu à 13% de polymère greffé soit 4% de nanoparticules de CeO₂ mais il est à noter qu'avec seulement 1% de nanoparticules greffées au polymère une efficacité significative est tout de même observée.

- **Etude de la dose de TPC**

Tout comme F1 nous cherchons à diminuer la quantité de TPC à appliquer car 27mg/cm² est une dose représentant une épaisse couche de crème à étaler. Le Tableau 5-6 résume les résultats d'efficacité selon la dose de F2 appliquée.

Sur les deux types de membranes en appliquant deux fois moins (15mg/cm²) l'efficacité reste très significative : $J_{\max}$ et $Q_{\max}$ sont diminués respectivement de 5-10 et 10-50 et λ augmenté d'un facteur 4-6. A 10mg/cm², la pénétration est très retardée (facteur 5), ce qui permet à la fin de l'expérience de retrouver une dose dans le compartiment récepteur significativement inférieure à celle retrouvée pour les membranes non protégées. A 5mg/cm² les résultats sont différents selon les membranes utilisées : aucune efficacité voir même une augmentation de la pénétration sont observés sur membranes siliconées mais sur Strat-M une efficacité significative due à une forte diminution du $J_{\max}$ (facteur 5) est néanmoins observée.

Tableau 5-6 : Effet dose de l'efficacité de F2 (n=6).

Membranes siliconées

Quantité (mg/cm ²)	$J_{\max}$ (μg/h)	λ (min)	E	$Q_{\max}$ (% Q_0)
-	55±13 ^a	40±11 ^d	1 ^f	5±1 ^h
5	73±19 ^b	67±9 ^d	1±0 ^f	8±1 ⁱ
10	60±10 ^{a,b}	216±76 ^e	5±2 ^f	2±1 ^j
15	5,8±5,3 ^c	260±44 ^e	120±71 ^g	0,1±0,1 ^k
27	nd	nd	nd	nd

Les lettres minuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre ($p<0,05$).

Membranes Strat-M

Quantité (mg/cm ²)	$J_{\max}$ (μg/h)	λ (min)	E	$Q_{\max}$ (% Q_0)
-	37±3 ^A	41±11 ^C	1 ^E	3±0 ^G
5	7±4 ^B	62±18 ^C	10±8 ^{E,F}	0,7±0,4 ^H
15*	8±7 ^B	179±83 ^D	83±65 ^F	0,3±0,2 ^H

*valeurs calculées sur 4/6 réplicats, nd pour les 2 autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace). Les lettres majuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre ($p<0,05$).

Pour F2, la dose minimale dont une efficacité certaine est observée (diminution $J_{\max}$ et augmentation λ) est 15mg/cm².

- **Comparaison en termes de nanoparticules/cm²**

La comparaison de l'effet variation en actif et de l'effet dose permet d'établir deux groupes en termes de quantité de nanoparticules de CeO₂ par cm² (Tableau 5-7).

Tableau 5-7 : Calcul des quantités de nanoparticules contenues dans le dépôt en fonction des concentrations dans les crèmes et des quantités déposées.

%PCE dans la crème	Quantité étalé	Quantité de NPs CeO ₂ dans le dépôt	E	Q _{max} (%Q ₀)	
9%	27mg/cm ²	0,81mg/cm ²	266±316 (>57)	0,1±0,1*	Groupe 1
6%	27mg/cm ²	0,54mg/cm ²	440±472 (>100)	0,05±0,04*	
13%	15mg/cm ²	0,65mg/cm ²	120±71*	0,1±0,1*	
3%	27mg/cm ²	0,27mg/cm ²	9±7	2±0*	Groupe 2
13%	5mg/cm ²	0,22mg/cm ²	23±17	1±2*	

* indique une différence significative avec le contrôle non protégé ($p < 0.05$). NPs = nanoparticules

Si on compare les efficacités du groupe 1 :

Les ratios E ne sont pas différents. La pénétration reste la même ($J_{\max} = 2\text{-}6\mu\text{g/h}$) et le temps de latence d'environ 200min.

Si l'on compare les efficacités du groupe 2 :

La tendance semble être la même pour le groupe même si la pénétration semble être un peu plus réduite pour 13% à 5mg/cm² ($J_{\max} = 27 \pm 28\mu\text{g/h}$) que 3% à 27mg/cm² ($46 \pm 2\mu\text{g/h}$). Le temps de latence est identique et d'environ 220min.

• Conclusion

La comparaison de la Base2 avec F2 a précédemment permis de conclure que les nanoparticules confèrent l'effet protecteur à la formule. Les études d'effet-dose du dépôt ou des actifs semblent donc suivre la même tendance : l'efficacité est dépendante de la présence des actifs contenant des nanoparticules de CeO₂ greffées.

1.2.4. Comparaison de l'efficacité de F2 à des formules préexistantes

Nous pouvons également comparer nos résultats de formules avec de précédentes études réalisées en interne ou par nos partenaires sur membranes siliconées⁶ (Tableau 5-8). H21 CeO₂ est une émulsion huile dans eau dans laquelle sont dispersées 10% de nanoparticules de CeO₂ de 10nm. L'efficacité de cette formule a été testée à 5mg/cm². HASE/CeO₂ est le polymère greffé non formulé.

Le dépôt de F2 contenant 0,65mg nanoparticules CeO₂/cm² est bien plus efficace que celui du polymère non formulé contenant plus de 10mg nanoparticules CeO₂/cm² ($E_{F2} \gg E_{HASE/CeO2}$). En effet, la pénétration est réduite d'un facteur 2 par rapport au polymère non formulé (% $J_{\max}$) mais également retardée d'un facteur 6 (% λ). **La formulation du polymère permet donc d'augmenter de manière significative l'efficacité contre la pénétration du paraoxon.**

Tableau 5-8 : Comparaison de l'efficacité en fonction du type d'intégration des nanoparticules de CeO₂.

TPC (% NPs de CeO ₂)	Quantité étalé	Quantité de NPs CeO ₂ dans le dépôt	%J _{max}	%λ	E
H21 CeO ₂ (10%)	5mg/cm ²	0,5mg/cm ²	40%	157%	4±1 ^a
HASE/CeO ₂ (33%)	50mg/cm ²	16,6mg/cm ²	20%	161%	10±7 ^a
MF2 (4%)	5mg/cm ²	0,22mg/cm ²	50%	560%	27±17 ^a
F2 (4%)	15mg/cm ²	0,65mg/cm ²	10%	619%	120±71 ^b

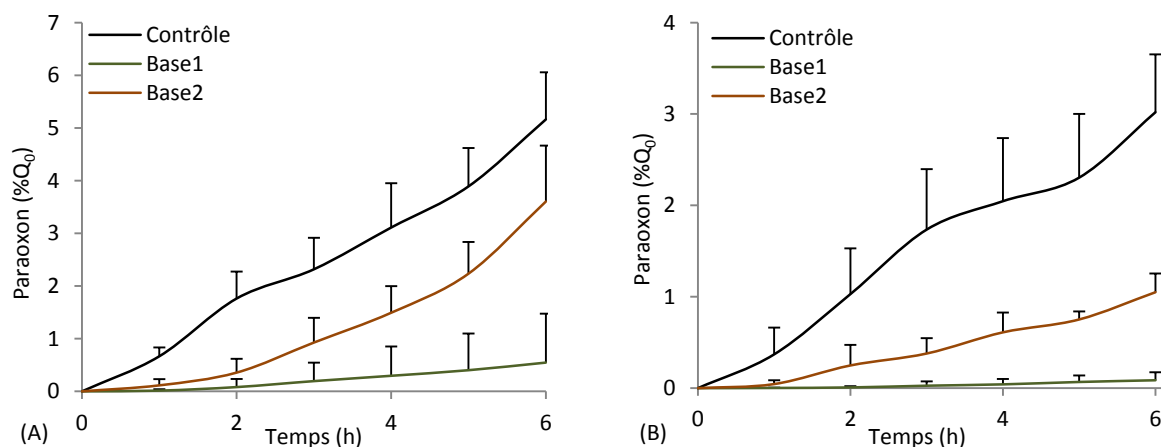
Les mêmes nanoparticules ont été utilisées pour tous les échantillons (taille 10 nm) (n=6). Les lettres minuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre ($p < 0,05$). NPs = nanoparticules

A quantité de nanoparticules de CeO₂ similaire (~0,5mg/cm²) F2 réduit d'autant plus la pénétration mais également la retarde par rapport à H21 CeO₂ (facteur 3-4 entre les différents %J_{max} et %λ). De plus, même en diminuant la quantité de nanoparticules jusqu'à 0,22mg/cm² soit 3 fois moins que la formule H21 CeO₂, l'efficacité reste la même (pas de différence significative entre les deux formules).

Cette étude prouve qu'autant l'ajout de nanoparticules de CeO₂, que leur greffage à un polymère modificateur de rhéologie HASE ainsi que la formulation de celui-ci sont des facteurs augmentant tous significativement l'efficacité d'un TPC contre la pénétration du paraoxon. En effet, le polymère disperse de manière homogène et individuelle les nanoparticules permettant ainsi de garder leur surface active intacte contrairement à la crème H21 dans lesquelles les nanoparticules sont intégrées en cours de formulation et où elles peuvent alors être agrégées, présentant ainsi une surface active restreinte par rapport à la quantité en nanoparticules.

1.3. COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES FORMULES BASE1 ET BASE2 : EFFET DU PVP

La comparaison des bases permet de mettre en évidence une différence de protection due aux ingrédients contenus dans ces bases et non liée à la différence en nanoparticules (Figure 5-4 et Tableau 5-9).

**Figure 5-4 : Pénétration du paraoxon au travers des bases.**

(A) membranes siliconées et (B) Strat-M (TPC = 5mg/cm², contrôle = membranes non protégées).

Tableau 5-9 : Comparaison de l'efficacité des bases (TPC = 5mg/cm²).

<i>Membranes siliconées</i>					
Protection	n	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-		55±13 ^a	41±11 ^c	1 ^f	5±1 ^g
Base 1	6	7±7 ^b	103±20 ^d	162±271 ^g (>3)	0,5±0,9 ^h
Base 2	6	70±33 ^a	170±36 ^e	4±1 ^f (>2)	3,6±1,1 ⁱ

<i>Membranes Strat-M</i>					
Protection	n	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-		37±3 ^A	41±11 ^C	1 ^E	3±0 ^G
Base 1	6	2±2 ^B	156±70 ^D	370±465 ^F (>17)	0,1±0,1 ^H
Base 2	3	25±10 ^A	101±51 ^{C,D}	5±3 ^{E,F}	1±0 ^I

Les lettres majuscules et minuscules indiquent une différence significative pour chaque paramètre ($p < 0,05$).

Sur membranes siliconées, Base2 ne fait que retarder la pénétration du paraoxon tandis que sur Strat-M elle limite également la pénétration d'un facteur 5 (Q_{max}). Cependant, sur les deux types de membranes la Base1 est plus efficace que la Base2. L'analyse du comportement des deux crèmes peut être ici poussée un peu plus loin. Dans le cas de Base 1 sur membranes siliconées, J_{max} est réduit d'un facteur 7,9 et λ augmenté d'un facteur 2,5 ainsi selon l'équation 6 le coefficient de partage Km est diminué d'un facteur 3. Ainsi, la diminution de la quantité pénétrée par un facteur 10 est la résultante de la diminution du J_{max} et Km et de l'augmentation du λ. L'analyse des résultats sur membranes Strat-M tend vers la même conclusion. Dans le cas de Base 2 sur membranes siliconées, J_{max} et λ augmentent d'un facteur 1,3 et 4 donc Km augmente ici d'un facteur 5. Cependant, λ augmente donc le facteur de diffusion D diminue. Base 2 favorise donc l'entrée dans la membrane siliconée mais limite sa diffusion. Ce mécanisme de pénétration peut être expliqué de la manière suivante : le réseau de polymère crée par le dépôt de Base 2 sur la membrane est difficile à traverser (diffusion limitée) mais le paraoxon a une affinité plus grande pour la membrane siliconée que pour Base 2 (partage augmenté). L'analyse des résultats sur membranes Strat-M tend vers la même conclusion (J_{max} inchangé et λ augmenté d'un facteur 2,5).

Base2 est composé de 3,7% de glycérine et de 8,5% de polymère tandis que Base1 est composé de 3,7% de glycérine, de 6,8% de polymère et de 4% de PVP. **Il semblerait donc que le PVP ait un impact positif sur l'efficacité des formules. Une piste supplémentaire serait donc d'intégrer cet ingrédient à la formule F2 pour en augmenter son efficacité.**

1.4. COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES FORMULES F1 VS F2

Le Tableau 5-10 présente la comparaison (ratio E et $Q_{\max}$) pour chaque formule sur les deux types de membranes. Pour la plupart des doses les ratios E de F1 sont plus élevés que ceux de F2 même si la différence n'est pas toujours significative. La même tendance est observée pour le paramètre $Q_{\max}$ ($Q_{\max F1} < Q_{\max F2}$). Seul, la dose 15mg/cm² sur membrane siliconée montre un ratio E et une $Q_{\max}$ identiques entre les deux formules. De même, à partir de 27mg/cm² la différence entre les deux formules n'est pas visible puisque l'on atteint la limite inférieure de détection (5nM). **Ainsi, globalement F1 semble plus efficace que F2 et particulièrement pour des doses de 5 à 10mg/cm².**

Les études de mouillabilité du Chapitre 4 (3.5) ont montré que F1 présente des propriétés de mouillabilité plus faibles que F2 (angle de contact est plus élevé). Bien que la conclusion du Chapitre 4 concernant la mouillabilité soit qu'elle n'est pas un facteur clef de l'efficacité d'une formule, il semblerait que dans le cas de la comparaison de l'efficacité des deux TPC candidats l'efficacité aille dans le même sens que les propriétés de mouillabilité.

Tableau 5-10 : Comparaison de l'efficacité des formules F1 et F2 : ratio E (A) et $Q_{\max}$ (B) à 6h sur membrane siliconées ; ratio E (C) et $Q_{\max}$ (D) à 6h sur membrane Strat-M.

(A)			(B)		
Dose (mg/cm ²)	F1	F2	Dose (mg/cm ²)	F1 (% Q_0)	F2 (% Q_0)
5	270±443 (n=8)	1±0 (n=6)	5	0,3±0,2 ^a (n=8)	8±1 ^b (n=6)
10	277±125 (n=3/6)*	5±2 (n=6)	10	0,04±0,02 ^c (n=6)	2±1 ^d (n=6)
15	194±226 (n=3/9)*	120±71 (n=6)	15	0,1±0,1 (n=3/9)*	0,1±0,1 (n=6)

(C)			(D)		
Dose (mg/cm ²)	F1	F2	Dose (mg/cm ²)	F1 (% Q_0)	F2 (% Q_0)
5	72±33 (n=6)	10±8 (n=3)	5	0,3±0,2 (n=6)	0,7±0,4 (n=3)
15	2868±460 ^e (n=3/6)	83±65 ^f (n=4/6)	15	<0,01 (n=3/6)	0,3±0,2 (n=4/6)*

*valeurs calculées sur n répliqués, nd pour les autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace). Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les formules pour une même dose (p<0,05).

1.5. INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR L'EFFICACITE DE LA CREME

1.5.1. Influence du temps d'exposition

Le but de cette expérience est de déterminer le seuil d'efficacité dans le temps des nouveaux TPC. La dose choisie pour ces tests en conditions d'exposition longue est 15mg/cm² (efficacité avérée

à la fois pour F1 et F2). La Figure 5-5 montre que F1 reste très efficace à 24h d'exposition sur les deux types de membranes. Dans le cas de F2, il y a rupture de la protection après 6h d'exposition sur membranes siliconées. Sur membranes Strat-M cette rupture n'est pas autant visible, après 6h d'exposition il y a une pénétration constante du paraoxon jusqu'à 21h mais sans jamais dépasser la quantité retrouvée pour les membranes non protégées.

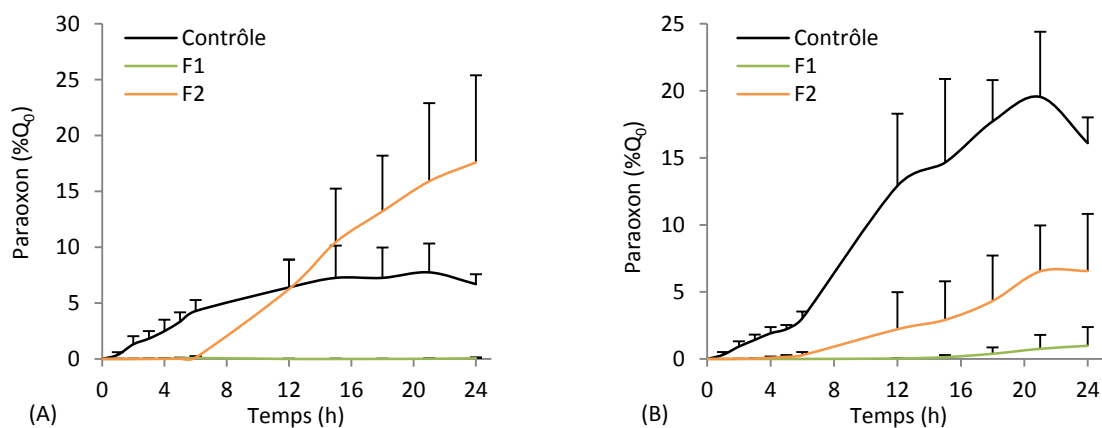


Figure 5-5: Efficacité des crèmes à 24h.

(A) membranes siliconées et (B) Strat-M (n=3, TPC = 15mg/cm², contrôle = membranes non protégées).

Le Tableau 5-11 compare les résultats à 6 et 24h d'exposition. Les tests ayant été réalisés sur 3 réplicats nous ne pouvons pas démontrer statistiquement une modification de l'efficacité mais des tendances peuvent être conclues. **F1 conserve son efficacité jusqu'à 24h sur membranes siliconées tandis qu'elle est un peu diminuée tout en restant très efficace sur Strat-M. Au contraire F2 la perd complètement sur les deux types de membranes.**

Tableau 5-11: Efficacité des formules selon le temps d'exposition (15mg/cm²).

Membranes siliconées

Protection	6h (n≥6)				24h (n=3)			
	J _{max} (μg/h)	λ (h)	E	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (μg/h)	λ (h)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-	55±13	0,7±0,2	1	5±1	55±13	0,7±0,2	1	7±1
F1	3±4*	3±1*	146±226* (>49)	0,1±0,1*	1±0**	20±0**	1308±49**	0,1±0**
F2	6±5	4±1	120±71	0,1±0,1	67±21	6±1	8±2	18±8

valeurs calculées sur *n=3/6 et **n=2/3, nd pour les autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace).

Membranes Strat-M

Protection	6h (n=6)				24h (n=3)			
	J _{max} (μg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (μg/h)	λ (h)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-	37±3	41±11	1	3±0	105±30	5±1	1	16±2
F1	0,07±0,02*	4±1*	2868±460*	<0,01*	7±8	16±3	124±106	1±1
F2	8±7**	3±1**	83±65**	0,3±0,2**	38±7	11±7	6±4	7±4

valeurs calculées sur *n=3/6 et **n=4/6, nd pour les autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace).

1.5.2. Résistance à l'occlusion

Dans des conditions réelles d'utilisation, les utilisateurs appliqueront ce TPC en dessous d'un vêtement de protection. Cette expérience étudie l'impact de l'occlusion sur l'efficacité des topiques. Les doses suivantes choisies pour les tests en conditions occlusives sont les plus petites doses évaluées suffisamment efficaces sur chaque type de membrane : membrane siliconée 15mg/cm² ; Strat-M 15mg/cm² pour F1 et 5mg/cm² pour F2. La Figure 5-6 montre clairement que sur membrane Strat-M les deux formules restent efficaces tandis que sur membranes siliconées seul F1 reste efficace.

Le Tableau 5-12 présente quant à lui la comparaison entre les conditions occlusives et non occlusives pour chaque formule sur chaque type de membranes. Les tests d'occlusion ayant été fait sur n=3 nous ne pouvons pas démontrer statistiquement une modification de l'efficacité mais des tendances peuvent être conclues.

Sur membranes siliconées, entre les deux conditions le ratio E diminue fortement pour les deux formules testées : d'environ 700-1000 à 30 (F1) et 3 (F2). Cependant F1 semble conserver son efficacité ($Q_{\max} = 0,1-0,5\%Q_0$). Pour F2 $J_{\max}$, λ et $Q_{\max}$ sont identiques au contrôle, F2 a donc perdu son efficacité sur membranes siliconées en conditions occlusives. **La comparaison de l'efficacité des deux formules permet de classer F1 comme meilleure protection en condition occlusive (E supérieur).**

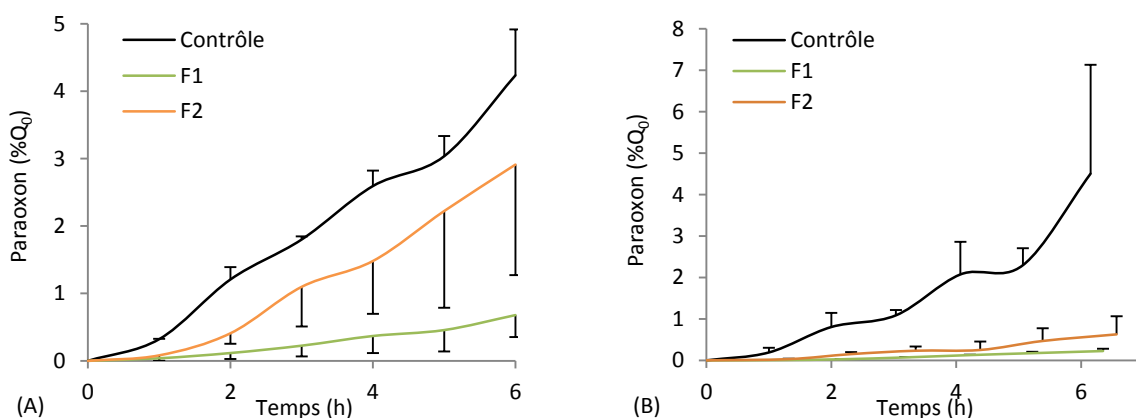


Figure 5-6 : Efficacité des crèmes en conditions occlusives.

(A) membranes siliconées (15mg/cm²) et (B) Strat-M (F1 15mg/cm², F2 5mg/cm²) (n=3, contrôle = membranes non protégées).

Sur membranes Strat-M, seul F1 semble légèrement impactée par les conditions occlusives. Tous les paramètres observés pour F2 (λ , $J_{\max}$, $Q_{\max}$ et E) sont identiques entre les deux conditions. F1 voit son ratio E et λ diminuer de respectivement au moins 60 et 2 fois et son $J_{\max}$ et $Q_{\max}$ augmenter de respectivement 75 et 10 fois. Si l'on compare les ratios E et les quantités appliquées pour chacune des formules, le facteur 3 est retrouvé : F2 est appliqué à une dose 3 fois moins élevée (15mg/cm² vs 5mg/cm²) et l'efficacité est divisée par un facteur 3 (28 vs 8). Il serait tentant de conclure que

l'efficacité de F1 et F2 sont identiques (augmentation de la dose de F2 par 3 = multiplication de E par 3) mais nous avons vu dans ce chapitre que le ratio E n'est pas proportionnel à la dose appliquée (1.1.2 et 1.2.3).

Tableau 5-12 : Efficacité des formules en conditions occlusives et non occlusives (membranes siliconées = 15mg/cm²; Strat-M = F1 15mg/cm², F2 5mg/cm²).

Membranes siliconées

Protection	OUVERT (n≥6)				OCCLUSION (n=3)			
	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-	55±13	40±11	1	5±1	37±10	31±7	1	4±1
F1	3±4*	170±80*	146±226* (>49)	0,1±0,1*	8±4	91±22	18±15	0,5±0,4
F2	6±5	260±44	120±71	0,1±0,1	34±24	64±33	3±1	3±2

*valeurs calculées sur n=3/8, nd pour les 5 autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace).

Membranes Strat-M

Protection	OUVERT (n≥3)				OCCLUSION (n=3)			
	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)	J _{max} (µg/h)	λ (min)	E	Q _{max} (%Q ₀)
-	37±3	41±11	1	3±0	69±44	94±48	1	5±3
F1	0,07±0,02*	229±38*	2868±460*	<0,01*	3±0	123±17	28±2	0,2±0,1
F2	7±4	62±18	10±8	0,7±0,4	8±2	74±12	8±2	0,6±0,4

*valeurs calculées sur n=3/6, nd pour les 3 autres membranes car inférieur à la limite de détection (très efficace).

De cette étude en conditions occlusives sur différentes membranes les différentes tendances suivantes peuvent être conclues :

- **L'occlusion est un paramètre qui diminue l'efficacité des deux formules.**
- **F1 est la meilleure protection en condition occlusive (E ~ 30 vs E < 10).**
- **Il y a un effet membrane très important pour F2 : sur membranes siliconées elle perd complètement son efficacité tandis que sur Strat-M elle la maintient.**

1.5.3. Influence du vieillissement sur l'efficacité

Le vieillissement accéléré des crèmes a été réalisé par la société ABC Texture. L'incubation pendant 4 semaines à 45°C peut être comparée à un vieillissement à température ambiante pendant 6 mois. L'évaluation de l'efficacité des formules ayant subi un vieillissement accéléré permet donc d'étudier la stabilité de l'efficacité au cours du vieillissement de la crème. Les crèmes ont été testées à 15mg/cm² sur membranes siliconées. La Figure 5-7 montre clairement que F1 reste efficace après 4 semaines d'incubation tandis que F2 semble perdre de son efficacité surtout due à une grande variabilité des échantillons (CV%(Q₀) >150%).

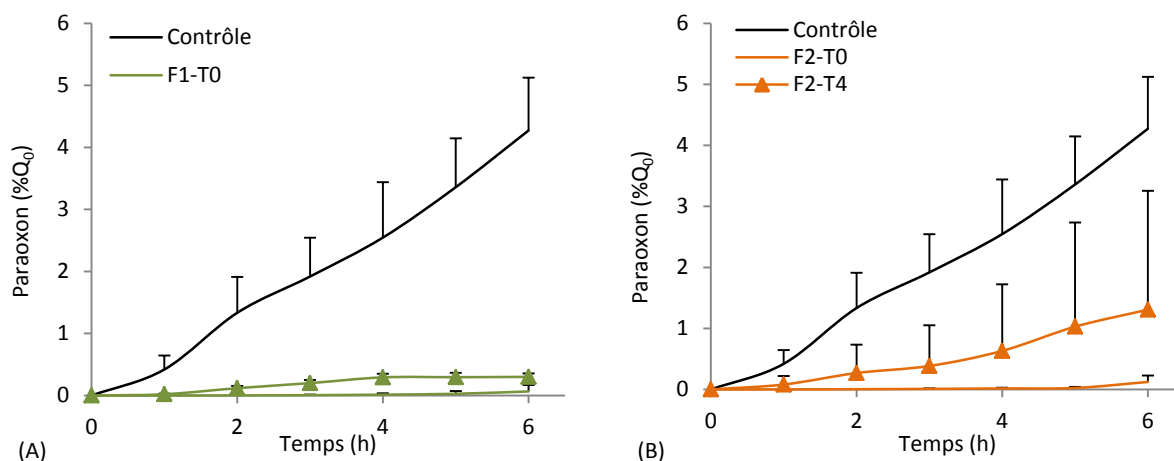


Figure 5-7 : Efficacité des formules F1 (A) et F2 (B) au cours du vieillissement de la crème.

(Contrôle = membrane non protégée, $n=12$; T0 = efficacité initiale, $n=6$; T4 = efficacité après 4 semaines d'incubation à 45°C, $n=3$).

L'évolution de F1 par rapport à T0 est la suivante : $J_{\max}$ et $\%Q_0$ augmente d'un facteur 2, λ diminue d'un facteur 3 et E diminue d'un facteur 18. De plus, il est à noter que les paramètres de cinétique (λ , $J_{\max}$, E et $Q_{\max}$) n'ont été calculés qu'avec 4/8 des réplicats, le taux de paraoxon dans le milieu récepteur des 4 autres réplicats étant inférieur à la limite de détection de la méthode enzymatique. Les résultats d'efficacité de F1-T0 sont donc à voir à la hausse. **Ainsi globalement le vieillissement accéléré de F1 lui fait perdre une partie de son efficacité.** En effet, le comportement rhéologique de la crème évolue également (voir Chapitre 4 : 3.3.), le réseau continu de se construire, la viscosité augmente et le réseau gagne en élasticité. Il y a également un changement de couleur facilement observable qui indique une oxydation. Ces modifications peuvent être à l'origine de la légère perte d'efficacité de F1.

Tableau 5-13 : Evolution de l'efficacité des formules au cours du vieillissement accéléré.

Protection	$J_{\max}$ ($\mu\text{g/h}$)	λ (min)	E	$\%Q_0$ 6h
-	55 $\pm$ 13	40 $\pm$ 11	1	5 $\pm$ 1
F1-T0 ($n=4/8$)	3 $\pm$ 4*	170 $\pm$ 85*	146 $\pm$ 226* (>49)	0,1 $\pm$ 0,1
F1-T4 ($n=3$)	6 $\pm$ 1	51 $\pm$ 32	60 $\pm$ 27 (>32)	0,3 $\pm$ 0,1
F2-T0 ($n=6$)	6 $\pm$ 5	260 $\pm$ 44	120 $\pm$ 71 (>28)	0,1 $\pm$ 0,1
F2-T4 ($n=2/3$)	31 $\pm$ 21*	173 $\pm$ 154*	71 $\pm$ 85* (>11)	2 $\pm$ 2*

*valeur calculée sur n réplicats, nd pour les autres membranes (< limite de détection).
Entre parenthèse est indiquée la plus petite valeur de E calculée parmi les réplicats

Les résultats concernant F2 sont très variables (car les valeurs détectées très petites). En effet, pour 1 réplicat la quantité de paraoxon est inférieure à la limite de détection et ne peut donc pas être pris en compte pour l'analyse de la cinétique et les deux autres réplicats sont très variables (Tableau 5-13), ainsi la pertinence de ces résultats reste à discuter. Le test n'a été réalisé que sur 3

réplicats, il faudrait donc confirmer les résultats afin de voir si la tendance est à la perte ou à la stabilité de l'efficacité de F2. Cependant, l'aspect visuel de la formule indiquant un déphasage et donc une déstabilisation du réseau (également confirmé en rhéologie) tend vers une perte de l'efficacité. De plus, l'étalement de F2 après vieillissement n'est plus aussi homogène et lisse qu'à T0.

1.6. EFFET MEMBRANE SUR L'EFFICACITE

Nous avons vu que les résultats des tests d'efficacité peuvent être dépendants du modèle utilisé. En effet, les deux modèles n'ayant pas les mêmes propriétés de surface (Strat-M bien plus oléophile et légèrement plus hydrophile que les membranes siliconées) on peut s'attendre à des différences de comportements vis-à-vis des crèmes au cours du séchage et une différence de perméabilité au paraoxon impactant ainsi l'efficacité des crèmes testées.

Malgré la forte affinité (angle de contact $\sim 10^\circ$) de l'huile d'olive (représentant le paraoxon) avec les membranes Strat-M, celles-ci ne montre pas une perméabilité plus forte que les membranes siliconées ($J_{\max}$, λ et $Q_{\max}$ similaires).

Tableau 5-14 : Comparaison des ratios de protection (PR) entre les deux membranes.

Protection	Quantité	Membrane siliconées	Membranes Strat-M
Base1	5mg/cm ²	10	30
Base2	5mg/cm ²	1,4	5
F1-6h	5mg/cm ²	16	12
F2-6h	5mg/cm ²	0,6	4,2
F2-24h	15mg/cm ²	0,4	2,3
F2-occlusion	5/15mg/cm ²	1,3 (15mg/cm ²)	8 (5mg/cm ²)

Si l'on compare les ratios de protection (PR) de différentes crèmes testées à la fois sur membranes siliconées et Strat-M (Tableau 5-14) on observe presque toujours une détermination de l'efficacité plus forte (PR plus élevé) sur Strat-M que sur membranes siliconées, exception faite de F1-6h à 5mg/cm². De plus, en condition occlusive F2 est plus efficace à 5mg/cm² sur Strat-M qu'à 15mg/cm² sur membranes siliconées.

On peut donc conclure que globalement il y a un « effet membrane », les résultats d'efficacité ne sont pas les mêmes selon le modèle artificiel utilisé. Cependant, la variation évolue toujours dans le même sens : perte ou gain d'efficacité entre les différentes doses, conditions et temps d'exposition. Ainsi, s'il existe un effet entre membranes artificielles on peut s'attendre à un effet membrane vis-à-vis de peaux humaines qui sont un modèle biologique issu du vivant.

II. ETAPE 2 : VALIDATION DE L'EFFICACITE DES FORMULES SUR EXPLANT *IN VITRO* DE PEAU HUMAINE

L'étape 2 consiste en la dernière étape de validation de l'efficacité des crèmes sélectionnées vis à vis du paraoxon. Bien, qu'un effet membrane est observé concernant l'efficacité des formules F1 et F2, les membranes artificielles ne sont qu'un support inerte permettant d'étaler la crème et de mesurer la pénétration et l'efficacité protectrice : les paramètres qui peuvent influencer la pénétration sont la présence de la crème, l'épaisseur de la membrane et la capacité de diffusion du toxique au travers de la membrane. L'utilisation d'explants de peaux modifie ces paramètres car la crème peut également pénétrer dans la peau et interagir avec les constituants de l'épiderme. La protection n'est donc plus conférée par la seule crème barrière mais par l'interaction de celle-ci avec la peau, c'est le cas de la crème barrière IB-1⁷. Ainsi l'efficacité déterminée sur membranes artificielles peut être favorisée sur peaux humaines si l'interaction avec la peau permet de conférer des propriétés protectrices supplémentaires ou au contraire l'annuler^{1,2}. Le risque est donc ici de ne pas identifier les formules F1 et F2 comme protectrice vis-à-vis de la pénétration du paraoxon.

2.1. PROTOCOLE

Les peaux humaines sont achetées chez Biopredic International (Saint Grégoire, France) et ont les caractéristiques résumées dans le Tableau 5-15. Les nouveaux TPC candidats sont appliquées à 15mg/cm² car c'est la dose qui semble la plus efficace à la fois pour F1 et F2 sur membranes artificielles (surface d'étalement des peaux humaines 3,1cm²). L'efficacité est mesurée sur 24h avec les temps de prélèvements entre 12 et 24h selon le protocole d'efficacité en annexe 4.1. A 24h, les différentes fractions sont récupérées de la manière suivante dans de l'éthanol absolu :

- Fraction surface : le volume est de 40mL. La surface est lavée avec 2 x 0.5mL d'éthanol absolu à l'aide d'une pipette. Le reste d'éthanol est récupéré à l'aide de coton-tige. Le compartiment donneur est ensuite démonté et mis à incuber dans le flacon surface correspondant. Les flacons sont mis à incuber 24h à 4°C avant de retirer le compartiment récepteur.
- Fraction crème : le volume est de 10mL. La crème est récupérée de la surface en frottant des coton-tiges imprégnés d'éthanol absolu. Le joint en téflon est également retiré de la peau et placé dans le flacon crème correspondant. Les flacons sont mis à incuber 24h à 4°C avant de retirer le joint en téflon.
- Fraction peau : les peaux sont mises à incuber dans 5mL d'éthanol absolu 48h à 4°C puis soniquées 10min.

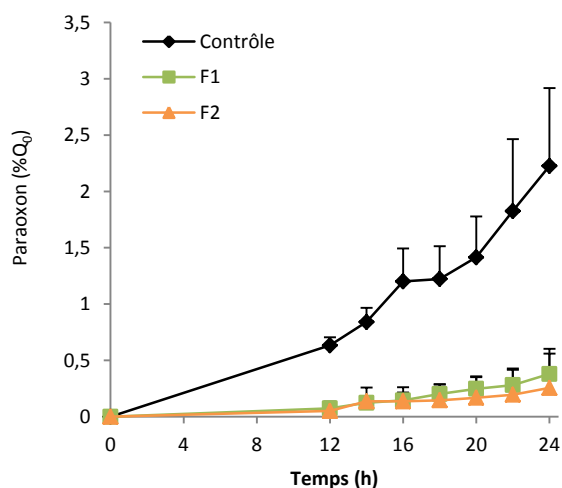
L'ensemble des fractions sont conservées à -20°C.

Tableau 5-15 : Caractéristiques des peaux humaines.

Donneur	Sexe	Origine	Âge	Zone	Type	Epaisseur
1	Féminin	Caucasienne	65 ans	Abdomen	Dermatomée	439±41µm
2	Féminin	Caucasienne	76 ans	Abdomen	Dermatomée	476±43µm
3	Féminin	Caucasienne	29 ans	Abdomen	Dermatomée	449±35µm

2.2. RESULTATS

La pénétration du paraoxon est similaire aux résultats de Vallet et al.⁸ ainsi notre méthode est validée. La Figure 5-8 met clairement en évidence l'efficacité des deux TPC candidats sur explants de peaux humaines. Concernant la reproductibilité des résultats les coefficients de variation (CV%) des peaux non protégées sont d'environ 10-30%, indiquant une bonne reproductibilité des échantillons contrôles. F1 ayant un CV% autour de 50% semble également assez reproductible. A l'inverse les résultats de F2 sont moins reproductibles avec un CV% autour de 90-100%. Les paramètres de cinétique mettent en évidence la pénétration réduite par les deux TPC candidats et également retardée pour F2 (Tableau 5-16). Les ratio E sont du même ordre.

**Figure 5-8 : Efficacité des formules sur peaux humaines.**

(Contrôle = peaux humaines non protégées).

Tableau 5-16 : Efficacité des formules sur peaux humaines. (TPC = 15mg/cm²).

Protection	J _{max} (µg/h)	λ (h)	E
Non protégé (n=5)	7,1±2,8	6,7±2	1
F1 (n=6)	1,4±0,8*	8,2±2,9	8±7* (>4)
F2 (n=6)	1,6±0,9*	10±0,9*	8±2 (>3)

*indique une différence significative avec les peaux non protégées ($p < 0,05$).

E : entre parenthèse est indiquée la plus petite valeur du ratio E calculée.

La Figure 5-9 présente l'accumulation du paraoxon dans les différentes fractions à la fin de l'expérience (milieu récepteur = pénétré, retenu par la peau, dans la crème et en surface).

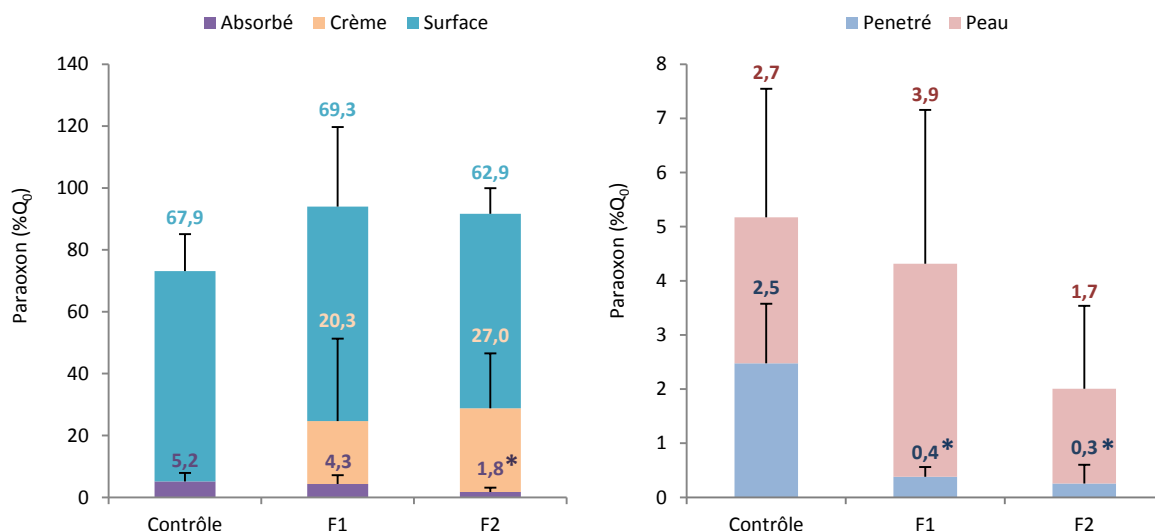


Figure 5-9 : Répartition du paraoxon à la fin de l'expérience (Absorbé = peau + pénétré).

*indique une différence significative ($p < 0,05$) avec les peaux non protégées (contrôle).

Les TPC candidats accumulent beaucoup de paraoxon (~20% dans la fraction « crème »). Le dosage de la quantité de paraoxon stockée dans la crème sur membranes siliconées à 6h a permis de mettre en évidence une différence de stockage dans les crèmes : $1,5 \pm 0,2$ (F1) vs $0,08 \pm 0,02\%Q_0$ (F2) que nous ne retrouvons pas dans le cas des peaux humaines. La capacité d'absorption des crèmes est due aux nanoparticules dont la grande surface active libre permettrait d'accumuler le toxique en surface.

L'observation des fractions « absorbé » (peau + milieu récepteur) permet de mettre en évidence que F2 freine l'absorption du paraoxon par rapport à F1 dont la quantité absorbée est identique au contrôle (Figure 5-9 A). La comparaison des quantités absorbées (fractions « peau » et « pénétré », Figure 5-9 B), montre que F2 freine l'absorption car elle limite l'entrée de paraoxon dans la peau par un facteur 2. Pour les deux TPC candidats, les quantités retrouvées dans le milieu récepteur à 24h est identique et 6 à 8 fois inférieures aux peaux non protégées.

Contrairement aux résultats observés sur membranes pour lesquels F2 semble moins efficace que F1, leur efficacité sur peaux humaines concernant la pénétration dans le milieu récepteur (J_{max} , λ , E et Q_{max}) est identique. De plus, la capacité « réservoir » de la peau dans le cas d'un prétraitement avec F2 est diminuée par rapport à F1. F2 semble donc mieux protéger la peau puisque le paraoxon est moins absorbé dans la peau. Les deux TPC candidats sont donc efficaces vis-à-vis de la pénétration du paraoxon. Il serait intéressant de les comparer à l'efficacité de TPC existants.

2.3. COMPARAISON DES TPC CANDIDATS A DES CREMES PREEXISTANTES

Millérioux *et al.*² ont testé l'efficacité de deux crèmes barrières sur membranes siliconées et oreille de cochon dermatomée : 1 candidat (BCw) et un TPC dont l'efficacité est connue (AG-7 contenant une mixture de polymère perfluorés : 70% PFPE + 30% PTFE⁹⁻¹¹).

Sur membranes siliconées et à quantité appliquées égales seul F1 semble aussi protecteur que l'AG-7 (les ratios E sont du même ordre) (Tableau 5-17). La pénétration semble moins réduite que l'AG-7 ($J_{\max}$ 10 fois plus grand mais surtout très variable) mais plus retardée (λ 2 fois plus grand).

Tableau 5-17: Comparaison de l'efficacité des nouveau TPC à des crèmes existantes (membranes siliconées, TPC=5mg/cm², POX=5mg/cm²).

Protection	Q _{max}	%J _{max}	%λ	E	Conclusion
BCp = AG7	0,039±0,001	1±1	230±81	186	Très protecteur
BCw	3.8±0.7	92±39	95±67	1	Aucune protection
F1	0,3±0,2	10±14	500±133	270	Très protecteur
F2	1,3±1,6	49±52	555±103	23	Protecteur

En comparant les expériences sur peaux de cochon et humaines, nos deux TPC candidats présentent une efficacité bien supérieure à l'AG-7 et à BCw. Ici, c'est la pénétration réduite d'un facteur 5 par rapport aux crèmes AG-7 et BCw qui confère **la meilleure protection de F1 et F2**. Cependant la dose de formule appliquée est trois fois supérieure à celle de BCp et BCw, il faudrait donc tester l'efficacité des formules à 5mg/cm² pour confirmer une efficacité supérieure.

Tableau 5-18: Comparaison de l'efficacité des nouveaux TPC à des crèmes existantes (peaux humaine, POX=5mg/cm²).

Protection	TPC (mg/cm ²)	Explant	%J _{max}	%λ	E	Conclusion
BCp = AG7	5	oreille de porc	70	44	0,6	Aucune protection
BCw	5	oreille de porc	81	142	1,7	Léger effet protecteur
F1	15	peau humaine	19	123	8±7	Protecteur
F2	15	peau humaine	22	148	8±2	Protecteur

2.4. COMPARAISON DES RESULTATS SUR MEMBRANES ARTIFICIELLES ET PEAUX HUMAINES

Nous avons vu dans le chapitre 1 que les résultats pouvaient être impactés par le modèle utilisé. Dans notre étude, nous avons choisi d'intégrer un nouveau modèle par rapport à ceux validés (membranes siliconées)^{1,2} pour le screening des TPC candidats : les membranes Strat-M proposées

par Millipore pour leur similarité en termes de mouillabilité et de pénétration avec la peau humaine. Regardons dans notre étude quel modèle semble le mieux prédire les résultats sur peaux humaines. La comparaison des modèles peut être réalisée par la comparaison des variations de flux maximum et temps de latence par rapport aux valeurs des contrôles ($\%J_{\max(ou \lambda)} = \frac{J_{\max(ou \lambda) \text{ essai}}}{J_{\max(ou \lambda) \text{ membrane non protégé}}} * 100$)

L'étude de F1 ne montre pas de différence significative entre le $\%J_{\max}$ des membranes siliconées et la peau humaine contrairement à Strat-M qui est significativement inférieur. Au contraire les $\%\lambda$ sont significativement supérieurs à celui de la peau humaine.

L'étude de F2 ne montre pas de différence significative entre les $\%J_{\max}$ des membranes artificielles et la peau humaine contrairement aux $\%\lambda$ qui sont significativement supérieurs à celui de la peau humaine.

Tableau 5-19: Comparaison de l'efficacité des nouveaux TPC entre les différents modèles (TPC = 15mg/cm², POX=5mg/cm²).

Protection	Membranes siliconées		Membranes Strat-M		Peau humaine dermatomée	
	$\%J_{\max}$	$\%\lambda$	$\%J_{\max}$	$\%\lambda$	$\%J_{\max}$	$\%\lambda$
F1 (n≥6)	5±7*, ^{ab}	423±200*, ^c	0,2±0,1*, ^a	556±93*, ^c	19±11*, ^b	123±44 ^d
F2 (n=6)	11±11*	646±92*, ^e	22±19*	435±202*, ^f	22±12*	149±13*, ^g

* indique les valeurs de $J_{\max}$ et λ significativement différentes ($p < 0,05$) du contrôle non protégé ; les lettres de a à g signalent une différence significative du même paramètre entre les membranes pour un TPC donné (effet membrane).

En conclusion seule la valeur de $\%J_{\max}$ des membranes Strat-M avec F1 est significativement inférieure à la valeur de la peau humaine. Egalement une surestimation de l'ensemble de valeurs $\%\lambda$ est observée après application des deux TPC candidats par rapport à la peau humaine. Globalement, les **membranes artificielles surestiment l'efficacité** et particulièrement au niveau de l'estimation du temps de latence.

III. CONCLUSION

Dans ce chapitre, les 2 TPC candidats F1 et F2 ont été étudiés en détail vis-à-vis de la pénétration du paraoxon. La comparaison de leur efficacité vis-à-vis de leur base a permis de mettre en évidence l'effet positif et significatif de la présence de nanoparticules de silice (24h et occlusion) et de cérium (dès 6h) dans les formules. Il a également été démontré que l'efficacité de F2 était directement dépendante de la quantité d'actifs contenant des nanoparticules de CeO_2 greffées (efficace dès 1%). En effet, les nanoparticules sont des actifs déjà très utilisés pour la mise au point de nouveaux TPC du fait de leur capacité à dégrader les toxiques¹²⁻¹⁵. Finalement, l'effet positif et synergique de leur greffage au polymère HASE-F-RF8 sur l'efficacité des TPC candidat a été mis en évidence.

L'étude rhéologique (Chapitre 4) a permis de mettre en évidence au cours du vieillissement des formules une évolution du réseau de F1 et une déstabilisation de F2. L'efficacité des formules après 4 semaines à 45°C suit l'évolution rhéologique : F1 qui renforce son réseau perd peu de son efficacité tandis que F2 qui déphase perd totalement sa reproductibilité et son efficacité. La comparaison des deux formules et de leur base a permis de démontrer l'impact significatif du PVP sur l'efficacité du polymère greffé ou non avec de la silice. F1 est très efficace dès 5mg/cm² sur les deux membranes artificielles tandis que F2 semble plutôt très efficace à partir de 15mg/cm². Egalement, dans l'ensemble des conditions (occlusion, 24h) sur membranes artificielles, F1 est presque toujours plus efficace que F2. Une piste à envisager serait donc d'ajouter du PVP dans la formulation de F2 afin d'en augmenter son efficacité et sa stabilité (ingrédient supplémentaire de F1 qui ne se déstabilise pas par rapport à F2).

Cependant, sur peau humaine les formulés montrent la même efficacité. Les membranes artificielles surestiment donc l'efficacité de F1. Nos deux formules semblent également plus efficaces à 15mg/cm² que l'AG-7 à 5mg/cm², un TPC bien connu assez difficile à appliquer (mixture de polymères perfluorés). Il faudrait donc valider l'efficacité des deux TPC candidats à 5mg/cm² sur peau humaine.

La suite de ces travaux serait la suivante : tests sur membranes siliconées et peaux humaines vis-à-vis d'agents chimiques de guerre comme le VX (dont le paraoxon a été choisi comme simulant) et du 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) un simulant de l'Ypérite et vis-à-vis de l'Ypérite elle-même.

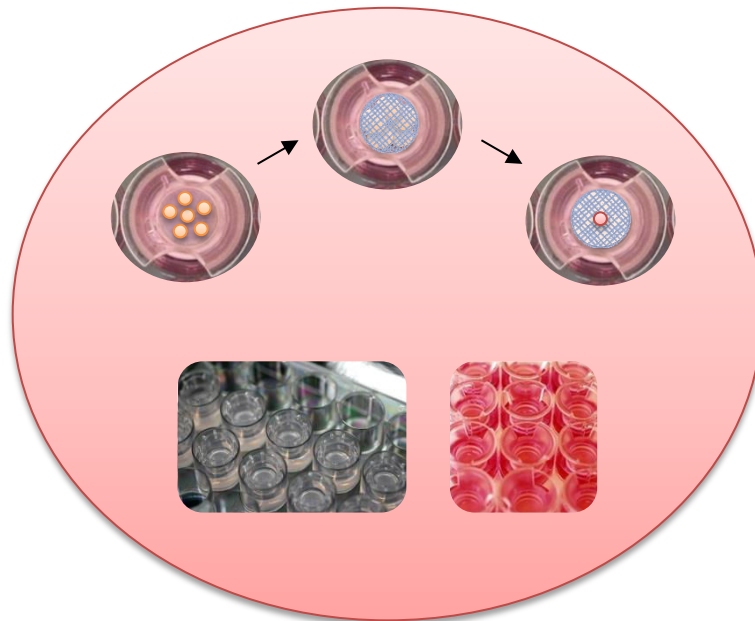
Dans ce chapitre la faible disponibilité des peaux humaines et leur tarif ainsi que l'accès restreint aux peaux de cochons a permis de se poser la question suivante : pourquoi ne pas utiliser des modèles prêt à l'emploi, moins cher que des peaux humaines mais très proche en terme de morphologie et de composition et surtout disponible pour l'évaluation des nouveaux TPC candidats ? Le chapitre suivant décrira la mise au point de ces protocoles utilisant des épidermes humains reconstruits.

Références bibliographiques

1. Millerioux, J. *et al.* In vitro selection and efficacy of topical skin protectants against the nerve agent VX. *Toxicol. Vitro.* **23**, 539–545 (2009).
2. Millerioux, J. *et al.* Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicol. Vitro.* **23**, 127–33 (2009).
3. Lerebour, G., Cupferman, S., Cohen, C. & Bellon-Fontaine, M. N. Comparison of surface free energy between reconstructed human epidermis and in situ human skin. *Ski. Res. Technol.* **6**, 245–249 (2000).
4. Millérioux J. Formulation et évaluation de la stabilité et de l'efficacité de topiques protecteurs vis-à-vis des composés organophosphorés. Thèse de l'Université Lyon 1 (2009).
5. Recommandation de la commission du 22 septembre 2006 relative aux produits de protection solaire et aux allégations des fabricants quant à leur efficacité. *J. Off. l'Union Eur.* 39–43 (2006).
6. Zenerino, A. *et al.* New CeO₂ nanoparticles-based topical formulations for the skin protection against organophosphates. *Toxicol. Rep.* **2**, 1007-1013 (2015).
7. Kadar, T. *et al.* A Topical Skin Protectant against Chemical Warfare Agents. *Isr. Med. Assoc. J.* **5**, 717–719 (2003).
8. Vallet, V. *et al.* Percutaneous penetration and distribution of VX using in vitro pig or human excised skin validation of demeton-S-methyl as adequate simulant for VX skin permeation investigations. *Toxicology* **246**, 73–82 (2008).
9. Chilcott, R. P., Jenner, J., Hotchkiss, S. A. M. & Rice, P. Evaluation of barrier creams against sulphur mustard. I. In vitro studies using human skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **15**, 225–35 (2002).
10. Chilcott, R. P. *et al.* Evaluation of a barrier cream against the chemical warfare agent VX using the domestic white pig. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97**, 35–8 (2005).
11. Chilcott, R. P. *et al.* Evaluation of barrier creams against sulphur mustard: (II) In vivo and in vitro studies using the domestic white pig. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **26**, 235–47 (2007).
12. Hobson, S. T. *et al.* Active topical skin protectants using combinations of reactive nanoparticles and polyoxometalates or metal salts. US Patent 6,410,603 B1 (2002).
13. Hobson, S. T. *et al.* Active topical skin protectants using reactive nanoparticles. US Patent 6,403,653 B1 (2002).
14. Koper, O. & Klabunde, K. J. Reactive nanoparticles as destructive adsorbents for biological and chemical contamination. US Patent WO 01/78506 A1 (2001).
15. Saxena, A., Srivastava, A. K., Singh, B. & Goyal, A. Removal of sulphur mustard, sarin and simulants on impregnated silica nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* **211-212**, 226–232 (2012).

CHAPITRE 6

**Evaluation des épidermes reconstruits comme
modèles cutanés humains pour le screening de
nouveaux TPC candidats**



La fonction barrière de la peau est due à la couche cornée (*stratum corneum*), la couche la plus externe de l'épiderme. Celle-ci doit être intacte pour assurer sa fonction de protection. Comme décrit au Chapitre 1, la peau peut être comparée à un système de brique (les cornéocytes) et de mortier (la matrice extracellulaire lipidique)¹. Les kératinocytes (cornéocytes vivants) sont les cellules composant à 95% l'épiderme. Ceux-ci contiennent des corps lamellaires qui sont responsables de l'excrétion des lipides à l'interface stratum corneum (SC) / stratum granulosum (SG) et ce sont ces lipides qui confèrent une barrière hydrophobe contre les agressions extérieures². Un modèle de pénétration percutanée relevant doit donc avoir des propriétés barrières de la couche cornée similaires à la peau humaine *in vivo*²⁻⁶.

Les modèles de pénétration et d'efficacité actuels (détaillés au Chapitre 1) utilisent le plus souvent des porcs *in vivo* dont la peau est la plus proche de la nôtre ou encore des explants de peaux de cochons ou issus de chirurgie humaine (méthodes *in vitro*)^{5,7}. La mesure de la pénétration percutanée utilisant des explants de peau de cochon montre une très bonne corrélation avec des données *in vitro* sur peau humaine⁷ : la différence de perméabilité entre ces deux modèles pour des molécules lipophiles telles que les organophosphorés n'est en générale pas supérieure à un facteur 2⁸⁻¹². Cependant, l'utilisation des explants nécessite des équipements et un savoir-faire spécifiques pour la préparation des échantillons, le stockage et la mesure de leur intégrité¹³. De plus, les explants de peau humaine sont également très chers. Il serait donc intéressant de mettre au point un modèle proche de la peau humaine mais plus facile et moins cher à mettre en œuvre. C'est pourquoi, dans ce chapitre nous étudions la capacité d'épidermes humains reconstruits (RHE : reconstructed human epidermis) tels que ceux fournis par la société française EpiSkin à mimer la réponse de la peau humaine *in vitro*.

Ces modèles ont les avantages d'être faciles à utiliser, disponibles et d'être d'origine humaine. De plus, ils sont globalement similaires à la peau humaine en termes de morphologie, de composition en lipides (barrière hydrophobe) et de marqueurs de différenciation^{3,4,6,14}. Ils sont actuellement reconnus par l'OCDE comme alternative pertinente à l'utilisation des animaux pour la mesure de la corrosion¹⁵ et de l'irritation cutanée¹⁶. De nombreuses études disponibles dans la littérature évaluent également leur perméabilité, les comparant aux peaux humaines et de cochon *in vitro*¹⁷⁻²³. La conclusion générale est que globalement les RHE surestiment la pénétration cutanée mais qu'ils classifient leur perméabilité vis-à-vis de différentes molécules dans le même ordre : ceux-ci ont donc une fonction barrière moins efficace que la peau humaine et de cochon *in vitro*²⁴.

Les RHE n'ont jamais été utilisés pour mesurer la pénétration des organophosphorés (OP). Les questions que nous nous posons dans ce chapitre sont donc les suivantes :

- Les RHE sont-ils des modèles pertinents pour mesurer la pénétration des organophosphorés et en particulier le paraoxon (POX) ?
- Présentent-ils pour le POX une fonction barrière similaire aux explants de peaux humaines ?
- Sont-ils des modèles d'efficacité pertinents pouvant remplacer l'utilisation de peaux de cochon ou humaines *ex vivo* ?

Le but de ce chapitre est donc d'étudier : (1) la perméabilité des RHE à notre molécule d'intérêt oléophile, le POX ($\log K_{o/w}$ 1.98) et de mettre au point une méthode d'application des TPC candidats en insert et (2) d'évaluer ensuite leur capacité à détecter correctement des crèmes barrières candidates. Il est à noter que ce chapitre constitue un premier travail initial sur RHE.

I. ETUDE 1 : PERMEABILITE DES MODELES RHE

Les tests ont été réalisés en dose finie directement dans les inserts fournis par la société EpiSkin. La perméabilité de ces modèles à une molécule standard et amphiphile : la caféine ($\log K_{o/w}$ -0.01)¹³ est premièrement étudiée. En effet, la perméabilité à la caféine a été largement étudiée et les résultats dépendent généralement du type de peau (entière ou non), de la préparation (dermatomée ou séparée thermiquement) et du site anatomique (dos, oreille, abdominal). La perméabilité des RHE vis-à-vis de la caféine dépend de la dose appliquée (concentration et volume) et de la composition du liquide récepteur (solution aqueuse, $\pm$ éthanol, $\pm$ sérum bovin, etc.). La conclusion des études est que globalement les RHE sont 10 à 200 fois plus perméable que les peaux humaines et de cochon *ex vivo*.^{17,19,20,22,23,25} Concernant le paraoxon, les peaux *in vitro* dermatomées humaines (abdominales) et de cochon (oreilles) sont faiblement perméables^{9,26}.

La Figure 6-1 représente le schéma du modèle de pénétration utilisant les RHE. Les RHE sont utilisés directement en insert comme décrit par Grégoire *et al.*²⁵. Le milieu récepteur (MR) choisi est l'HBSS afin de limiter le métabolisme des molécules par la peau. Les études de perméabilité vis-à-vis de la caféine constituent les premières expériences de pénétration. Le dosage de la caféine étant réalisé par un laboratoire partenaire, il n'a pas été possible de reproduire exactement le même protocole entre les deux molécules. En effet, le protocole concernant les études de perméabilité du paraoxon est un protocole optimisé. Le protocole est disponible en annexe 6.1., les grandes différences sont détaillées ci-dessous :

- La caféine est testée à 1% dans l'eau et appliquée à 100 μ g/cm², les conditions sont occlusives pour éviter l'évaporation du compartiment donneur et le séchage de la caféine en surface. Le

protocole d'échantillonnage est de 300µL durant 24h. Les épidermes RHE 4cm² (MR = 3mL) et Episkin 1,07cm² (MR = 2mL) sont utilisés pour cette expérience.

- Le paraoxon est testé pur et appliqué à 5mg/cm², les conditions sont non-occlusives. Le protocole d'échantillonnage est un renouvellement total du milieu durant 24h. Les épidermes RHE 0,5cm² (MR = 0,5mL) et Episkin 1,07cm² (MR = 2mL) sont utilisés pour cette expérience.

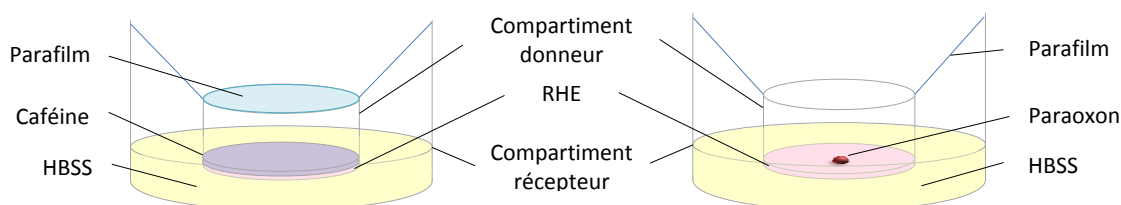


Figure 6-1 : Composition du modèle de pénétration pour les épidermes humains reconstruits.

L'utilisation des RHE pour évaluer l'efficacité de nouveaux TPC candidats nécessite également une mise au point de la méthode d'étalement afin de réaliser un film homogène et filmogène protecteur en surface des épidermes. L'utilisation de la méthode d'étalement à la spatule en silicone n'est pas possible et la méthode du doigt de gant est difficile du fait de la petite taille des épidermes. Des mèches en nylon sont proposées pour permettre le contact complet des formules avec les épidermes pour les tests d'irritation cutanée. Il serait donc intéressant d'utiliser ces mèches pour étaler de manière homogène les TPC candidats en surface des épidermes.

Ce chapitre étudiera donc dans un premier temps la perméabilité des épidermes à la caféine et au paraoxon puis se concentrera sur l'effet des mèches sur la pénétration du paraoxon.

1.1. PERMEABILITE DES EPIDERMES A LA CAFEINE

La Figure 6-2 montre que les deux types de RHE sont très perméables à la caféine. En effet, le flux maximum est atteint en moins de 30min et représente $33 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ pour EpiSkin et $68 \pm 18 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ pour SkinEthic (Tableau 6-1). De plus, à partir de 4h, la pénétration atteint un plateau maximum pour les deux modèles : respectivement 75 and 89%Q₀. A 24h, le taux cumulé de caféine est respectivement 84 et 91%Q₀. Le modèle SkinEthic montre donc une perméabilité supérieure au modèle EpiSkin. Les modèles de peaux n'ont pas la capacité à retenir la caféine qui est une molécules amphiphile, c'est pourquoi elle n'a pas été dosée dans la peau^{22,23}.

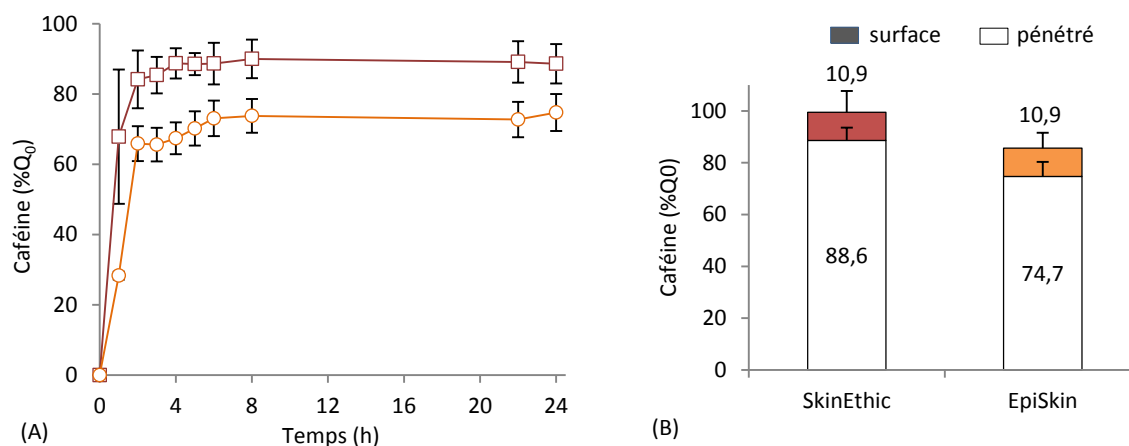


Figure 6-2 : Perméabilité des RHE à la caféine.

(A) Cinétique de pénétration : SkinEthic (□, n=6), EpiSkin (○, n=6) et (B) répartition à 24h.

Tableau 6-1 : Pénétration de la caféine.

Paramètres	SkinEthic 4cm ²	Episkin 1,07cm ²
λ (min)	<0,6*	2,4±1,8*
$J_{\max}$ (μg/cm ² /h)	68±18*	33±3*

* indique une différence significative entre les modèles ($p < 0,05$).

La comparaison de nos résultats avec la littérature permet de confirmer leur corrélation. Les études de Schreiber *et al.*¹⁸ et de Schäfer-Korting *et al.*²⁰ ont déterminé des temps de latence de 0h et 0,2±0,2h pour le modèle SkinEthic similaire à nos résultats. Pour le modèle EpiSkin, les pénétrations à 4h (67,4±4,5 %Q₀) and 24h (74,7±5,2 %Q₀) sont respectivement similaires aux résultats publiés par Grégoire *et al.*²⁵ (61,0±3,2 %Q₀) et Dreher *et al.*²² (72,4±15,6 %Q₀). Egalement, il a été démontré que le modèle SkinEthic est plus perméable à la caféine que le modèle Episkin^{20,23}, ceci est en corrélation avec nos résultats pour lesquels le flux maximum de SkinEthic est 2 fois plus élevé que EpiSkin. Nos résultats semblent donc en accord avec la littérature, ce protocole est donc validé.

1.2. PERMEABILITE DES EPIDERMES AU PARAOXON

Les deux modèles d'épidermes reconstruits (SkinEthic et EpiSkin) semblent faiblement perméables au paraoxon puisque moins de 3%Q₀ pénètrent dans le milieu récepteur pour SkinEthic et 0,02%Q₀ pour Episkin (Figure 6-3). Le flux maximum est atteint après 1h pour SkinEthic et 5h pour EpiSkin et représente respectivement 8μg/cm²/h et moins de 0,1μg/cm²/h (Tableau 6-2). Comparé à la caféine, les RHE sont 8,5 (SkinEthic) et 500 (EpiSkin) fois moins perméables au paraoxon. Les RHE sont donc, comme les explants de peaux de cochon et humaines, très faiblement perméables au

paraoxon^{9,26}. De plus comme pour la caféine, le modèle SkinEthic ($Q_{\max} = 2,5 \pm 0,7\%Q_0$) semble plus perméable au paraoxon que le modèle EpiSkin ($Q_{\max} = 0,02 \pm 0,01\%Q_0$) dans ces conditions de tests. Cependant, compte tenu que le paraoxon est appliqué pur et à faible dose ($5\text{mg}/\text{cm}^2$), la surface effective d'exposition n'est pas comme dans le cas de la caféine la surface de l'épiderme (i.e. respectivement $0,5\text{cm}^2$ et $1,07\text{cm}^2$ pour SkinEthic et EpiSkin) mais correspond à la surface d'étalement de la goutte de paraoxon. Celle-ci est donc dépendante des propriétés de la membrane (i.e. de l'épiderme). En l'occurrence, EpiSkin et SkinEthic présentent des propriétés de mouillabilité différentes. Les premières mesures ($1\mu\text{L}$ de liquide sonde, méthode du goniomètre en annexe) ont montrés les angles de contact suivants à l'huile d'olive (simulant du paraoxon²⁶) : $47,2 \pm 0,3^\circ$ pour EpiSkin et $18,6^\circ$ (1 mesure) pour SkinEthic. EpiSkin est donc moins oléophile que SkinEthic. Ainsi, la goutte de paraoxon (oléophile) s'étalera donc moins bien sur le modèle EpiSkin que sur le modèle SkinEthic. La grande différence de perméabilité entre les deux modèles de RHE peut donc être expliquée, en plus de la différence de fonction barrière connue entre ces deux modèles pour d'autres molécules lipophiles^{18,20,23}, par la différence de surface effective d'exposition qui est sûrement plus faible dans le cas d'EpiSkin.

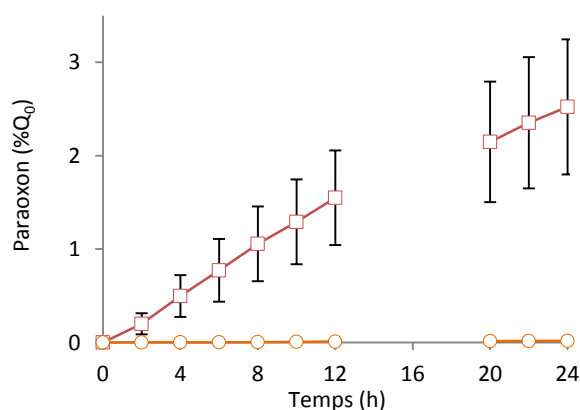


Figure 6-3 : Perméabilité des RHE au paraoxon.

SkinEthic (□, n=6), EpiSkin (○, n=3).

Tableau 6-2 : Pénétration du paraoxon.

Paramètres	SkinEthic 0,5cm ²	EpiSkin 1,07cm ²
λ (h)	0,9±0,8*	5,8±0,3*
$J_{\max}$ (µg/h/cm ²)	7,6±1,8*	0,07±0,04*

* indique une différence significative entre les modèles ($p < 0,05$).

Les RHE sont généralement plus perméables que les explants de peau humaine et de cochon avec un facteur de différence compris entre 3 et 45 (comparant les P_{app} en cm/s : P_{app} (peau testée) / P_{app} (peau de référence)) pour une large gamme de molécules hydrophiles et lipophiles comme la caféine, l'acide benzoïque, la testostérone, le clotrimazole, etc.²⁰. Les expériences sur peaux humaines dermatomées réalisées dans le Chapitre 5 donnent les résultats suivants : $J_{\max}$ de $6,3 \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (surface d'exposition = $1,13\text{cm}^2$), λ de $6,7 \pm 2\text{h}$, $Q_{\max}$ de $2,5 \pm 1,1\%Q_0$ et un pourcentage stocké dans la peau de $2,7 \pm 2,4\%Q_0$. Ici, contrairement aux données de la littérature, SkinEthic a un $J_{\max}$ globalement similaire aux peaux humaines et EpiSkin un $J_{\max}$ diminué par un facteur 90, λ est diminué par un facteur 4 uniquement pour SkinEthic et EpiSkin présente le même

temps de latence. Nous pouvons calculer un facteur de différence (FD) entre les RHE et les explants de peaux humaines de la manière suivante en prenant en compte à la fois le flux maximum et le temps de latence (équation 8):

$$FD = \frac{\lambda(RHE)}{\lambda(peau\ de\ référence)} \bigg/ \frac{J_{max}(RHE)}{J_{max}(peau\ de\ référence)} \quad (eq. 8)$$

Tableau 6-3 : Facteur de différence entre les RHE et explants de peau humaine.

RHE	FD Peau humaine
SkinEthic	0,1
EpiSkin	78

Plus le FD est petit plus le modèle surestime la pénétration et plus le FD est grand plus le modèle sous-estime la pénétration par rapport à la peau de référence (peau humaine). Selon les FD calculés (Tableau 6-3), SkinEthic semble donc surestimer la pénétration du paraoxon et EpiSkin la sous-estimer largement.

Au regard de la quantification du paraoxon dans chaque compartiment (Figure 6-4), SkinEthic est similaire à la peau humaine (Absorbée = $5,2 \pm 2,7\%Q_0$, Peau = $2,7 \pm 2,4\%Q_0$ et Pénétré = $2,5 \pm 1,1\%Q_0$) tandis que EpiSkin sous-estime largement la pénétration : la quantité absorbée (peau + pénétré) est 4 fois moins important pour EpiSkin que pour la peau humaine. La quantification du paraoxon ayant pénétré le modèle EpiSkin (MR + support en collagène) montre que le support retient un peu de paraoxon puisque $0,07 \pm 0,03\%Q_0$ est contenu dans le support et $0,02 \pm 0,01\%Q_0$ dans le MR. Lotte *et al.*²³ ont montré que le support en collagène du modèle EpiSkin influence la pénétration des molécules très lipophiles (à 24h seulement 20% de l'acide laurique a pénétré le support sans épiderme) contrairement à la membrane en nylon du modèle SkinEthic. Cependant, le grand FD entre EpiSkin et peau humaine ne peut être expliqué par la seule présence du support en collagène.

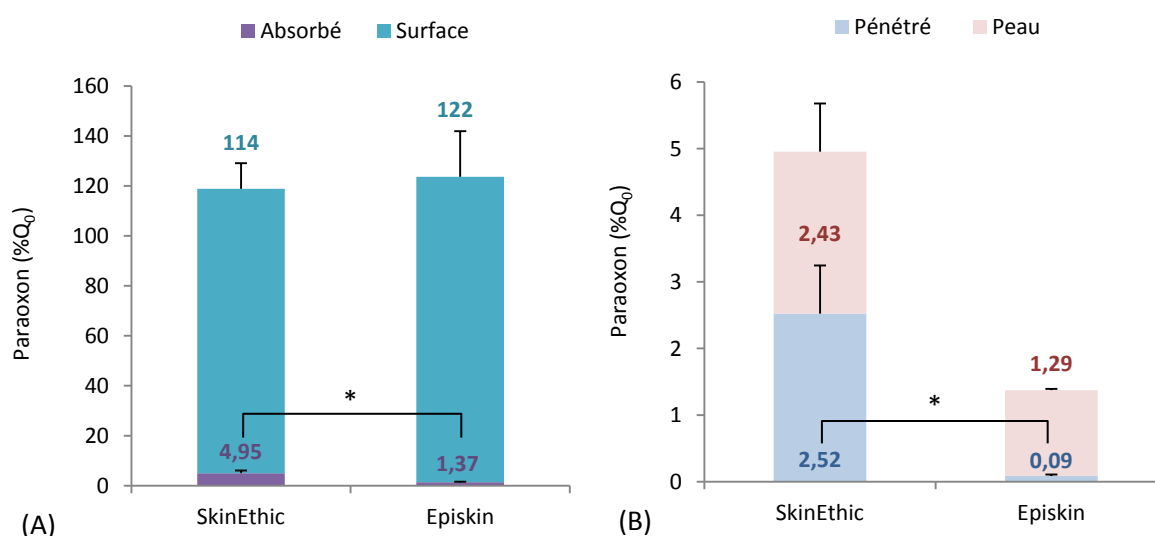


Figure 6-4 : Répartition du paraoxon à 24h.

(Absorbé = Peau + Pénétré ; Pénétré = MR pour SkinEthic et MR + support en collagène pour EpiSkin). *indique une différence significative entre les modèles ($p < 0,05$).

La **fonction barrière** de la peau étant conférée par la couche cornée, ces résultats suggèrent que le modèle EpiSkin présente une couche cornée modifiée par rapport à la peau humaine. Quelques auteurs ont étudié en détail la composition et la morphologie des modèles RHE^{3,6}. Ils concluent que les modèles ont la même morphologie en terme de couche épidermique mais présentent des différences dans l'épaisseur (~40-50µm vs ~85 µm pour les épidermes humains *in vivo*). Il apparaît également que la composition du mortier lipidique joue un rôle crucial dans la fonction barrière^{1,2} et peut être différent entre les épidermes *in vivo* et reconstruits. Plus spécifiquement, des études ont mis en évidence un retard ou une perturbation de l'extrusion des corps lamellaires à l'interface SC/SG ce qui pourrait impacter la composition du mortier lipidique et ainsi la perméabilité des modèles^{3,6}. Egalement, la comparaison des angles de contact de la peau humaine à l'eau ($88,3 \pm 14,3^\circ$) et à l'huile ($13,2 \pm 15,7^\circ$) à ceux des RHE SkinEthic ($\theta_{\text{eau}} = 80,6 \pm 4,1^\circ$; $\theta_{\text{huile}} = 18,6^\circ$) et EpiSkin ($\theta_{\text{eau}} = 61,5 \pm 3,5^\circ$; $\theta_{\text{huile}} = 47,2 \pm 0,3^\circ$) montrent que le modèle SkinEthic a une **mouillabilité** similaire à la peau humaine tandis que le modèle EpiSkin est plus hydrophile mais surtout plus oléophobe. La surface effective d'exposition au paraoxon est donc réduite dans le cas d'EpiSkin par rapport à la peau humaine. Ces différences de mouillabilité permettent donc d'expliquer le défaut d'EpiSkin à estimer la perméabilité de la peau humaine au paraoxon. En effet, plus qu'un défaut de fonction barrière du modèle, c'est une différence de **surface effective d'exposition** qui permettrait d'expliquer les résultats surprenants concernant la très faible perméabilité du modèle EpiSkin au paraoxon par rapport à la peau humaine. Un autre phénomène pourrait également permettre d'expliquer la très faible perméabilité du modèle EpiSkin : la **métabolisation**. En effet, la peau étant donnée sa surface (1,8m²) peut être considérée comme un véritable organe extra-hépatique²⁷. Les estérases présentes dans la peau ont la capacité de métaboliser le paraoxon (paraoxonase, PON1, etc.)²⁸. Une différence de composition en ces enzymes par rapport à la peau humaine et le modèle SkinEthic pourrait donc expliquer la sous-estimation de la pénétration du paraoxon au travers du modèle EpiSkin. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la composition en estérase du modèle EpiSkin²⁷. L'ensemble des données concernant les différents modèles RHE concluent qu'ils sont globalement capables de prédire l'activité des estérases d'une peau humaine excisée car ils présentent la même activité en estérase^{27,29-32}. Cependant, l'inactivation thermique de ces enzymes³³ avant expérience permettrait de pallier cette éventualité.

En conclusion parmi les deux modèles, le modèle SkinEthic semble être le plus proche de la peau humaine *in vitro* en termes de mouillabilité et de perméabilité.

1.3. EFFET DES MÈCHES SUR LA PÉNÉTRATION DU PARAOXON

Les mèches ont été choisies pour étaler de manière homogène les topiques protecteurs à tester en surface des épidermes. Il est donc nécessaire de mesurer leur impact sur la pénétration du paraoxon au travers des deux modèles RHE.

L'application des mèches augmente la pénétration du paraoxon : $Q_{\max}$ passe respectivement de $2,5 \pm 0,7$ à $8 \pm 1\%Q_0$ et de $0,02 \pm 0,01$ à $0,05 \pm 0,01\%Q_0$ (Figure 6-5) pour SkinEthic et EpiSkin et le flux maximum est respectivement augmenté d'un facteur 3 et 2 (Tableau 6-4). L'utilisation des mèches modifie complètement la mouillabilité de surface du paraoxon : tandis qu'elle est restreinte sans mèches (le paraoxon forme une goutte à la surface des épidermes,,), le paraoxon est complètement étalé à la surface des épidermes grâce aux mèches (Figure 6-6). Cette modification de mouillabilité permettant une plus grande surface effective de contact entre le paraoxon et les épidermes est sûrement à l'origine de l'augmentation de la perméabilité des modèles RHE.

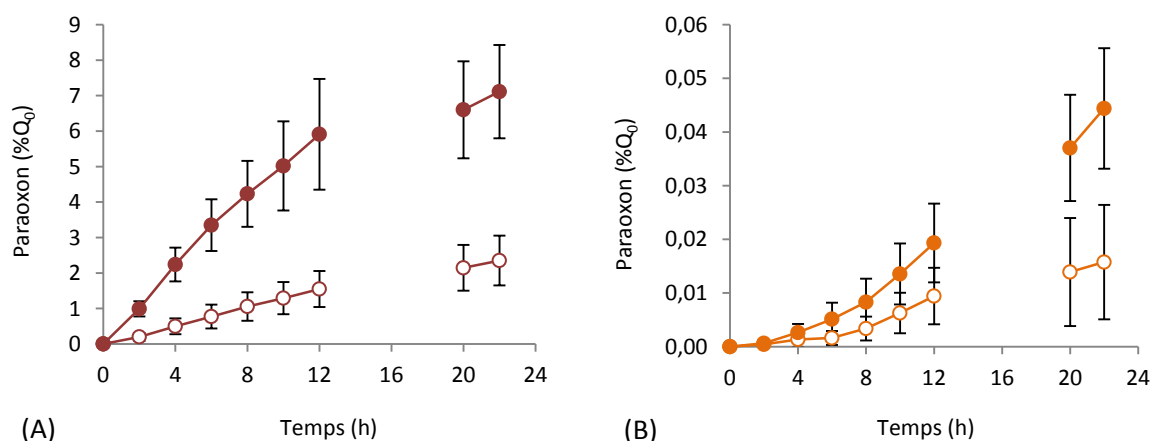


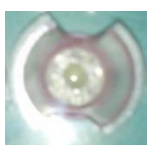
Figure 6-5 : Effet des mèches sur la pénétration du paraoxon au travers des modèles RHE SkinEthic (A) et EpiSkin (B).
Mesh (●, n=6), Sans mesh (○, n≥3).

Tableau 6-4 : Effet des mèches sur la pénétration du paraoxon.

RHE	SkinEthic		EpiSkin	
Mèches	-	+	-	+
λ (h)	0,9±0,8	0,1±0,2	5,8±0,3	4,8±1,5
$J_{\max}$ (µg/cm ² /h)	7,6±3,6	24,2±7*	0,07±0,04	0,13±0,03*
FD/humain	0,1	0,004	78	35

* indique une différence significative par rapport au contrôle sans mèches ($p < 0,05$).

Sans mèche



Avec mèche



Figure 6-6 : Effet des mèches sur la mouillabilité du paraoxon.

L'utilisation des mèches augmente également la quantité de paraoxon absorbée par la peau par un facteur 3 à 4 et stockée dans la peau par un facteur 2,5 à 3,5 (Figure 6-7). Le support en collagène de EpiSkin semble ici également stocker du paraoxon influençant la perméabilité du modèle : support = $0,7 \pm 1,1\%Q_0$ vs MR = $0,05 \pm 0,01\%Q_0$ (Figure 6-7). Cependant, même en prenant en compte ce qui passe l'épiderme et est stocké par le support, la pénétration du modèle EpiSkin avec les mèches est sous-estimée par rapport à la peau humaine (Pénétré = $2,5 \pm 1,1\%Q_0$).

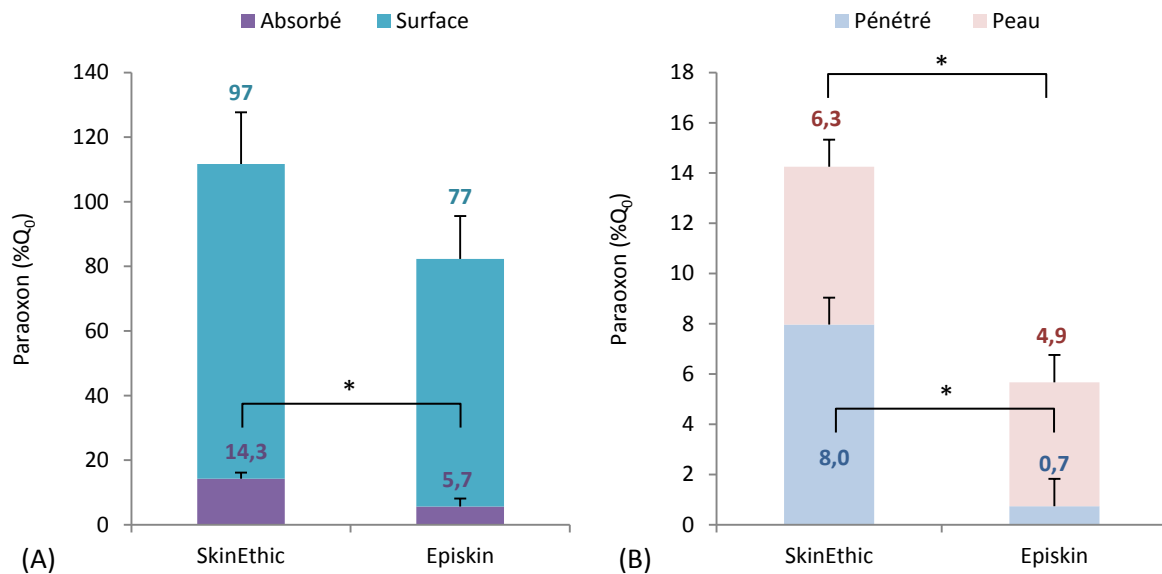


Figure 6-7 : Effet des mèches sur la répartition du paraoxon à 24h.

(Absorbé = Peau + Pénétré ; Pénétré = MR pour SkinEthic et MR + support en collagène pour EpiSkin). *indique une différence significative entre les modèles ($p < 0,05$).

Au regard de la quantification dans chaque compartiment et des flux maximums et temps de latence (calcul des FD) SkinEthic surestime la pénétration du paraoxon d'un facteur 250 (surtout dû au très faible λ) et EpiSkin la sous-estime d'un facteur 35 (surtout dû au faible $J_{\max}$). Seule, la comparaison des fractions « Absorbé » à 24h permet de dire qu'EpiSkin avec l'utilisation de mèches ($5,7 \pm 2,5\%Q_0$) semble être plus proche de la peau humaine ($5,2 \pm 2,7\%Q_0$). Cependant, le modèle *in vitro* semble retenir deux fois plus le paraoxon dans la peau ($4,9 \pm 1,7\%Q_0$) que la peau humaine ($2,7 \pm 2,4\%Q_0$).

L'utilisation des mèches ne garantit pas une surface de contact égale à la surface de l'épiderme testée (i.e. $1,07\text{cm}^2$ pour EpiSkin). En effet, si les mèches sont en contact direct avec l'épiderme la surface de contact du paraoxon est donc réduite de la surface des mèches. De plus, si la molécule testée a une forte affinité pour la mèche en nylon, le coefficient de partage (K_m) sera modifié. Ainsi, parmi les deux modèles avec et sans mèches, le modèle le plus pertinent est SkinEthic sans mèches (même mouillabilité et faible sur-estimation). Avec l'utilisation des mèches, le modèle SkinEthic

surestime trop la pénétration du paraoxon. Cependant, **le modèle EpiSkin est choisi pour les premières expériences d'efficacité** car il est plus pratique à mettre en œuvre (insert en suspension permettant de mieux protéger le milieu récepteur de son évaporation et surface d'application plus grande).

II. ETUDE 2 : CAPACITE DU MODELE EPIKIN A IDENTIFIER DES TPC CANDIDATS

Les premières expériences permettant d'étudier la capacité des RHE à identifier des nouveaux TPC candidats n'ont pu être réalisées que sur le modèle EpiSkin 1,07cm². Les mèches sont utilisées pour évaluer l'efficacité des TPC candidats suivants : BarrieDerm (contrôle négatif), les deux formules sélectionnées dans le Chapitre 5 (F1 et F2) et DermostyX (nom commercial de l'IB-1), un TPC efficace³⁴. La dose de TPC est fixée à 15mg/cm² (même dose que pour l'essai sur peaux humaines). Les TPC sont appliqués selon la Figure 6-8 suivante, séchés 2h sur le bain à 37°C avant application du paraoxon (5mg/cm²).

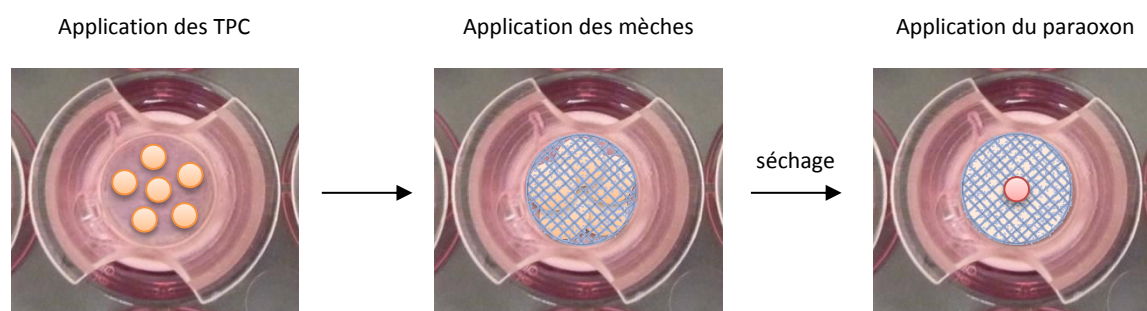


Figure 6-8 : Protocole application des TPC candidats et du paraoxon.

L'ensemble des formules testées semble augmenter la pénétration du paraoxon au travers des épidermes (Figure 6-9). DermostyX et F2 augmente significativement le flux maximum par des facteurs respectivement de 123 et 252 (Tableau 6-5). La faible reproductibilité de BarrieDerm et F1 ne permet pas de conclure de manière significative que la pénétration augmente mais il apparait clairement que ces deux crèmes n'ont aucun effet protecteur. L'étude sur peaux humaine a pourtant validé F1 et F2 comme efficace vis-à-vis de la pénétration du paraoxon. Ainsi, nos deux TPC candidats F1 et F2 et DermostyX un TPC efficace appliqués à l'aide de mèches sur les épidermes EpiSkin 1,07cm² ne permettent pas de diminuer la pénétration du paraoxon au même titre que le contrôle négatif BarrieDerm.

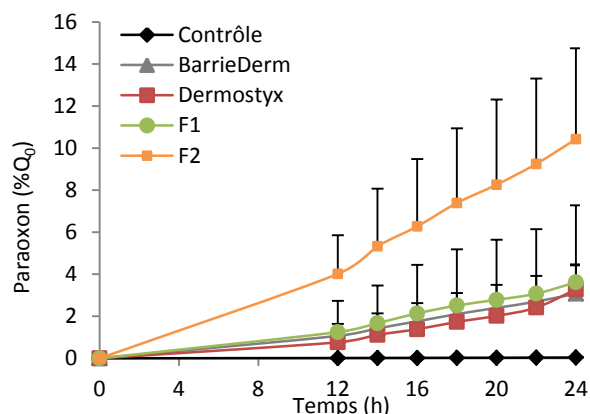


Figure 6-9 : Pénétration du paraoxon aux travers des crèmes sur EpiSkin 1,07cm² (n=6).

Tableau 6-5 : Effet des formules sur la perméabilité des RHE EpiSkin.

TPC	$J_{\max}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	λ (h)
Contrôle	0,10±0,05	7,1±3,8
BarrieDerm	12,7±10,1	9,4±3,7
Dermostyx	7,8±3,3*	6,3±2
F1	10,2±10,2	7,1±2,3
F2	26,0±10,6*	3,8±2,8

* indique une différence significative avec le contrôle non protégé ($p < 0,05$).

L'utilisation des mèches ne semble donc pas être un moyen pertinent d'évaluer l'efficacité de TPC sur EpiSkin. Deux hypothèses peuvent être établies :

- (1) Les mèches écrasent les TPC et forment des points de contact privilégiés entre l'épiderme et le paraoxon favorisant ainsi sa pénétration.
- (2) La mouillabilité étant modifiée, le paraoxon s'étale mieux en surface et rejoint le pourtour de l'épiderme qui est une zone de passage privilégié car plus perméable sur les bords de l'insert²⁵.

Afin de voir l'impact des mèches sur l'efficacité des crèmes, une expérience de pénétration avec mèches sur membranes siliconées protégées ou non a été réalisée avec les TPC Dermostyx et F1.

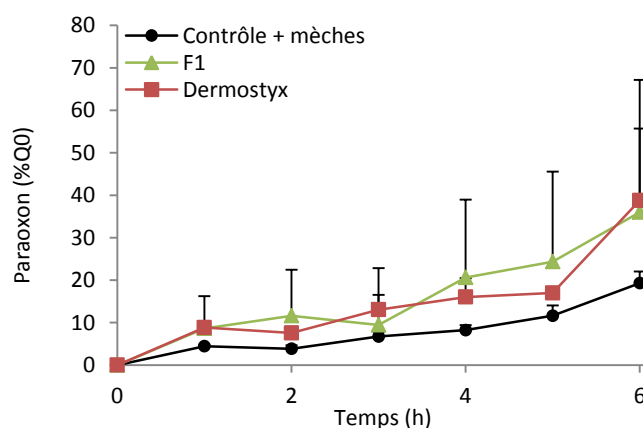


Figure 6-10 : Pénétration du paraoxon aux travers des TPC + mèches sur membranes siliconées (n=3, 15mg/cm²).

La Figure 6-10 montre clairement que F1 et Dermostyx appliqués à l'aide des mèches sur membranes siliconées n'ont aucun effet protecteur. Les mèches augmentent d'un facteur 6 la pénétration du paraoxon sur membranes siliconées tout comme sur RHE (Tableau 6-6). Dermostyx,

un TPC efficace connu, n'est pas identifié comme protecteur sur membranes siliconées avec les mèches. De plus, F1 perd totalement son efficacité (pénétration augmentée d'un facteur supérieur à 100) mais également sa reproductibilité ($CV\%_{(J_{\max})} = 88\%$). **Les mèches perturbent donc bien l'efficacité des topiques et ne sont pas une bonne méthode d'application des TPC candidats en surface des RHE.**

Tableau 6-6 : Effet des mèches sur la protection des formules ($15\text{mg}/\text{cm}^2$).

TPC	mèches	$J_{\max}$ ($\mu\text{g}/\text{h}$)	λ (min)	E
Contrôle	-	55 ± 13	40 ± 10	-
	+	313 ± 44	159 ± 3	-
DermostyX	-	-	-	protecteur
	+	442 ± 220	70 ± 31	$0,30 \pm 0,03$
F1	-	3 ± 4	170 ± 80	$194 \pm 226 (>49)$
	+	443 ± 393	90 ± 53	$0,3 \pm 0,2$

III. CONCLUSION

Le but de ce chapitre était d'évaluer la capacité d'épidermes artificiels à mimer la réponse *in vitro* de la peau humaine concernant la perméabilité vis-à-vis du paraoxon et l'efficacité des TPC candidats.

La première partie de ce chapitre a montré que les épidermes EpiSkin $1,07\text{cm}^2$ sous-estiment largement la pénétration du paraoxon. Cette faible perméabilité peut être expliquée, en plus d'une fonction barrière modifiée, par une modification de surface (propriétés de mouillabilité différentes) qui réduit la surface effective d'exposition au paraoxon par rapport aux modèles SkinEthic et de peaux humaines. Le modèle SkinEthic $0,5\text{cm}^2$ surestime légèrement la pénétration et semble donc le plus proche de la peau humaine *in vitro* en terme de mouillabilité et perméabilité. L'application de mèches en surface des épidermes avant dépôt du paraoxon modifie la mouillabilité des épidermes et augmente leur perméabilité. Ainsi SkinEthic/mèches surestime bien plus la pénétration et EpiSkin/mèches se rapproche plus de la réponse de la peau humaine.

La deuxième partie de ce chapitre a montré que l'application de TPC à l'aide des mèches en surface des EpiSkin ne permet pas d'identifier correctement F1, F2 et DermostyX (IB-1) comme protecteur. L'étude de l'effet des mèches sur membranes siliconée a démontré que l'application de formules à l'aide des mèches n'est pas un moyen pertinent d'étaler et d'évaluer l'efficacité de TPC candidats.

Ce chapitre constitue donc un début d'étude de la capacité des RHE à être utilisés en tant que modèle d'efficacité alternatif aux peaux humaines et de cochon pour le screening de nouveaux TPC

candidats. En effet, ceux-ci présentent les avantages d'être moins variables que les explants du fait de leur procédé de fabrication leur donnant une faible variabilité intra-lot^{20,23}, d'être prêt à l'emploi, facile à utiliser et d'être disponibles.

Ces modèles sont donc intéressants, il serait nécessaire de compléter cette étude :

(1) Un autre moyen que les mèches pourrait être mis au point pour l'application des TPC. Par exemple, un outil qui s'adapterait parfaitement aux bords en cônes de l'insert EpiSkin permettrait de laisser une épaisseur correspondante à la dose choisie (par exemple 15mg/cm²) (Figure 6-11). Le téflon serait choisi car il présente des propriétés d'anti-adhésion.

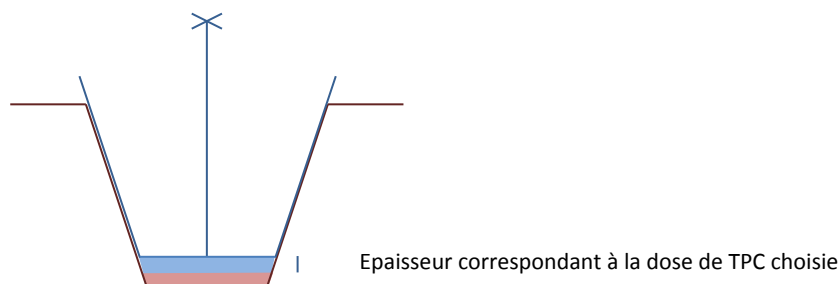


Figure 6-11 : Schéma de l'outil application alternatif aux mèches pour EpiSkin.

(2) Le modèle SkinEthic 0,5cm², plus proche de la peau humaine en termes de perméabilité au paraoxon n'a pas pu être évalué pour l'efficacité avec les mèches, il serait donc intéressant dans un premier temps de vérifier si les mèches ont le même impact sur l'efficacité des formules protectrices que pour le modèle EpiSkin 1,07cm² et les membranes siliconées. Les épidermes RHE de 4cm² étant suffisamment grand pour mettre au point une autre méthode d'étalement, ils pourraient également être utilisés sans mèches. Leur tarif est de 150€, ils sont donc toujours moins cher qu'un explant de peau humaine de 2cm² (275€).

Référence bibliographiques

1. Zhai, H., Wilhelm, K.-P. & Maibach, H. I. *Dermatoxicology*. (CRC Press, 2007).
2. Chilcott, R. P. & Price, S. *Principles and Practice of Skin Toxicology*. (John Wiley and Sons, Ltd, 2008).
3. Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P. W. & Schaefer, U. F. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 167–78 (2005).
4. Poncet, M. *et al.* Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int. J. Pharm.* **203**, 211–225 (2000).
5. Liu, Y. *et al.* Light Microscopic , Electron Microscopic , and Immunohistochemical Comparison of Bama Minipig (*Sus scrofa domestica*) and Human Skin. **60**, 142–148 (2010).
6. Poncet, M., Boelsma, E., Gibbs, S. & Mommaas, M. Characterization of Reconstructed Skin Models. *Skin Pharmacol. Physiol.* **15**, 4–17 (2002).
7. Barbero, A. M. & Frasch, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol. Vitro.* **23**, 1–13 (2009).
8. Vallet, V. *et al.* In vitro percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin. *Toxicol. Vitro.* **21**, 1182–90 (2007).
9. Vallet, V. *et al.* Percutaneous penetration and distribution of VX using in vitro pig or human excised skin validation of demeton-S-methyl as adequate simulant for VX skin permeation investigations. *Toxicology* **246**, 73–82 (2008).
10. Boudry, I. *et al.* Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models in vitro and human skin grafted onto nude mouse skin model in vivo. *J. Appl. Toxicol.* **28**, 645–57 (2007).
11. Capt, A., Luzy, A. P., Esdaile, D. & Blanck, O. Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with in vivo and in vitro models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **47**, 274–87 (2007).
12. Dalton, C. H., Hattersley, I. J., Rutter, S. J. & Chilcott, R. P. Absorption of the nerve agent VX (O-ethyl-S-[2(di-isopropylamino)ethyl] methyl phosphonothioate) through pig, human and guinea pig skin in vitro. *Toxicol. Vitro.* **20**, 1532–6 (2006).
13. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. OECD series on testing and assessment. Number 28. (2004).
14. Tfayli, A., Piot, O., Draux, F., Pitre, F. & Manfait, M. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin. *Biopolymers* **87**, 261–274 (2007).

15. Guideline for the testing of chemicals: skin corrosion: in vitro method (n°431). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2004).
16. Guideline for the testing of chemicals. In vitro skin irritation : Reconstructed Human Epidermis test method (n°439). *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Paris* (2010).
17. Netzlaff, F. *et al.* Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 127–34 (2007).
18. Schreiber, S. *et al.* Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicol. Vitro.* **19**, 813–22 (2005).
19. Doucet, O., Garcia, N. & Zastrow, L. Skin culture model: a possible alternative to the use of excised human skin for assessing in vitro percutaneous absorption. *Toxicol. Vitro.* **12**, 423–30 (1998).
20. Schäfer-Korting, M. *et al.* The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *ATLA* **36**, 161–87 (2008).
21. Schmook, F. P., Meingassner, J. G. & Billich, a. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* **215**, 51–6 (2001).
22. Dreher, F. *et al.* Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparation containing caffeine and a-tocopherol applied on human skin models or human skin ex vivo at finite doses. *Skin Pharmacol. Physiol.* **15**, 40–58 (2002).
23. Lotte, C., Patouillet, C., Zanini, M., Messenger, a. & Roguet, R. Permeation and Skin Absorption: Reproducibility of Various Industrial Reconstructed Human Skin Models. *Skin Pharmacol. Physiol.* **15**, 18–30 (2002).
24. Godin, B. & Touitou, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1152–61 (2007).
25. Grégoire, S. *et al.* Improvement of the experimental setup for skin absorption screening studies with reconstructed skin EPISKIN. *Skin Pharmacol. Physiol.* **21**, 89–97 (2008).
26. Millerioux, J. *et al.* Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicol. Vitro.* **23**, 127–33 (2009).
27. Eilstein, J. *et al.* Comparison of xenobiotic metabolizing enzyme activities in ex vivo human skin and reconstructed human skin models from SkinEthic. *Arch. Toxicol.* 1681–1694 (2014). doi:10.1007/s00204-014-1218-6
28. Jokanovic, M. *Chapter 52: Metabolism of Warfare Nerve Agents. From the Handbook of Chemical Warfare agents.* (2009).
29. Eilstein, J. *et al.* Xenobiotic metabolizing enzymes in human skin and SkinEthic reconstructed human skin models. *Exp. Dermatol.* **24**, 547–549 (2015).

30. Tokudome, Y., Katayanagi, M. & Hashimoto, F. Esterase Activity and Intracellular Localization in Reconstructed Human Epidermal Cultured Skin Models. **27**, 269–274 (2015).
31. Bätz, F. M. *et al.* Esterase activity in excised and reconstructed human skin-Biotransformation of prednicarbate and the model dye fluorescein diacetate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84**, 374–385 (2013).
32. Gysler, A. *et al.* Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharm. Res.* **16**, 1386–1391 (1999).
33. Cengiz, D., Cokuğraş, a N. & Tezcan, E. F. A new perspective on thermal inactivation kinetics of human serum butyrylcholinesterase. *J. Protein Chem.* **21**, 145–149 (2002).

CONCLUSION GENERALE ET PERPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était de **développer de nouveaux TPC** à base de **réseaux polymériques de nanoparticules** performants contre la pénétration d'un agent chimique toxique, le pesticide paraoxon. Les moyens mis en œuvre ont été les suivants : la synthèse de nouveaux réseaux et leur intégration dans des formules stables et filmogènes ainsi que l'évaluation de leur efficacité protectrice à l'aide de différents modèles *in vitro*.

L'utilisation de **nanoparticules de silice ou cérine en réseau** greffées à un **polymère fluoré** modificateur de rhéologie de type HASE a montré son efficacité pour la protection vis-à-vis de la pénétration d'agents chimiques tels que le paraoxon. Les nanoparticules sont dispersées de manière **homogène** et **individuelle** grâce au polymère HASE et cette dispersion est conservée après formulation. **7 nouvelles crèmes barrières** efficaces contre la pénétration du paraoxon ont été identifiées. La comparaison des formules a permis de mettre en évidence que la **présence**, la **taille**, le **type** et le **traitement** des nanoparticules influencent la formulation et l'efficacité. De plus, la comparaison des réseaux nanoparticulaires à d'autres crèmes contenant des nanoparticules ou au polymère greffé non formulé a permis de souligner l'impact positif à la fois du **greffage** des nanoparticules à un polymère HASE mais également de sa **formulation**.

Le screening des formules a permis de sélectionner 2 formules les plus efficaces, chacune à base d'un type de nanoparticules : F1 à base de SiO₂ et F2 à base de CeO₂. La stabilité et l'étude détaillée de ces deux formules a montré que **F1** a son **réseau** qui se **construit** dans le temps et **reste efficace** après 4 semaines à 45°C au contraire de **F2** qui n'est **pas stable** et **perd son efficacité** après vieillissement accéléré. De plus, la formulation en grosse quantité n'a pas permis d'obtenir la même efficacité que la mini-formule, l'efficacité de F2 est donc plus sensible que celle de F1. Les deux crèmes présentent une protection dès 5mg/cm². **F1 semble la meilleure crème protectrice** après étude sur membranes artificielles : à dose égale elle est toujours plus efficace, l'occlusion ne semble pas l'impacter autant que F2 et sa protection reste constante sur membranes siliconées à 24h. L'efficacité de ces deux TPC candidats vis-à-vis du paraoxon a été confirmée sur explants de **peaux humaines** pour lesquelles la capacité de protection est similaire. L'utilisation de ces réseaux nanoparticulaires pour la protection cutanée contre la pénétration d'agent chimiques de guerre nécessite des tests complémentaires vis-à-vis d'agent réel comme le **VX** (pour lequel le paraoxon est le simulant) mais aussi vis-à-vis d'autres classes d'agents chimiques de guerre comme les vésicants. Les premiers tests pourraient être également réalisés vis-à-vis d'un simulant comme le **2-Chloroethyl ethyl sulfide** (CEES) puis vis-à-vis de l'**Ypérite** lui-même.

L'utilisation de nanoparticules de cérine a été envisagée dans le but d'allier **protection** et **décontamination**. En effet, les nanoparticules de cérine ayant des propriétés **photocatalytiques**, des

expériences supplémentaires sont nécessaires pour étudier la capacité de dégradation du paraoxon de la formule F2 après exposition aux UV. La comparaison des bases a permis de mettre en évidence l'impact du **PVP** (polyvinylpyrrolidone) sur l'efficacité. Cet ingrédient pourrait être une piste envisageable pour améliorer l'efficacité et peut être également la stabilité de F2.

L'étude de la **mouillabilité** des formules a permis de mettre en évidence que ce paramètre seul **ne permettait pas de prédire l'efficacité d'un TPC candidat**. En effet, celle-ci dépend de plusieurs autres paramètres tels que des facteurs physico-chimiques des principes actifs et de l'excipient, le type de modèle utilisé, etc. Cependant, un faible angle de contact (<50°) est corrélé à une faible protection, il serait intéressant de voir si un très fort angle de contact (supérieur à 90° permettant d'atteindre l'oléophobie ou l'hydrophobie) peut être corrélé systématiquement à une efficacité. Dans ce but, un travail initial a été réalisé pour **améliorer** les actifs greffés. Le « **surgreffage** » des nanoparticules par un acide à longue chaîne fluorée a montré de meilleures propriétés oléophobes et des propriétés rhéologiques (viscosité) plus faibles pour les nouveaux composés. L'intégration de ces composés en tant qu'actif protecteur dans un spray serait donc une piste envisageable intéressante pour le développement de nouveaux sprays protecteurs.

Dans le but d'une **industrialisation** et d'une **production à grande échelle** de ces nouveaux TPC la synthèse des actifs a été optimisée et leur toxicité évaluée. L'**optimisation** en termes de production « laboratoire » a permis de gagner du temps (synthèse raccourcie de 6 jours) mais surtout d'économiser la quantité de solvant ayant un impact positif à la fois économique et environnemental. La production du polymère en quantité industrielle nécessitera encore des améliorations : des étapes non utiles en termes d'industrialisation comme la dialyse du polymère avant le greffage des nanoparticules pourront être éliminées. Les **réglementations** ont été mises en place pour vérifier l'**innocuité** des nouveaux produits chimiques (REACH) et cosmétiques (Règlement (CE) N°1223/2009) mis sur le marché. Les polymères sont un cas particulier de REACH et sont exemptés d'enregistrement. Dans le cas d'une utilisation de ces polymères perfluorés greffés avec des nanoparticules pour une application en tant que topique protecteur cutané contre les agents chimiques de guerre, une potentielle toxicité pour la peau ou l'environnement est à prendre en compte et doit être comparée au bénéfice de l'utilisation de la crème (balance bénéfices / risques). Dans le but d'une **application à plus large échelle** comme dans des produits solaires dont l'industrie est très intéressée du fait du greffage covalent des nanoparticules au polymère, l'anticipation de l'innocuité de ces produits à la fois pour la santé humaine et pour l'environnement a montré que ces polymères ne sont pas irritants pour la peau et présentent une toxicité faible pour l'environnement puisque leur écotoxicité est largement inférieure aux teneurs des composés fluorés classiquement

utilisés dans l'industrie qui sont bioaccumulés dans l'environnement. La **balance bénéfices / risques** est donc **très élevée**.

La réglementation tente également d'aller vers une diminution de l'utilisation des animaux pour les tests biologiques. Les tests d'efficacité de ce travail ont été réalisés en respectant la **règle des 3R** : screening et étude sur membranes artificielles puis validation sur explants de peau humaine. Cependant pour des raisons **éthiques** et **économiques**, nous avons proposé l'**utilisation d'épidermes humains reconstruits** comme **nouveau modèle d'efficacité**. En effet, ceux-ci moins cher que la peau humaine *ex vivo* présentent l'avantage d'être plus facile d'utilisation, prêt à l'emploi et proches de la peau humaine en terme de morphologie et composition. Le travail réalisé montre que ces modèles, classiquement utilisés pour la mesure de l'irritation ou de la corrosion, ne sont pas aussi facile à utiliser pour des mesures de pénétration et/ou d'efficacité des TPC candidats. L'utilisation de mèches pour l'étalement des TPC candidats n'est pas une bonne solution, d'autres outils d'étalement devront être mis au point. Une autre solution est d'utiliser des modèles plus large comme les SkinEthic 4cm² permettant un étalement manuel mais ceux-ci sont également plus chers.

Ce travail a permis la mise au point de deux TPC à base de réseaux nanoparticulaires efficaces contre la pénétration du paraoxon. Ces nouveaux polymères protecteurs greffés avec des nanoparticules pourraient également être déposés sur d'autres **types de support** comme les textiles et constituent une nouvelle voie d'amélioration des équipements de protection individuelle afin d'allier protection et décontamination. Ils pourraient également être adaptés à la protection et la **dépollution des pesticides** car dispersibles facilement dans l'eau. Les nanoparticules à l'état individuel pourraient alors jouer entièrement leur rôle de capteurs de pollution. Enfin, ces polymères pourraient également être utilisés pour d'autres types de protection comme la **protection solaire**. En effet, le nouveau Règlement cosmétique n°1223/2009 régit l'emploi des nanoparticules et oblige l'indication du terme « nano » sur l'emballage. Le manque de recul sur la toxicité des nanoparticules tend à alarmer le consommateur et pose une véritable question en termes de santé et sécurité dans le monde cosmétique quant à l'utilisation des nanoparticules. Ces nouveaux polymères intéressent donc fortement le secteur cosmétique car la dispersion homogène et individuelle permet de conserver l'activité protectrice des nanoparticules (et donc d'utiliser moins d'actifs) et leur liaison à un réseau polymérique ne les obligerait pas à déclarer la composition comme « nano ». Le greffage des nanoparticules à des polymères commerciaux (plus intéressants pour les entreprises) non fluorés et donc « eco-friendly » serait une voie intéressante à développer à la fois pour la protection et la dépollution de l'environnement ainsi que pour les besoins de l'industrie cosmétique.

Annexes

Annexe 1 : Appareils et méthodes d'analyses utilisées	A2
Annexe 2.1 : Synthèse du macromère MF8	A3
Annexe 2.2 : Synthèse du polymère HASE-F-RF8	A7
Annexe 2.3 : Fonctionnalisation des nanoparticules	A10
Annexe 2.4 : Greffage des nanoparticules	A12
Annexe 2.5 : Surgreffage des polymères HASE-F-RF8/NPs	A13
Annexe 3.1 : Test NRR : essais de cytotoxicité sur fibroblastes de cornée de lapin	A14
Annexe 3.2 : Test HET-CAM : essais d'irritation sur membrane chori-allantoidienne d'œuf de poule embryonné	A17
Annexe 3.3 : Test d'écotoxicité sur <i>Daphnia magna</i>	A20
Annexe 4.1 : Protocole d'efficacité	A22
Annexe 4.2 : Quantification du paraoxon et détermination de l'efficacité	A24
Annexe 6.1 : Protocole de pénétration et d'efficacité des épidermes humains reconstruits	A28
Publication	A30

Annexe 1 : Appareils et méthodes d'analyses utilisées

RMN	Brüker W-200 MHz. Les macromères ont été analysés dans le chloroforme deutéré (~15mg pour 0,7mL de solvant). Les polymères ont été analysés dans du dimethylsulfoxide deutéré (~28mg pour 1,4mL de solvant).
Infrarouge	FT-IR Spectrum 100 de Perkin Elmer. Les analyses ont été réalisées par la méthode des pastilles KBr.
Rhéomètre	Kinexus Pro+ de Malvern. Les mesures ont été faites à 25°C. Les analyses des formules ont été réalisées avec un système plan/plan : mesures en écoulement dans le domaine de gradient de vitesse de 0,1 à 3000s⁻¹ ; mesure en oscillation à fréquence fixée 1Hz et dans un domaine de déformation de 0,1 à 100% ; mesure en oscillation à amplitude fixe de 1Pa et dans un domaine de fréquence compris entre 0,1Hz et 100Hz. Les analyses en écoulement des polymères ont été réalisées à 2% (p/p) dans l'eau à pH 7 avec le cylindre coaxial sur une gamme de gradient de vitesse de 0,1 à 100s⁻¹
Goniomètre	DSA-30 de Krüss équipé du logiciel Drop Shape Analysis. Méthode utilisée : Circle pour les faibles angles de contact et Tangent Method -1 pour les angles de contact > 90°. Ces mesures correspondent à une moyenne effectuée à 3 endroits différents.
AFM	Microscope Innova de Brüker. Les analyses ont été effectuées en mode tapping dans l'air avec des leviers commerciaux Si dopée phosphore avec une force de 20-80 N/m et une fréquence de résonnance de 262-368 KHz.
MEB	Microscope 6700F de JEOL. Les échantillons ont été métallisés avec de l'AuPd.
Spectromètre UV-visible	Eon de BioTek.
Potentiel zêta ou DLS	Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments.

Annexe 2.1 : Synthèse du macromère MF8

1- Réaction

L'acide fluoré (RF8) (10,16 mmol), la N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1eq : 10,16mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (0,1 eq : 1,016mmol) et du dichlorométhane anhydre (3mL/mmol) sont mélangés dans un ballon sous agitation magnétique surmonté d'un réfrigérant. Le mélange réactionnel est agité durant 20min pour activer les groupements acides carboxylique avant d'ajouter le polyéthylène glycol monométhacrylate (PEGMM) (1eq : 10,16mmol). La réaction se poursuit une nuit à température ambiante (Figure A).

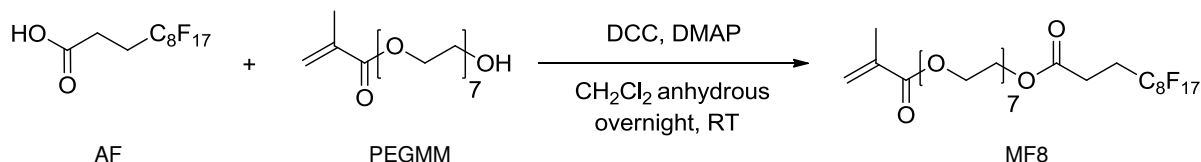


Figure A : Réaction de synthèse du macromère.

2- Purification

- (a) Filtration sur célite (1h) : cette étape sert à éliminer la DCU insoluble dans le solvant.
- (b) Extraction à l'eau (1h) : cette étape sert à éliminer la DMAP et l'acide qui n'a pas réagi car soluble dans l'eau, ils passent facilement dans la phase aqueuse.
- (c) Evaporation du solvant pour un dépôt concentré sur colonne
- (d) Purification par chromatographie sur colonne de silice (1 à 2 jours) : cette étape finale longue et couteuse en solvant sert à éliminer le PEGMM (insoluble dans l'eau) qui n'aurait pas réagi.

Une étape finale d'évaporation du solvant au rotavapor permet d'obtenir un produit visqueux légèrement jaune orangé : le macromère MF8.

3- Caractérisation

La caractérisation du macromère est réalisé par RMN au proton (RMN 1H) (Figure B). La Figure C présente la numérotation de chaque proton du macromère pour l'analyse. Le Tableau A présente lui la caractérisation RMN 1H attendu pour le macromère (déplacement chimique de chaque proton, intégration (nombre de H par pic) et leur multiplicité).

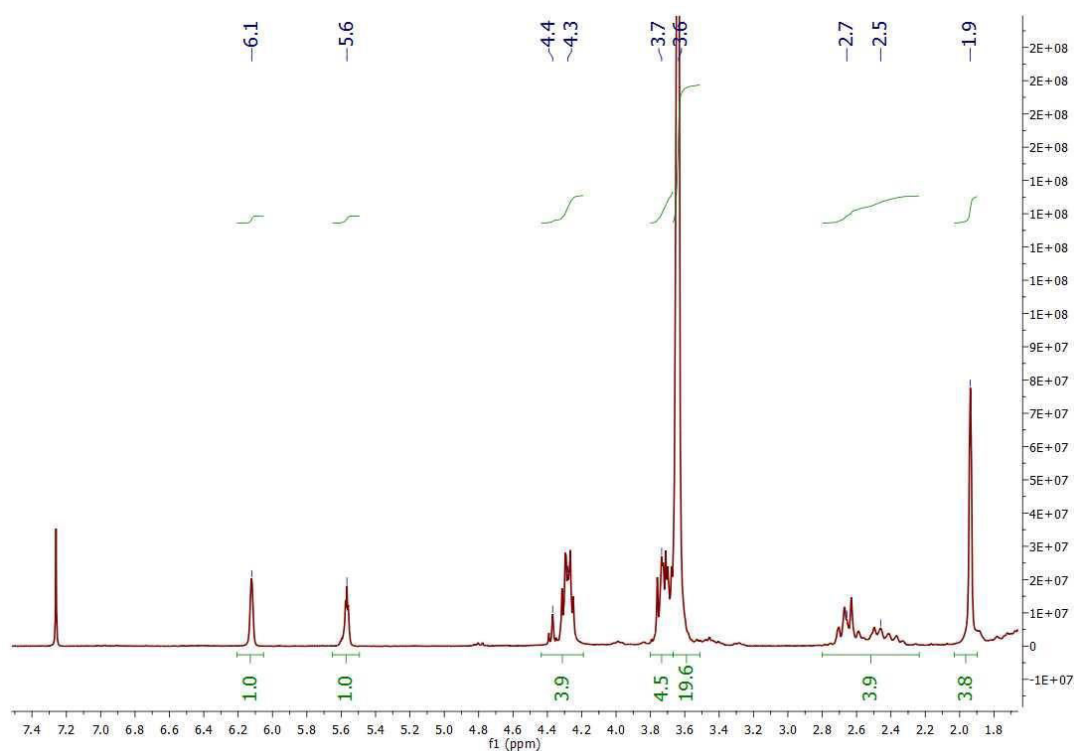


Figure B : Spectre RMN 1H du macromère MF8.

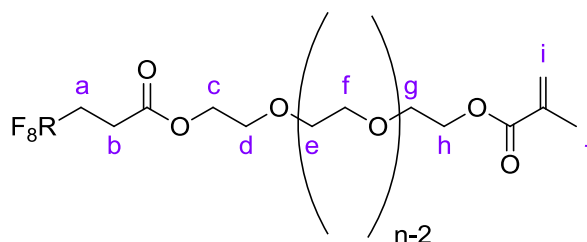


Figure C : Attribution des protons pour le macromère.

Tableau A : Caractérisation attendue du macromère par RMN 1H.

Proton	δ (ppm)	Intégration (I)	Multiplicité
a	2,5	2H	m
b	2,7	2H	m
c	4,3	2H +	m
d	3,7	2H	m
e	3,6	$[2*(n-2)]$ H	m
f	3,6	$[2*(n-2)]$ H	m
g	3,7	2H	m
h	4,4	2H	m
i ₁	5,6	1H	s
i ₂	6,1	1H	s
j	1,9	3H	s

Le nombre de motif de répétition n intéressant pour notre étude est compris entre 7 et 10. La caractérisation du macromère par RMN 1H permet le calcul de n . Chaque groupe du motif de répétition contient 4H ainsi n est calculé selon l'équation A suivante :

$$n = (I_{ef} + I_{dg} + I_{ch}) / 4 \quad (eq. A)$$

I est l'intensité relevé pour chaque groupe de protons (ef, dg et ch)

Chaque monomère synthétisé a été caractérisé à l'aide de cette méthode. Les monomères ayant un $n < 7$ n'ont pas été utilisés.

4- Optimisation

L'optimisation de la synthèse du macromère proposée se situe au niveau des étapes de traitement du macromère.

- L'étape de filtration (a) est tout d'abord éliminée. En effet, la célite forme un maillage qui permet d'éliminer les particules solides. Tout comme la célite, la silice forme un maillage, mais plus serré. Ainsi, la DCU peut également être éliminée à l'étape de purification (d).
- L'étape de purification (d) est longue et couteuse. C'est une étape consommatrice de temps et de solvant car le produit doit traverser l'épaisseur de silice de la colonne d'environ 20 à 25cm. L'utilisation d'un autre dispositif de traitement est réalisable : un fritté dans lequel on charge la silice d'une épaisseur plus fine d'environ 3-4 cm (Figure D), les molécules passent donc plus vite et à l'aide de peu de solvant (1,5L contre 5-6L pour une purification sur colonne). Il est à noter que ceci est possible car notre produit est facilement séparable du PEGMM, en effet les molécules difficiles à séparer en chimie organique nécessitent une étape de purification sur colonne.
- Egalement la température des étapes purification semble importante, l'ensemble est traité dans de la glace afin de conserver une température de 4-10°C pour éviter la polymérisation du macromère alors inutilisable pour la synthèse du polymère.

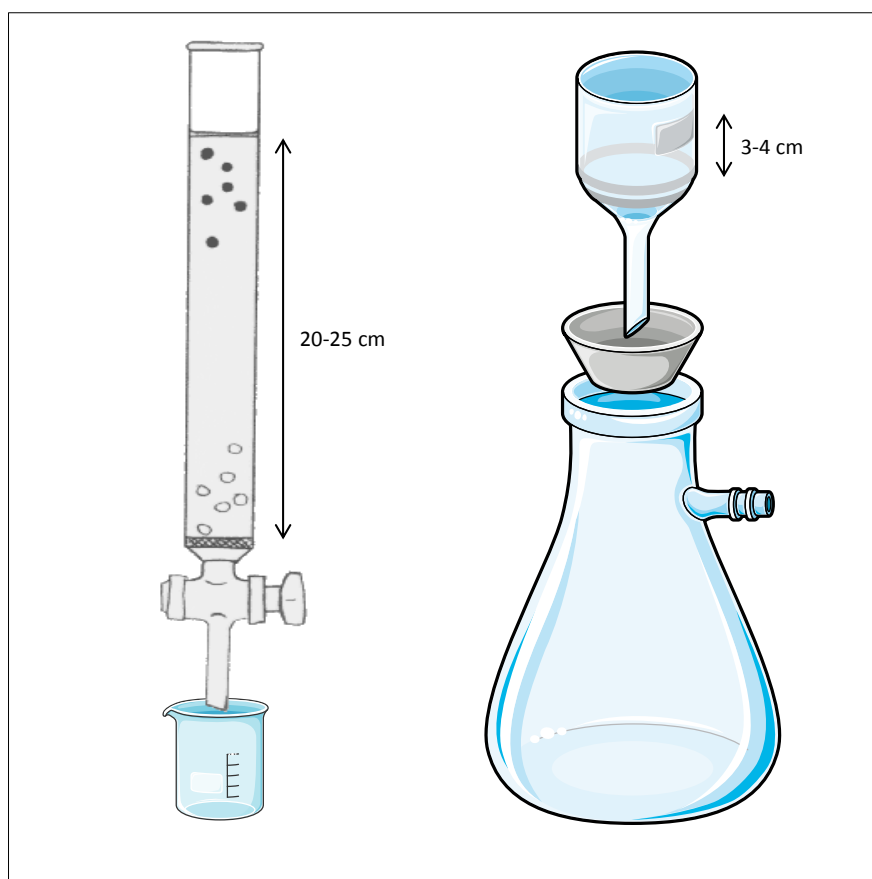


Figure D : Schéma des montages possibles pour la purification du macromère.
Gauche : protocole classique utilisant une colonne de chromatographie ; Droite : protocole optimisé utilisant un fritté.

Grâce à cette optimisation le protocole de synthèse du macromère a été réduit de moitié et est le suivant :

- 1- **Réaction** : 1 nuit
- 2- **Traitement** :
 - a. Extraction à l'eau : 1h
 - b. Purification sur silice sur fritté : 3h.

Total : 2 jours

Les paramètres clefs de l'obtention de monomère ayant $n > 7$ sont :

- la température de réaction (20-25°C).
- la rapidité et la température de purification (4-10°C).

Annexe 2.2 : Synthèse du polymère HASE-F-RF8

1- Réaction chimique

Du dodécyl sulfate de sodium (SDS, 1,42%_m (%_m : pourcentage massique de la réaction)) et de l'eau distillée (77,9%_m préalablement dégazée) sont introduits dans un réacteur à doubles enveloppes sous agitation mécanique (414 tr/min) surmonté d'une arrivée d'azote et d'un réfrigérant (Figure E). Le mélange de monomère d'acide méthacrylique (6,75%_m), de méthacrylate de 2,2,2-trifluoroéthyle (9,9%_m) et le macromère MF8 (3%_m) est ajouté suivi de l'acétone (1,25%_m) et du persulfate de sodium (0,035%_m). La réaction (Figure F) se poursuit à 75°C durant 30min à 414 tr/min puis 4h30 à 696 tr/min et également jusqu'au lendemain matin en refroidissant. Le latex formé est ensuite purifié par dialyse (MWCO 3500 Da) durant 2 jours.

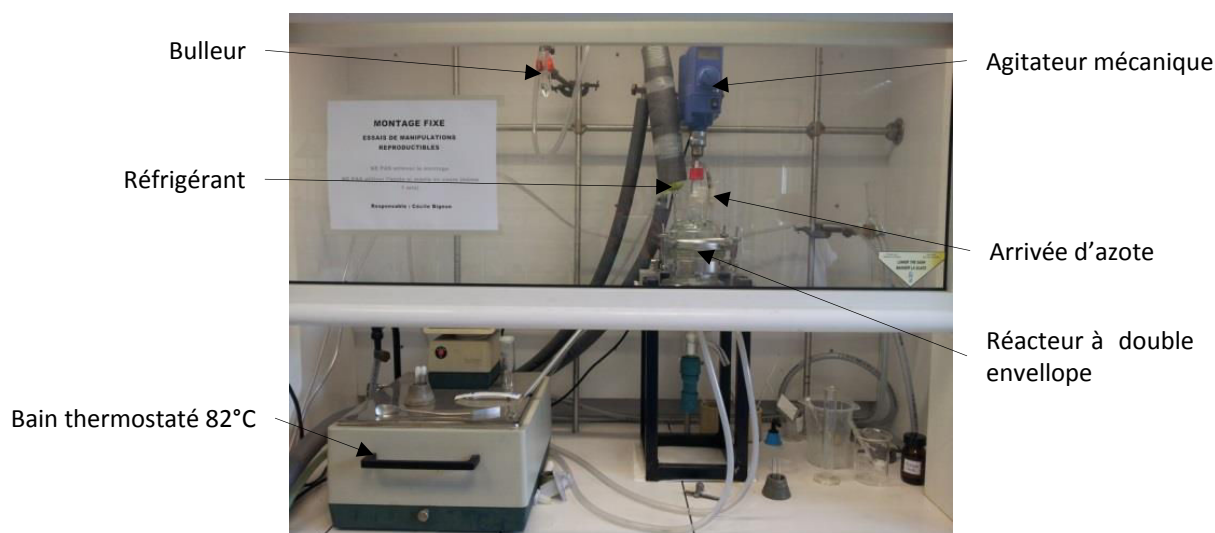


Figure E : Réacteur et montage utilisé pour la synthèse du polymère HASE-F-RF8.

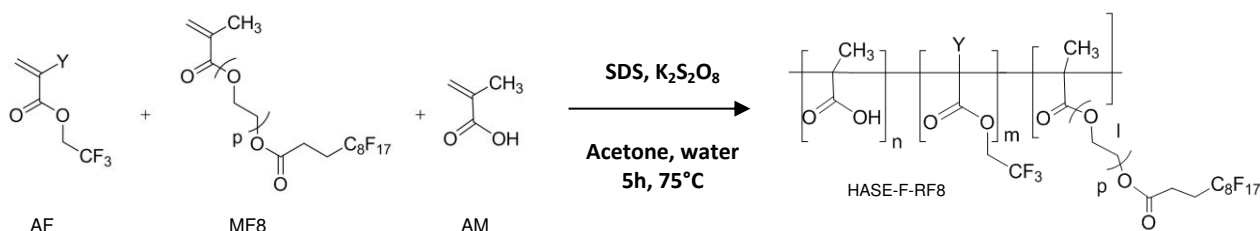


Figure F : Réaction de synthèse du polymère.

2- Caractérisation

La caractérisation du polymère est également réalisée par RMN 1H préalablement séché au lyophilisateur (Figure G). Chaque monomère est caractérisé par un déplacement chimique dont le pic représente un nombre de protons spécifiques (

Tableau B). L'intensité de l'AM est normalisée à 1000 et les autres intensités sont normalisées en fonction du nombre de proton nominale apporté par la résonnance ce qui permet de calculer ensuite le pourcentage molaire de chaque monomère.

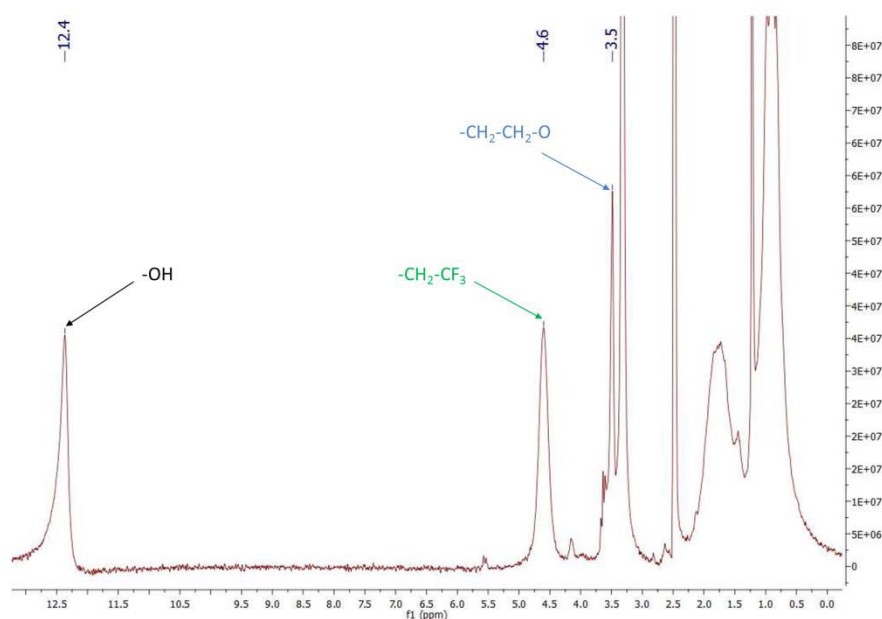


Figure G : Spectre RMN 1H du polymère.

Tableau B : Exemple de caractérisation par RMN du polymère.

Résonnance*	δ (ppm)	Nombre de protons (nominal)	Intensité	%mol
AM	12,4	1	1000	45,7
AF	4,6	2	85,8	38,9
MF8	3,5	$2*(n-2)$	338,6	15,3

*AM concerne la résonnance du proton de l'acide carboxylique (-OH), AF la résonnance du proton méthylène de l'ester trifluorométhylène (-CH₂-CF₃) et MF8 la résonnance des motifs éthoxylés excepté les autres protons en alpha des deux esters (-CH₂-CH₂-O).

Le rendement est calculé selon la même formule que pour le macromère :

$$\eta (\%) = \frac{m_{polymère}}{m_{AM} + m_{AF} + m_{MF8}} * 100 \quad (eq. B)$$

Chaque polymère synthétisé a été caractérisé à l'aide de cette méthode. Les polymères conservés sont ceux contenant $45\pm 9\%$ de AM, $36\pm 5\%$ de AF et $19\pm 7\%$ de MF8. Le rendement de la réaction est d'environ 50-70%. Ceux-ci sont entièrement séchés au lyophilisateur.

3- Optimisation

Les paramètres qui se sont révélés être clefs pour l'obtention des polymères sont l'étanchéité du montage et le contrôle du débit d'azote. En effet, la réaction est une réaction radicalaire sensible à l'air, c'est pourquoi elle est réalisée sous atmosphère inerte et contrôlée. De plus, la température de réaction est également très importante car c'est à 75°C que la réaction s'initie. L'optimisation a consisté ici en la mise en place d'un réacteur double enveloppe de 500mL permettant un meilleur contrôle de la température. La température est également augmentée de quelques degrés (82°C) afin de se placer bien au-dessus de la température d'initialisation de la réaction (75°C). L'intégration de AF (température d'ébullition 59°C) à plus de 20% a été difficile c'est pourquoi les pourcentages massiques initiaux de la réaction ont été modifiés : SDS 1,6%, MF8 3,12%, AM 7,03%, AF 12,41%, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,041%, Eau 74,5%, Acétone 1,3%. Le volume du réacteur réduit la réaction à 20g de monomères initiaux. L'utilisation de ce réacteur double enveloppe a permis d'obtenir des rendements proches de 90% pour chaque réaction.

Annexe 2.3 : Fonctionnalisation des nanoparticules

1- Réaction chimique et traitement

2 g de nanoparticules (SiO_2 , CeO_2 ou TiO_2) préalablement séchées à 110°C toute la nuit sont mis à agiter avec 100mL de toluène anhydre et 7mL (30 mmol) de (3-aminopropyl)triéthoxysilane dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et sous arrivée d'azote. La réaction se poursuit 4h à 120°C (Figure H). Le milieu réactionnel est ensuite refroidit à température ambiante et les nanoparticules sont lavées par triple centrifugation à 8000 tr/min durant 5 min par de l'éthanol puis de l'eau distillée.

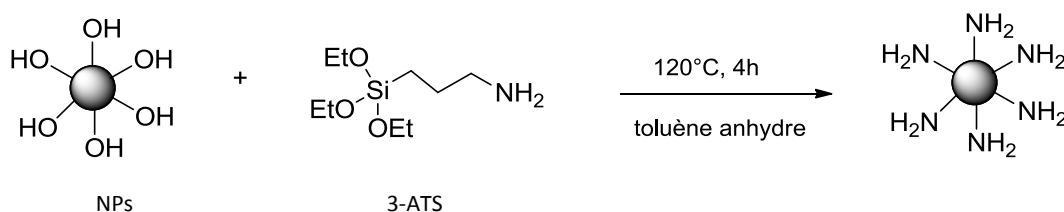


Figure H: Réaction de fonctionnalisation des nanoparticules.

2- Caractérisation

Le taux de fonctionnalisation des nanoparticules réalisées avec ce protocole a été caractérisé précédemment par analyse élémentaire. L'analyse par infrarouge (IR) permet de vérifier que la fonctionnalisation a bien été réalisée à chaque synthèse (séchage d'une fraction à 110°C pour l'analyse). En effet, après réaction ces particules sont dotées de fonctions supplémentaires (portées par le 3-ATS additionné) détectables par IF (Figure I) :

- les fonctions amines caractérisées par l'apparition de bandes de vibration C-H entre 2800 et 2900cm^{-1}
- les fonctions amines caractérisées par l'apparition de la bande de vibration N-H à 1500cm^{-1}
- la bande à 1100cm^{-1} est la signature spectrale de la silice (Si-O-Si).

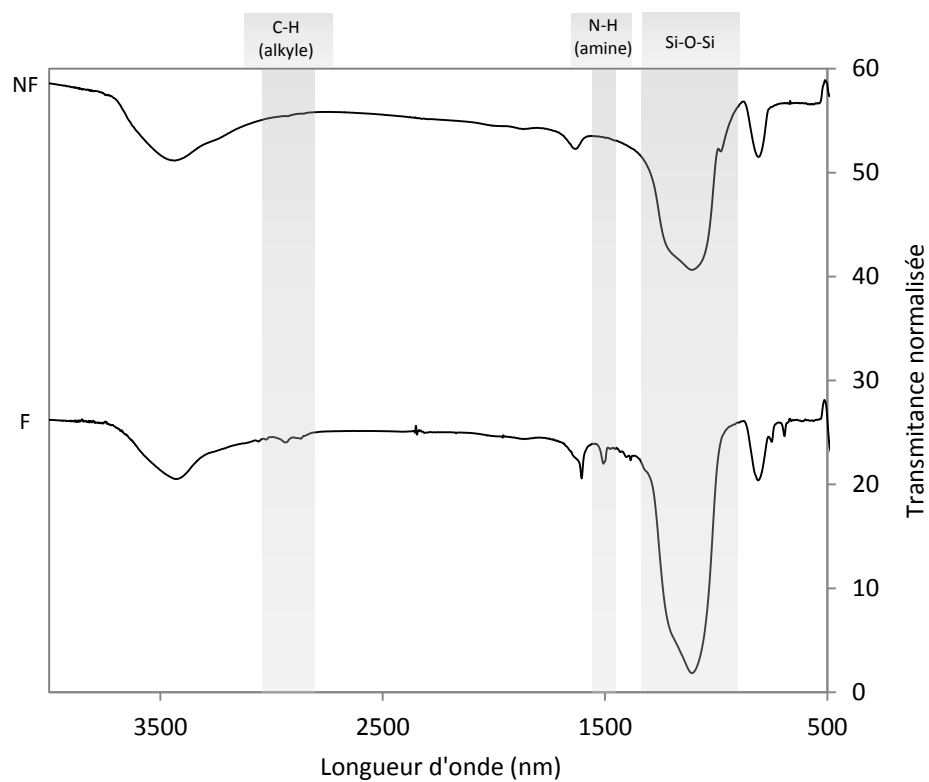


Figure 1 : Analyses infra-rouges des nanoparticules de silice.
NF : non fonctionnalisée ; F : après fonctionnalisation.

Annexe 2.4 : Greffage des nanoparticules

L'hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) (1eq) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) (1/15 eq par rapport à l'EDC) sont mélangés puis ajoutés à une solution de polymère (en 1 eq des fonctions acides carboxyliques contenues dans le polymère) dans un excès d'eau. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation durant 1h à 28°C puis les nanoparticules (1 eq des fonctions amines par rapport aux fonctions acides du polymère) préalablement dispersées dans l'eau sont ajoutées. La réaction se poursuit 5 jours à 28°C (

Figure J) et le polymère greffé est ensuite purifié par dialyse (MWCO 3500 Da) durant 2 jours. L'optimisation de la synthèse a permis de réduire le temps de réaction à 1 jour puisque la réaction est terminée dès les premières 24h.

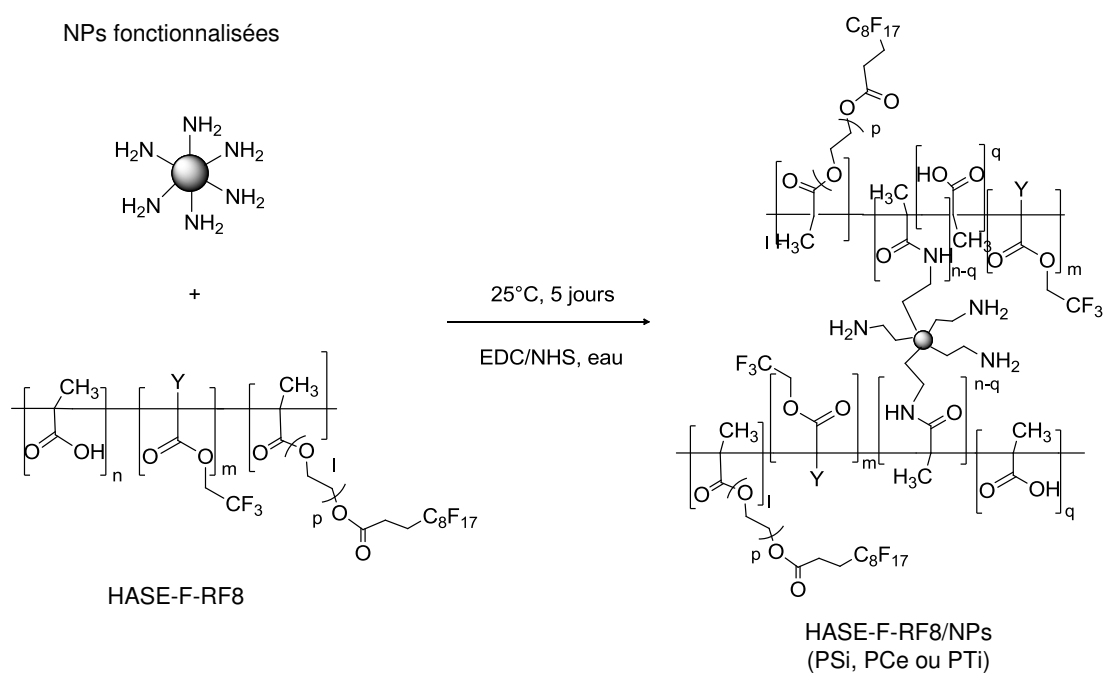


Figure J: Réaction de greffage des nanoparticules au polymère HASE-F-RF8.

Annexe 2.5 : Surgreffage des polymères HASE-F-RF8/NPs

L'hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) (1eq : 1,97mmol) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) (2 eq : 3,94mmol) sont mélangés puis ajoutés à une solution d'acide fluoré (RF8) (1 eq : 1,97mmol) dans un excès d'eau acide (pH 4-5) pendant 1 nuit. Le polymère HASE-F-RF8/NPs (1 eq des fonctions amines portées par les nanoparticules avant greffage par rapport aux fonctions acides carboxylique de RF8) est prédispersé dans un excès d'eau basique (pH8-9) pendant 1 nuit. Le lendemain la solution de polymère est ajoutée dans la solution d'acide activé et le mélange réactionnel est laissé sous agitation durant 5 jours à 28°C (Figure K). Le polymère surgreffé est ensuite purifié par dialyse (MWCO 3500 Da) durant 2 jours et concentré à l'air libre sous agitation magnétique.

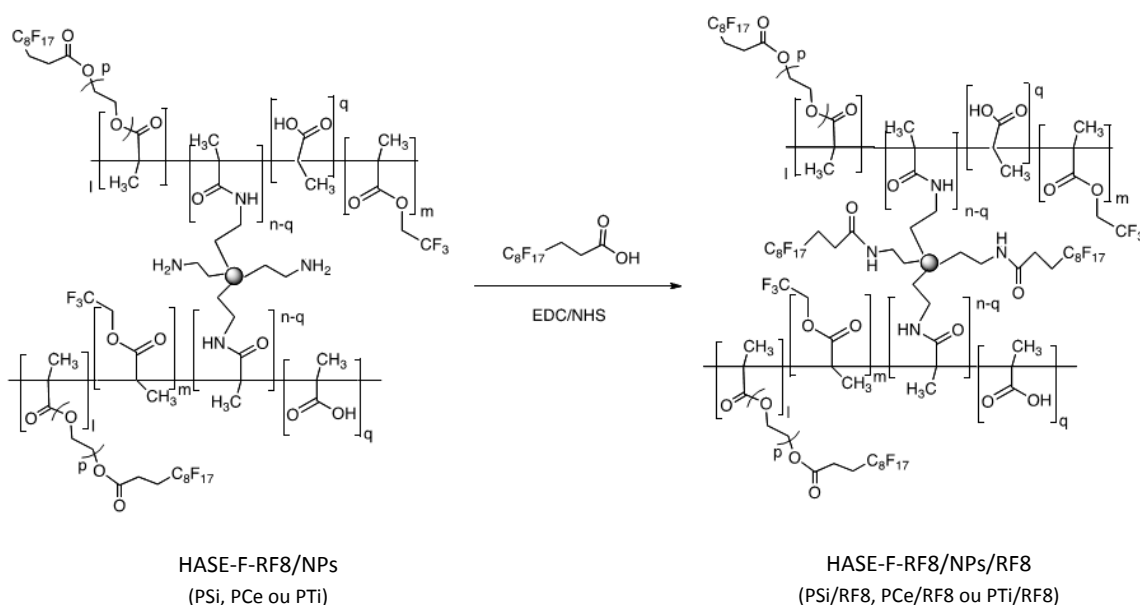


Figure K: Réaction de surgreffage des HASE-F-RF8/NPs.

Annexe 3.1 : Test NRR : essais de cytotoxicité sur fibroblastes de cornée de lapin

Le principe est basé sur l'évaluation de la cytotoxicité du produit testé, par détermination de la concentration entraînant 50 % de mortalité (CI_{50}), à l'aide du test de relargage du rouge neutre.

1- Préparation des échantillons à tester

Les échantillons suivants ont été préparés différemment pour les deux sociétés :

- Dispersion des polymères et nanoparticules (préalablement neutralisés et lyophilisés) dans du sérum physiologique pour COTY-Lancaster.
- Formulation des polymères dans de l'eau distillée (pH7) et dispersion des nanoparticules dans du sérum physiologique pour la société IDEA Tests.

Les échantillons nanoparticules contiennent en concentration l'équivalent de leur part dans l'échantillon Polymère greffé.

Echantillon	Composition (%)	Concentration (%) = 100% testé	Solvant	Prestataire
Polymère greffé silice	44(Si):56(P)	18	sérum physiologique	COTY-Lancaster
Polymère	-	10	sérum physiologique	COTY-Lancaster
Silice	-	8	sérum physiologique	COTY-Lancaster
Polymère greffé cérine	33(Ce):67(P)	13,3	eau distillée/soude	IDEA Test
Polymère greffé titane	33(Ti):67(P)	18,1	eau distillée/soude	IDEA Test
Cérine	-	4,4	sérum physiologique/soude	IDEA Test

2- Matériel

Les cellules utilisées sont des fibroblastes de cornée de lapin, de lignée SIRC cat no 2-552 (ATCC - CCL 60 - American Type Culture Collection - Rockville, Maryland, USA) cultivées en milieu (D)MEM, additionnées de 10 % de sérum de veau fœtal (décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes), d'antibiotiques (pénicilline 10 000 UI/ml + streptomycine 10 000 µg/ml) et de L-glutamine (200mM). Les cellules sont maintenues en atmosphère humide contrôlée (37°C - 5 % CO_2).

La solution de rouge neutre est préparée à 0,4% dans de l'eau distillé (Colour Index : 50040).

3- Protocole expérimental

1.1. La veille de l'essai

Ensemencement des cellules

Les cellules sont trypsinées et comptées. Les cellules sont ensuiteensemencées en microplaque de 24 puits, à raison de 200 000 cellules par puits sous un volume de 1 ml de milieu (D)MEM complet, sans agitation. La plaque est placée au moins 18-24h à l'incubateur (37°C - 5 % CO_2).

Préparation des solutions

La solution mère de rouge neutre (solution colorante) est préparée à 0,05mg/ml dans du milieu de culture complet. Une solution de révélation à 1% d'acide acétique glacial dans l'éthanol à 50° est préparée.

1.2. Le jour de l'essai

Préparation des échantillons à tester

Les échantillons sont testés purs (100%) et à 50, 25, et 12,5% pour le polymère HASE-F-RF8, PSi et la silice et à 25% et 50% pour le Pce, PTi et Céline. Les dilutions des échantillons sont faites le matin en poids/poids et réalisées avec du SP.

Coloration cellulaire

24h après l'ensemencement, le milieu de culture de chaque puit est éliminé. La solution colorante de rouge neutre, après centrifugation à 3 000 g pendant dix minutes, est déposée à raison de 1ml par puits. La plaque est placée 3h à l'incubateur (37°C - 5% CO₂).

Après ce temps de contact, la solution colorante est éliminée et remplacée par 1 ml de milieu de culture complet, par puits. La microplaque est maintenue à température ambiante et sur une plaque d'agitation pendant 30min avant de mettre en contact les cellules avec le produit d'essai.

Contact avec le produit à l'essai

Sur une plaque d'agitation, chaque puit est rincé avec 2ml de PBS maintenu à température ambiante. Puis 0,5mL du produit d'essais sont appliqués à l'aide d'une pipette à déplacement positif 100-1000µL pendant 20sec. Le chronomètre est déclenché au moment du dépôt.

Rinçage

Après 55sec de contact, la dilution testée est aspirée. A 60sec précises (30sec pour le contrôle positif), 5 rinçages successifs sont effectués avec 2ml de PBS maintenus à température ambiante. Le surnageant est aspiré après chaque rinçage. Après le dernier rinçage, les puits restent dépourvus de milieu en attendant la phase de révélation.

Révélation de la cytotoxicité

Après traitement complet de la microplaque, sur une plaque d'agitation, 1ml par puits de la solution de révélation est déposé.

Lecture

Les solutions révélées sont déposées dans une microplaque de 96 puits à raison de 150µL/puits. La lecture de la densité optique est réalisée à 540nm contre le blanc (solution de révélation) l'aide d'un spectrophotomètre.

4- Expression et interprétation des résultats

On obtient une valeur de densité optique (DO) par puits. Le pourcentage de mortalité cellulaire est calculé pour chaque dilution de produit à l'essai selon la formule :

$$\% \text{ mortalité} = 100 - \left(\frac{\text{DO moyenne des puits traités}}{\text{DO moyenne de puits témoins}} \right) * 100$$

La courbe du pourcentage de mortalité cellulaire en fonction de la concentration de produit testé est tracée. La CI_{50} du produit à l'essai est alors calculée par analyse de régression linéaire. La cytotoxicité du produit est donnée par l'échelle suivante :

CI_{50} (%)	% mortalité pour dilution 50% (ou pur)	Classification
> 50	≤ 20	Non cytotoxique
> 50	20 - 50	Faiblement cytotoxique
20 - 50	-	Moyennement cytotoxique
≤ 25	-	Cytotoxique

5- Paramètres d'acceptation de l'expérience

Le témoin positif ne doit pas être cytotoxique ($DO \sim 1$) et la CI_{50} du témoin positif SDS doit être comprise entre 0,01 et 0,2 %.

Annexe 3.2 : Test HET-CAM : essais d'irritation sur membrane chorio-allantoïdienne d'œuf de poule embryonné

Le principe est basé sur l'observation, par une personne entraînée, des effets irritants (hyperémie, hémorragie, coagulation) pouvant survenir dans les cinq minutes suivant le dépôt d'un produit sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné, au dixième jour d'incubation.

1- Réception des œufs et mise en couveuse

A la réception, les œufs fêlés ou cassés sont éliminés. Les autres sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de 12°C pendant au moins 24h avant de les placer en couveuse.

Les œufs sont pesés (ils doivent faire entre 50-65g) et identifiés puis placés en position vertical (poche d'air vers le haut) dans un incubateur équipé d'un système de retournement automatique à une température de 37,8° C et une humidité comprise entre 50 et 60%.

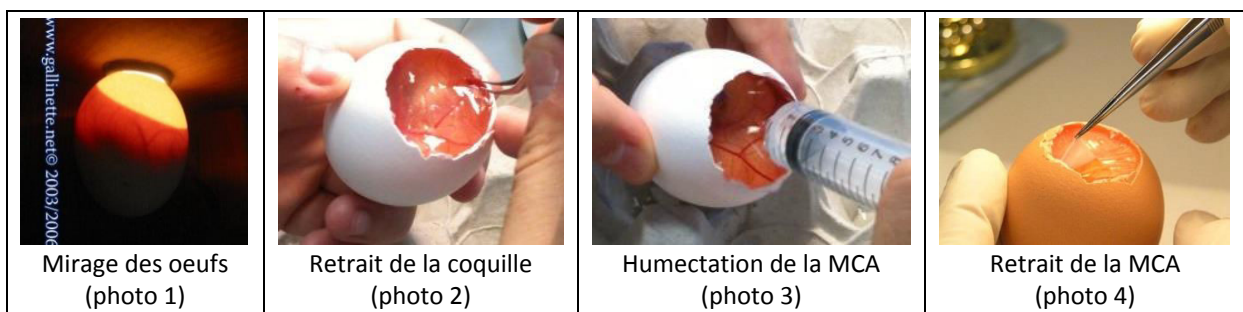
Au dixième jour d'incubation, les œufs sont mirés et les œufs défectueux sont éliminés.

2- Protocole expérimental

Les différentes étapes de l'essai sont enchaînées rapidement sous un éclairage d'une intensité suffisante ne dégageant pas de chaleur afin de ne pas dessécher la MCA.

2.1. Préparation de l'œuf

L'œuf est placé verticalement sur un support (poche d'air vers le haut) (photo 1), la coquille est entaillée au niveau de la poche d'air à l'aide de ciseaux fins en prenant soin de ne pas léser la MCA (photo 2). A l'aide d'une pince, la coquille est enlevée jusqu'au niveau de la membrane coquillière (photo 3). Toute la surface de la membrane coquillière est ensuite humidifiée avec du SP maintenu à 37° C. Le SP est ensuite éliminé par inclinaison de l'œuf. A l'aide d'une pince la membrane coquillière est décollée délicatement puis retirée afin de découvrir la MCA sous-jacente (photo 4). Les œufs dont la MCA est défectueuse ou présente des traces d'hémorragie sont rejetés.



2.2. Essai

0,30ml d'échantillons maintenu à 37° C sont déposés délicatement sur la MCA à l'aide d'une pipette à déplacement positif 100-1000µL et le chronomètre est aussitôt déclenché. Après 20sec de contact, la membrane est rincée avec 5ml de SP maintenu à 37°C à l'aide d'une seringue en évitant toute projection brutale. Le SP est éliminé par inclinaison de l'œuf. L'effet irritant de l'échantillon est évalué sur quatre œufs. En fin d'essai, les œufs sont congelés puis éliminés.

3- Procédure de lecture

Les observations sont réalisées à l'œil nu. Les phénomènes observés sont retenus en fonction de leur présence et non en fonction de leur intensité : il s'agit d'une réponse de type tout ou rien. Le temps est noté à l'apparition de chacun des phénomènes.

Définition des phénomènes (extrait de la méthode officielle²)

Hyperémie : « des capillaires non visibles avant l'ajout du produit deviennent visibles, alors que les capillaires visibles se dilatent et deviennent plus rouges. Ce phénomène peut également affecter les vaisseaux de diamètre supérieur »

Hémorragie : « libération de sang s'échappant des vaisseaux et / ou des capillaires, pouvant se présenter sous différents aspects, et notamment en " chou-fleur ", en nappe, en voile diffus, en piqueté (le sang s'échappe ponctuellement à différents endroits de la membrane)

Il est à noter que :

- l'hémorragie peut présenter un caractère éphémère ; elle doit néanmoins être prise en compte ;
- l'observation, dans les 30 premières secondes, d'une hémorragie massive impose la prise en compte de l'hyperémie masquée. »

Coagulation :

Opacité : « apparition sur tout ou partie de la membrane, soit d'un voile opalescent évoluant éventuellement vers une opacification, soit d'une opacification directe.

Il est nécessaire de vérifier que le phénomène n'est pas lié au comportement physicochimique du produit en milieu aqueux (par exemple formation d'un colloïde, d'un précipité,...).

Thrombose : « rupture du flux sanguin dans les vaisseaux se traduisant par un aspect segmenté (alternance d'étranglements et de zones turgescents plus ou moins sombres). Il est à noter que les observations ne doivent pas prendre en compte les modifications intervenues au niveau des capillaires. »

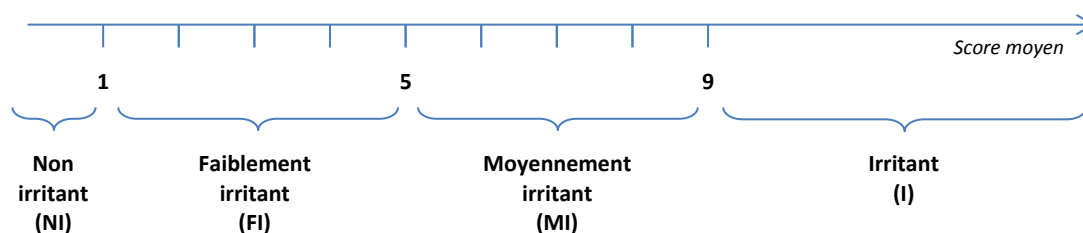
4- Expression des résultats

Les phénomènes observés sont quantifiés selon le tableau ci-après, en fonction de leur délai d'apparition :

Phénomène	Temps	Notation
Hyperémie	≤ 30s	5
	30sec - 2min	3
	2min - 5min	1
	Pas de phénomène	0
Hémorragie	≤ 30s	5
	30sec - 2min	7
	2min - 5min	3
	Pas de phénomène	0
Coagulation	≤ 30s	9
	30sec - 2min	7
	2min - 5min	5
	Pas de phénomène	0

Le score pour chaque œuf est la somme des notes d'hyperémie, d'hémorragie et de coagulation. La notation du produit testé est la moyenne arithmétique, arrondie à une décimale des scores obtenus sur quatre œufs. La notation maximum est 21.

Le potentiel irritant sur la MCA est donné par l'échelle suivante :



Annexe 3.3 : Test d'écotoxicité sur *Daphnia magna*

Le principe est basé sur l'observation de la mortalité ou de l'immobilisation des Daphnies après 24, 48 et 72h de contact avec les produits.

1- Préparation de l'eau synthétique (fresh water)

Préparer l'eau synthétique en versant les 4 vials contenant les différents sels dans 2L d'eau distillée ($\text{NaHCO}_3 = 67,75\text{mg/L}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 294 \text{ mg/L}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 123,25\text{mg/L}$ et $\text{KCl} = 5,75\text{mg/L}$). Laisser 15min la fiole à agiter très fortement à l'aide d'un barreau magnétique afin d'oxygéner l'eau avant utilisation.

2- Eclosion des néonates

Les daphnies sont transférées de leur tube de conservation stocké à 4°C dans un petit tamis et rincés abondamment à l'aide d'eau du robinet afin d'éliminer le milieu de conservation. Elles sont ensuite transférées dans des boîtes de pétri contenant de l'eau synthétique. Les daphnies sont ensuite mises à incuber 72h à 22°C sous illumination continue à 6000 lux.

3- Préparation des solutions

Les actifs et nanoparticules sont dispersés le jour même de l'expérience dans de l'eau synthétique pré-aérée. Le pH des échantillons est mesuré et ajuster idéalement à pH 7,4-7,8 à l'aide de soude (dilué dans de l'eau synthétique).

4- Nourrissage des néonates

Les daphnies sont nourries dans les boîtes de pétri avec de la spiruline (une algue) 2h avant leur prélèvement pour les tests. Bien transférer l'ensemble du tube contenant la spiruline avec de l'eau synthétique pré-aérée.

5- Remplissage de la plaque de lecture

1 plaque de lecture par produit est utilisée. Les essais sont réalisés en 4 réplicats. 10 mL de chaque concentration sont répartis dans les 5 puits de la ligne correspondant à la concentration testée. On peut donc tester 5 concentrations d'un produit par plaque (Figure L).

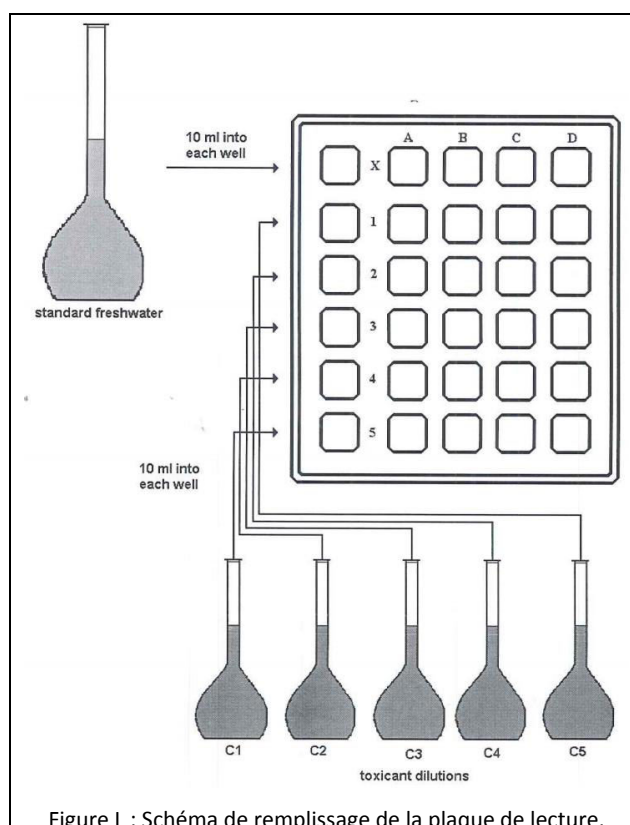


Figure L : Schéma de remplissage de la plaque de lecture.

6- Transfère des daphnies dans les plaques de tests

Les néonates (>20) sont ensuite sélectionnées au microscope et transférées à l'aide d'une petite pipette pasteur dans les puits de gauche pour chaque échantillon (contrôle non exposés et concentrations 1 à 5 du produit testé). Puis 5 daphnies sont déplacées dans chaque puits constituant chaque réplicats pour une même concentration (Figure M). Les plaques sont ensuite couvertes de parafilm, fermées et mise à incubée à 22°C dans le noir.

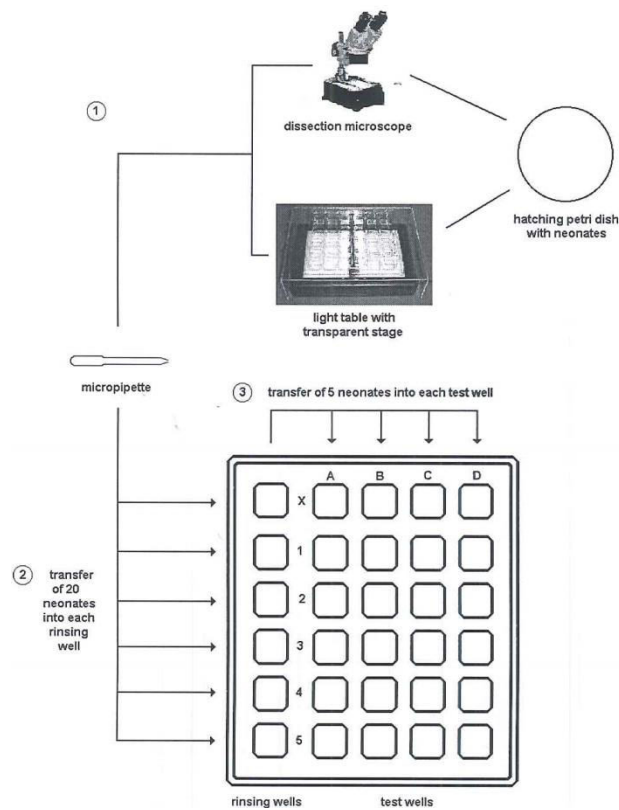


Figure M : Schéma de transfert de la plaque de lecture.

7- Comptage et évaluation de la mortalité

24h, 48 et 72h après la mise en contact des daphnies avec les substances à testées la mortalité est comptée. Les daphnies qui sont immobiles sont considérées comme morte. Les tests sont considérés comme valides lorsque :

- Les échantillons contrôles présentent moins de 10% de mortalité (<2 individus)
- Les échantillons à testés présentent moins de 10% de variabilité entre les 4 réplicats

8- Estimation de l'EC50 et tests statistiques

Les courbes représentant la mortalité en fonction de la concentration est tracée. L'EC50 est ensuite déterminée à l'aide du modèle PROBIT du logiciel XLSTAT.

Annexe 4.1 : Protocole d'efficacité

1- Préparation des échantillons et des membranes

Les crèmes sont déposées sur un bord de la membrane puis étalées à l'aide d'une spatule en silicone selon la

Figure N. Le temps de séchage varie entre 1h et 3h. Dans tous les cas les dépôts sont visuellement secs avant application du toxique (ne brille plus).

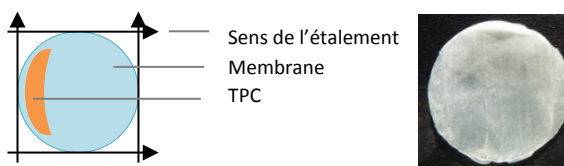


Figure N : Etalement des TSP sur les membranes.

Les membranes utilisées selon le test d'efficacité sont :

- Membranes siliconées de 10cm² et 400±100µm d'épaisseur (Samco Silicone Products, Nuneaton, UK).
- Membranes Strat-M de 4,9cm² et 312µm d'épaisseur (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Explants de peau humaine dermatomée de 3,14cm² et entre 350 et 520µm d'épaisseur (Bioprédic International, Saint Grégoire, France). La PIE est vérifiée avant montage complet.

2- Montage des cellules

Les cellules sont ensuite montées selon le schéma suivant (Figure O). Le compartiment receveur est rempli d'HBSS, sur lequel on dépose la membrane recouverte de crème ou non (essais vs contrôle non protégé). Un disque en téflon est ensuite posé sur la crème entre la membrane et le compartiment donneur pour assurer l'étanchéité du modèle. Le compartiment receveur/donneur/membrane/téflon est ensuite déposé et les bras de montage sont fermés.

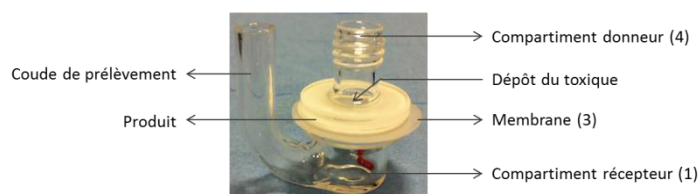


Figure O : Montage d'une cellule de Franz.

3- Application du POX

20 min après la fermeture des montages, 4,9 µl de paraoxon (POX) est déposé au centre de l'échantillon à l'aide d'une pipette à déplacement positif 1-10 µL.

4- Prélèvement

Chaque heure pendant 6h, 400µL sont prélevés dans le compartiment receveur par les coudes de prélèvement (Figure O) remplacés par 400µl de milieu neuf. Les échantillons sont immédiatement congelés en raison de l'instabilité du paraoxon à température ambiante.

Pour les expériences à 24h, les temps de prélèvement sont les suivants : 12, 15, 18, 21 et 24h.

5- Démontage, nettoyage et élimination des déchets

Les déchets (membranes et liquide receveur) sont détruits et les cellules de diffusion sont nettoyés (incubation 1 nuit puis nettoyage abondant à l'eau) à l'aide de soude 1N.

Annexe 4.2 : Quantification du paraoxon et détermination de l'efficacité

Le POX est un organophosphoré (OP) qui inhibe rapidement et de façon irréversible la butyrylcholine estérase (BuChE) : 1 molécule de POX réagit avec 1 molécule de BuChE. La mesure de l'activité enzymatique de la BuChE permet donc en présence d'échantillons inconnus et par rapport à une gamme étalon de pouvoir déterminer la quantité de POX dans l'échantillon. L'activité enzymatique de la BuChE est mesurée grâce au schéma suivant par spectrométrie :

Sans OP : **BuChE** + **BSCh** → **SCh** + **DTNB** → **TNB** (coloration jaune)

Avec OP : **OP** + **BuChE** + **BSCh**¹ → **BSCh** + **DTNB** → **DTNB** (coloration jaune pâle)

1 : inhibition de la BuChE par l'OP, pas de dégradation de BSCh et donc pas de dégradation de DTNB en TNB)

DTNB = acide 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoïque)

BSCh = S-butyrylthiocholine iodide

BuChE = butyrylcholinestérase de cheval

Il est donc nécessaire dans un premier temps de réaliser une gamme étalon du POX puis de mesurer l'activité enzymatique afin de déterminer la concentration en POX dans nos échantillons inconnus.

1- Etape 1 : réalisation de la gamme étalon

Des solutions mères de substrats (SUB 10X) et d'enzymes (ENZ 50X) sont réalisées extemporanément (conservation, 1 semaine à 4°C) et sont dilués avant utilisation respectivement à 1X et 2X :

SUB 10X	400 mg de BSCh 200 mg de DTNB 100 mg de NaHCO ₃ 50 mL d'HBSS	ENZ 50X	100mg 50ml d'HBSS
SUB 1X	1mL SUB10 + 9 mL HBSS	ENZ 2X	1mL ENZ50 + 49mL HBSS

Dilutions : La première dilution du POX (solution à 100mM) se fait dans l'éthanol à l'aide de pipettes à déplacement positif M100 (Gilson®) (24 µL POX pur + 976 µL d'éthanol 99,6%) puis les dilutions sérielles 1/10 suivantes sont réalisées dans de l'HBSS afin d'obtenir obtenir une solution à 1µM. Cette solution est ensuite utilisée pour préparer les solutions utilisés pour la gamme étalon :

POX (nM)	Volume à prélever de POX 1µM	HBSS	qsp
250	250	750	1000
220	220	780	1000
200	200	800	1000
180	180	820	1000
160	160	840	1000
140	140	860	1000
120	120	880	1000
100	100	900	1000
80	80	920	1000
50	50	950	1000
20	20	980	1000
0	0	1000	1000

Protocole d'incubation : 20 μ l de chacune des solutions sont déposés dans une plaque 96 puits et complétée par 180 μ l d'enzyme (ENZ2) (= 2 à 25nM finaux). La plaque est couverte par du parafilm et laissé à incuber 2h à température ambiante (20-25°C contrôlée par un climatiseur).

Protocole de lecture : 2h après l'activité enzymatique est déterminée à l'aide d'un spectromètre UV-visible (EON, Biotek). Pour cela les plaques sont incubées 3min à 30°C puis 50 μ l de substrats sont ajoutés et l'activité enzymatique mesurée par spectrométrie à 400nm.

Note : avant incubation des échantillons avec l'enzyme, l'activité enzymatique est vérifiée en incubant 20 μ l d'HBSS avec 180 μ l d'enzyme. L'activité de l'enzyme est validée si $0,8 < DO/min < 1,5$.

Détermination de la concentration en POX d'échantillons inconnus : l'activité enzymatique est exprimée en $\Delta DO/min$. Un témoin sans OP est utilisé afin de déterminer l'activité enzymatique initiale. Le rapport de l'activité enzymatique avec/sans OP permet de donner le pourcentage d'activité enzymatique. Afin d'obtenir un domaine linéaire, le logarithme népérien de ce rapport est ensuite calculé et exprimé en fonction de la quantité de paraoxon de l'échantillon de la gamme (Figure P). La linéarité de cette courbe pour le POX s'étend de 0 à 25nM.

La droite d'équation permettra donc dans le cas d'échantillons à doser de recalculer la concentration inconnue en POX (x) grâce à y, l'activité enzymatique en présence de l'échantillon mesurée par le spectromètre.

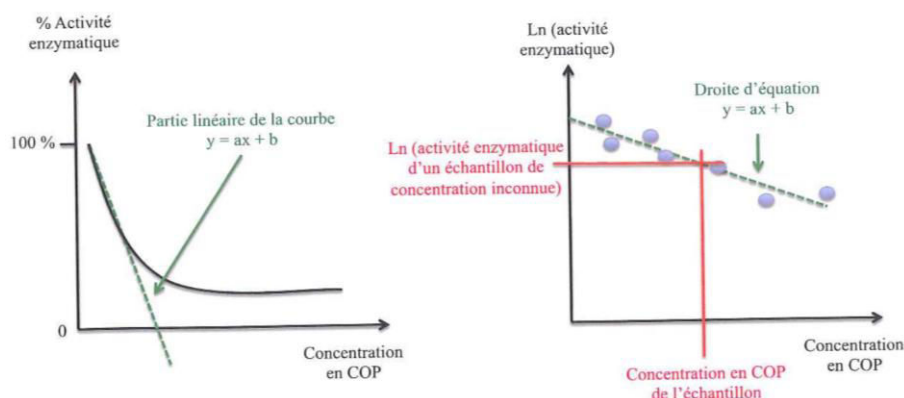


Figure P : Courbe étalon exprimé en %activité enzymatique en fonction de la concentration en OP (gauche) et en logarithme de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en OP de la gamme (droite).

2- Etape 2 : dosage des prélèvements

Les échantillons inconnus sont dilués dans l'HBSS afin de doser un échantillon dont la concentration en POX est dans 80% du domaine de la gamme (2,5 à 22,5nM) (en général 3 points de dilution 1/2/4 au 10^è, 100^è ou 10 000^è). Le protocole d'incubation et de lecture est identique à celui de la gamme étalon.

3- Calcul des concentrations en POX dans les échantillons

Pour chaque puits, la DO/min déterminée est convertie en % d'activité de l'enzyme (%A) par rapport au 100% de l'enzyme témoin, puis le logarithme correspondant $\ln(\%A)$ est calculé. La concentration en POX est obtenue d'après la gamme d'étalonnage. La concentration dans le milieu de survie (volume de prélèvement = 400 μ l) est calculée en multipliant la concentration dans l'échantillon par le facteur de dilution appliqué. La moyenne de toutes les dilutions effectuées à partir du même échantillon est calculée. Ce résultat est ensuite transformé en pM, en déterminant la concentration dans le volume total de la cellule de diffusion (volume total de 4 à 5 ml). La concentration obtenue est corrigée par un calcul permettant de prendre en compte les différents prélèvements du milieu de survie au cours de l'expérimentation (Equation C, exemple d'un échantillon prélevé à $t = 6h$) :

$$C_{vc} = C_{POX\ t=6h} + (\Sigma (C_{POX\ t=1h,2h,3h,4h,5h}) \times (V_p/V_c)) \text{ (eq. C)}$$

avec :

C_{vc} : Concentration en POX (pM), avec correction de volume

C_{POX} : Concentration en POX dans la cellule de diffusion

V_p : Volume du prélèvement (400 μ l)

V_c : Volume de la cellule (4-8 ml)

Enfin, le pourcentage de dose absorbée (% Q0) est déterminé en faisant le rapport entre la concentration corrigée (pM) et la concentration de POX déposée sur la membrane (4,9 μ L). Ce pourcentage est déterminé sur chaque cellule, et pour tous les temps de prélèvements. Après avoir calculé la moyenne et l'écart type de l'ensemble des résultats, les courbes % Q0 = f(temps) sont tracées pour chaque produit.

4- Mesure de l'efficacité

La cinétique de pénétration (% Q0 = f(temps) permet d'extrapoler les deux paramètres suivants (Figure Q) : le flux maximum J_{max} qui correspond à la pente de la courbe quand le flux devient maximum et constant et le temps de latence (λ) qui correspond à l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses. Q_{max} (dose maximum) correspond à la quantité retrouvée dans le milieu récepteur à la fin de l'expérience (exprimé en %Q0).

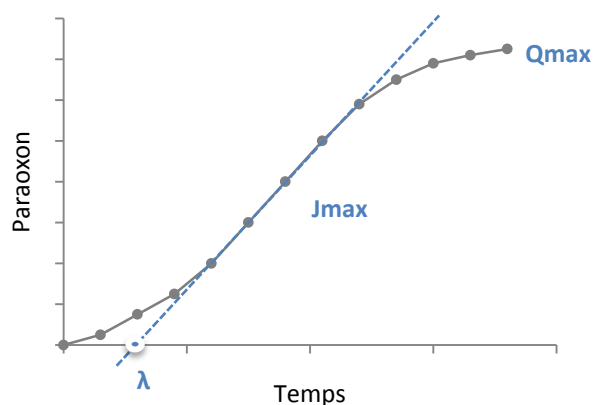


Figure Q : Cinétique type de pénétration.

De ces différents paramètres peut être calculé 2 ratios :

$$PR \text{ (protective ratio)} = \frac{Q_{max_{témoin}}}{Q_{max_{protégé}}}$$

(rapport des moyennes)

$$E \text{ (ratio E)} = \frac{\% \lambda}{\% J_{max}}$$

(% calculé par rapport à la moyenne des contrôles non protégés)

Une formule est efficace si elle : diminue le flux maximum (J_{max}) et Q_{max} et/ou augmente le temps de latence (λ). Ainsi, plus une formule est efficace plus J_{max}/Q_{max} sont petit et λ grand et donc PR ou E sont grands (et significativement supérieur à 1). Lorsque la méthode enzymatique ne permet pas de détecter de paraoxon (limite inférieure = 5nM) dans le milieu récepteur à la fin de l'expérience la formule est très efficace mais aucun J_{max} , λ , Q_{max} et E ne peut être calculé, nd est alors noté dans le texte.

Egalement le coefficient de variation (CV) peut être calculé pour évaluer la reproductibilité des résultats selon la formule suivante :

$$CV (\%) = \frac{\text{ecart type}}{\text{moyenne}} * 100$$

5- Analyses statistiques

Les analyses statistiques suivantes sont réalisées :

- le test ANOVA suivi du post-hoc de Dunnett permet la comparaison entre les échantillons protégés par rapport aux échantillons témoins (contrôle, membrane non protégés).
- le test ANOVA suivi du post-hoc de Tukey permet la comparaison par paire (1) entre les différentes formules pour une même condition ou (2) des formules selon différents paramètres (effet-dose de la formule, temps d'exposition, conditions occlusive/non occlusive, effet du vieillissement, etc.).

Le logiciel XLSTAT est utilisé. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives. Toutes les valeurs sont présentées comme une moyenne $\pm$ écart type des valeurs.

Annexe 6.1 : Protocole de pénétration et d'efficacité des épidermes humains reconstruits

1- Produits chimiques

L'éthyle Paraoxon (> 90%), Caféine (>99%), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7.3), Horse butyrylcholinesterase (BChE, 7,8U/mg), S-butyrylthiocholine iodide (BCh, >98%), 5,5'-dithiobis (2-nitro-benzoic-acid (DTNB, >98%), sodium bicarbonate (>99,5%) et éthanol absolu (> 99,8%) ont été acheté chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2- Les épidermes humains reconstruits

Les épidermes reconstruits sont achetés chez EpiSkin (Lyon, France) :

- EpiSkin 1,07cm²
- SkinEthic RHE 0,5cm² (paraoxon) et 4cm² (caféine)

Le jour de la réception et en conditions stériles (PSM II), les épidermes sont retirés de leur support en gélose et incubés 1 nuit à 37°C, 5% CO₂ et 98% d'humidité dans du milieu de maintenance neuf correspondant dans des plaques 12 puits (EpiSkin, 3mL ou 4 mL) ou 24 puits (SkinEthic, 0,5mL (0,5cm²) et 3mL (4cm²)).

3- Les conditions environnementales

Les études *in vitro* ont été réalisées sous une sorbonne chimique à température ambiante (22±2°C). L'humidité de la pièce est comprise entre 30% et 65% et n'a pas changé de plus de 6% au cours de la même expérience. Les compartiments récepteurs ont été immergés dans un bain thermostaté afin d'obtenir une température en surface des épidermes de 32±1°C.

4- Protocole sur épidermes reconstruits

Les épidermes ont été utilisé directement en insert. Les trous entre les insert et les bords de la plaque ont été fermés avec du parafilm afin d'éviter l'évaporation du milieu contenu dans le compartiment récepteur.

4.1. Etudes de la perméabilité

5mg/cm² de paraoxon (pur) ou 100µg/cm² de caféine (1% dans l'eau) sont appliqués sur les épidermes après équilibration (32±1°C en surface). L'étude vis-à-vis de la caféine est réalisé sur EpiSkin 1,07cm² et RHE 4cm² en conditions occlusives avec un prélèvement de 300µl afin d'éviter le séchage du dépôt en surface de l'épiderme. L'étude vis-à-vis du paraoxon (avec et sans mesh) est

réalisée sur Episkin 1,07cm² et RHE 0,5cm² en condition non-occlusive et la totalité du milieu récepteur est renouvelé. Le temps d'exposition est de 24h. Les fractions Surface sont récupérées dans de l'HBSS pour la caféine et de l'éthanol absolu pour le paraoxon. Les fractions Peau (+ Support pour EpiSkin) sont également récupérées dans l'éthanol absolu pour le paraoxon.

4.2. Etude de la mesure de l'efficacité des TPC

Les études d'efficacité consistent au même protocole avec application et séchage des TSP candidats (15mg/cm²) avant application du paraoxon.

A la fin de l'expérience les fractions Surface, Peau et Support sont également récupérées dans de l'éthanol absolu.

5- Dosage des molécules

Pour le paraoxon le même protocole de dosage disponible en annexe 4.2. est utilisé. Le dosage de la caféine a été réalisé par HPLC. La courbe de calibration utilisé est linéaire de 0,1 à 120 µg/mL ($r^2 = 0.99$). Il a également été vérifié par HPLC que la concentration initiale utilisée était bien 1%.

6- Analyses de données

Les mêmes analyses concernant Q_{max} , J_{max} et λ ont été réalisées (annexe 4.1.).

7- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT pour comparer les différents échantillons pour les différents paramètres (λ , J_{max} and $\%Q_{max}$). Les analyses statistiques suivantes sont réalisées :

- le test ANOVA permet une comparaison entre les modèles et les conditions (avec ou sans mesh)
- le test ANOVA suivi du post-hoc de Dunnett permet la comparaison entre les épidermes protégés par rapport aux épidermes témoins (contrôle sans TPC candidat).

Le logiciel XLSTAT est utilisé. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives. Toutes les valeurs sont présentées comme une moyenne $\pm$ écart type des valeurs.

Publication



New CeO₂ nanoparticles-based topical formulations for the skin protection against organophosphates

Arnaud Zenerino^a, Tifenn Boutard^{b,c}, Cécile Bignon^a, Sonia Amigoni^a, Denis Josse^d, Thierry Devers^c, Frédéric Guittard^{a,*}

^a Université de Nice Sophia-Antipolis, Laboratoire de Physique de la Matière Condensée - UMR CNRS 7336, Groupe Surfaces et Interfaces, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

^b ABC Texture, rue Isaac Newton, 35800 Dinard, France

^c Centre de Recherche de la Matière Divisée (CRMD) – FRE 3520, IUT de Chartres, Université d'Orléans, 21, rue de Loigny la Bataille, 28000 Chartres, France

^d Département d'Incendie et de Secours des Alpes-Maritimes, 140, Avenue de Lattre de Tassigny BP99, 06271 Villeneuve Loubet Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2015

Received in revised form 29 June 2015

Accepted 5 July 2015

Available online 13 July 2015

Keywords:

Topical skin protection

Paraoxon

Cerium dioxide

Nanoparticles

Thickening polymers

ABSTRACT

To reinforce skin protection against organophosphates (OPs), the development of new topical skin protectants (TSP) has received a great interest. Nanoparticles like cerium dioxide (CeO₂) known to adsorb and neutralize OPs are interesting candidates for TSP. However, NPs are difficult to disperse into formulations and they are suspected of toxicological issues. Thus, we want to study: (1) the effect of the addition of CeO₂ NPs in formulations for the skin protection (2) the impact of the doping of CeO₂ NPs by calcium; (3) the effect of two methods of dispersion of CeO₂ NPs: an O/W emulsion or a suspension of a fluorinated thickening polymer (HASE-F) grafted with these NPs. As a screening approach we used silicone membranes as a skin equivalent and Franz diffusion cells for permeation tests. The addition of pure CeO₂ NPs in both formulations permits the penetration to decrease by a 3–4-fold factor. The O/W emulsion allows is the best approach to obtain a film-forming coating with a good reproducibility of the penetration results; whereas the grafting of NPs to a thickener is the best way to obtain an efficient homogenous suspension of CeO₂ NPs with a decreased of toxicological impact but the coating is less film-forming which slightly impacts the reproducibility of the penetration results.

© 2015 Published by Elsevier Ireland Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Human exposure to organophosphates (OPs) can occur in domestic, occupational and incidental contexts. [1–3]. They are used as pesticides (parathion, malathion, etc.) [4] and the most toxic of them are part of chemical warfare agents (CWA) (sarin, VX, etc.) [5]. They inhibit acetylcholinesterases (AChE) present in the central and peripheral nervous system. This results in an accumulation of the acetylcholine (ACh) neurotransmitter that causes paralysis, suffocation and death [5]. The main exposure routes to OPs are respiratory and dermal. Percutaneous penetration can occur for the most persistent of them such as the CWA VX and the pesticide parathion and its oxidized derivative paraoxon (POX) [6–8]. As a consequence, specific protective equipments (suits, face masks, gloves and boot covers) were developed to limit skin contact and absorption of these highly toxic chemicals [9]. However,

they are not adapted to all situations and need to be perfectly adjusted [10]. To reinforce skin protection, topical skin protectants (TSP) or barrier creams (BC) mainly constituted of perfluorinated polymers and reactive compounds have received a great interest [11–16]. Nanoparticles (NPs) materials such as silica, titanium oxide or cerium oxide have been studied for their capacity to adsorb and neutralize toxic compounds including OPs [11,13,15,17–27]. In particular, cerium dioxide (CeO₂) NPs that are used in many fields (solar cells [28], as catalysts [29] and ultraviolet absorbers) [30–32] were demonstrated to hydrolyse phosphate ester bonds [33]. Moreover, it has been shown that the doping of CeO₂ NPs by calcium modify their structure and their physicochemical properties resulting in an increase of their UV filtration [32]. These modifications could also be interesting for our purpose. Then, the introduction of CeO₂ or calcium doped-CeO₂ (Ca²⁺-CeO₂) NPs into emulsions could be a new way to improve the TSP efficacy against OPs [32,34].

Due to potential aggregation of NPs in emulsion, their skin permeation and potential toxicity [35–40], another innovative way is to graft them onto thickening polymers [41].

* Corresponding author.

E-mail address: guittard@unice.fr (F. Guittard).

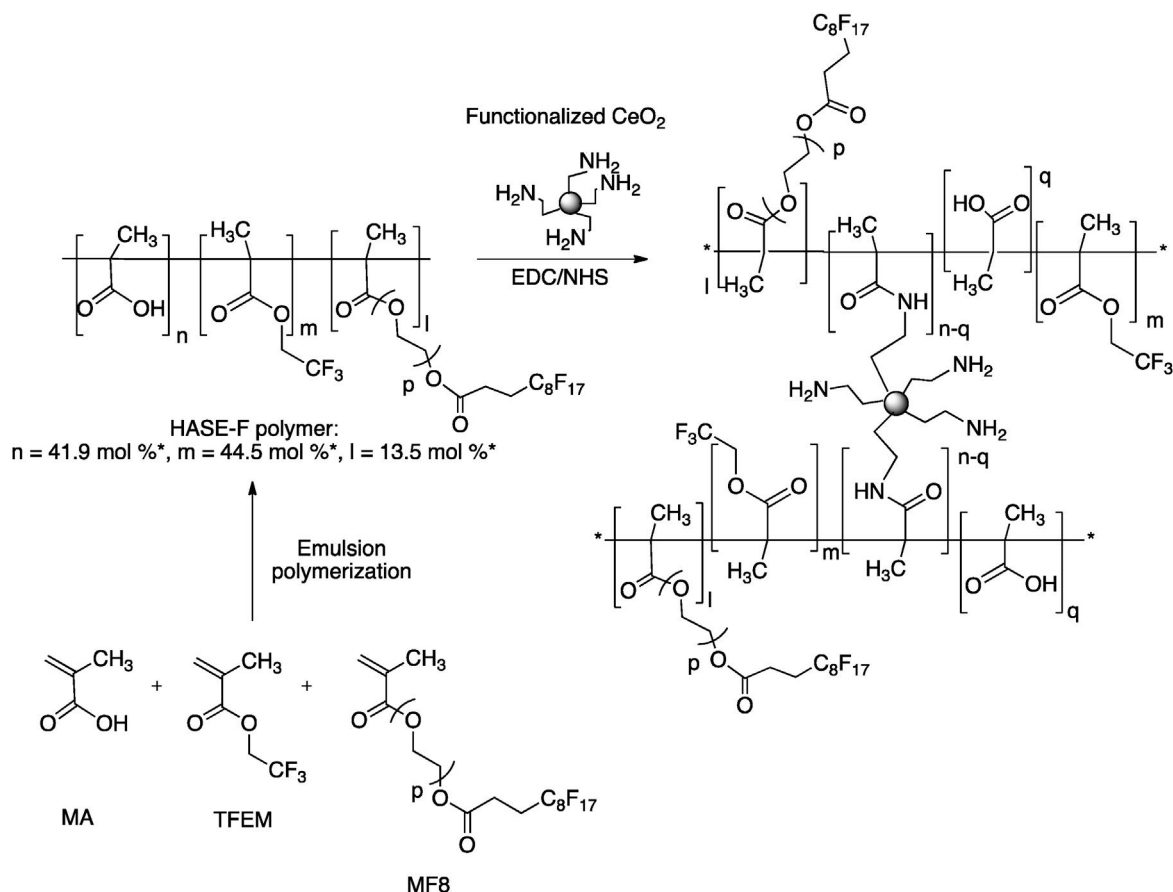


Fig. 1. Grafting of amine-functionalized CeO₂ NPs to the HASE-F polymer.

Thickeners are associative polymers such as hydrophobically modified alkali-soluble emulsion (HASE) that have the ability to form three-dimensional network gels in aqueous solution. The backbone of these copolymers is constituted of methacrylic acid (MA), ethyl acrylate (EA) and a small amount of associative macromonomer (M). The macromonomer contains a hydrophobic pendant group separated from the backbone by a polyethylene glycol (PEG) spacer chain. These thickening agents typically combine two properties: the solubility in alkaline solution due to the presence of carboxylic groups that ionise and provoke an increase of hydrodynamic volume, and the existence of Van der Waals interactions between the polymeric chains for an increase of the aqueous solution viscosity [42–44]. The substitution of hydrocarbon moieties into fluorinated ones in the copolymer leads to very low surface tension copolymers, and often improves the dispersibility of nanoparticles in water [42,43,45–48]. Our recent works demonstrated that the total replacement of ethyl groups in an HASE skeleton by trifluoroethyl groups (HASE-F polymer) leads to solutions with a thickening effect equivalent to the reference hydrocarbon HASE [49]. The covalent grafting of NPs on HASE polymers allows the creation of a nanoparticulate network [41] which can (1) combine both protective/decontamination effects of fluorinated polymers and NPs and (2) decrease NPs impact on the environment [50].

In this work, our goals were: (1) to observe the impact of the doping of CeO₂ NPs by calcium for the skin protection against OPs; and (2) to determine the effect of two dispersion methods on the effectiveness of CeO₂ NPs. The efficacy of two CeO₂ NP-based topical formulations was evaluated: in the first one, CeO₂ NPs were dispersed in an O/W emulsion; in the second one, NPs were grafted onto a fluorinated HASE thickener polymer (HASE-F) (Fig. 1).

Millerioux *et al.* [6,7] showed that in vitro permeation tests using silicone membranes are suitable as first screen tests to select potentially effective TSP against toxic chemicals agents. Thus, efficacy tests were performed with in vitro Franz-type glass diffusion cells using silicone membranes as a support matrix representing the skin. The toxic model OPs agent was paraoxon (POX) since it has similar physicochemical properties than some highly toxic OPs (VX, soman, etc.) [7] but it is much less toxic, making it safer to handle.

2. Experimental

2.1. Reagents and instrumentation

All reagents were obtained from Sigma–Aldrich. Microwave treatment of the samples was realized in a Multiwave 300 (Anton Paar). The crystalline structure was identified by X-ray diffraction (XRD) using the Cu K α wavelength ($\lambda = 0.1542 \text{ \AA}$) of a X'Pert Pro X-ray diffractometer from PANalytical. The specific surface area of the samples was measured by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method with a Nova 1000 high speed gas sorption analyser from Quantachrome. IR spectra were recorded on FTIR Spectrometer PARAGON 1000 from PerkinElmer by potassium bromide pellet method.

2.2. NPs synthesis and characterisation

Pure CeO₂ powders were synthesized by a microwave-hydrothermal method, previously published [39]. Briefly a 0.5 mol/L cerium nitrate solution Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ was mixed with 2 mol/L sodium hydroxide solution at room temperature ($\sim 20^\circ\text{C}$).

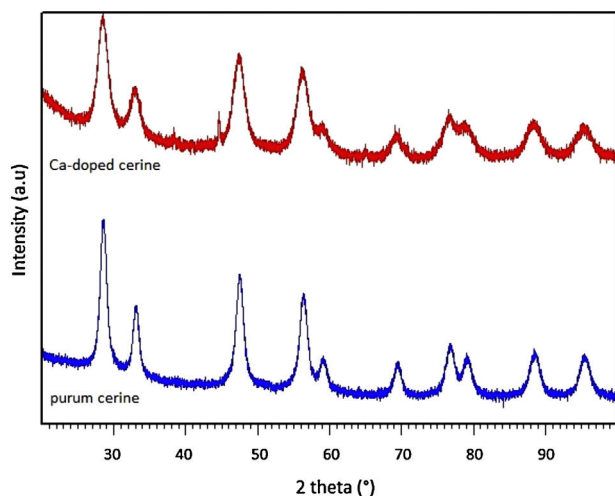


Fig. 2. XRD patterns of the pure (blue) and the doped CeO_2 (red) nanoparticles.

The mixture was introduced in a silicon carbide crucible and treated in a microwave during 15 min at 90°C and maximum pressure of 10 bars. The resulting precipitate was recovered by centrifugation, washed three times with deionized water and dried in air during 3 h. The obtained compound was then treated in air at 500°C during 2 h. The calcium doped CeO_2 powders were synthesized by adding a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solution to the initial solution in order to obtain the final doping at 15 mol.% of Ca^{2+} . This percentage was chosen to achieve the recommended dose of doping to observed a gain in the efficiency of UV protection ($>10\%$) [32].

The XRD patterns of the pure and the doped CeO_2 nanoparticles show that they only contain the CeO_2 phase, which has a fluorite type cubic structure (JCPDS 34-394) (Fig. 2). Physicochemical properties are presented in Table 1. The CeO_2 lattice parameter increases with doping NPs, due to the Ca^{2+} effective ionic radius (1.12Å), which is larger than that of Ce^{4+} (0.97Å). The crystallite size was calculated by Sherrer's formula.

2.3. Dispersion of NPs in emulsions

Three O/W emulsions containing 5% of perfluorinated polymers (PTFE, Polymist F5a), 5% silicones (standard dimethicone) and 10% paraffin associated with or without cerium NPs were prepared: H21, H21CeO_2 and $\text{H21CeO}_2\text{-Ca}^{2+}$. Commonly, the rate of active ingredients is from 2% to 25% of the formula then we chose to use NP at 10%. H21 base did not contain NPs, H21CeO_2 contained 10% of pure CeO_2 NPs and $\text{H21CeO}_2\text{-Ca}^{2+}$ contained 10% of Ca^{2+} -doped CeO_2 NPs.

2.4. Synthesis and characterization of CeO_2 grafted to HASE copolymer

2.4.1. Functionalization of NPs

2 g of CeO_2 NPs, obtained from Truffault et al. [32] (diameter: 8.3 nm, crystallite size: 9.3 nm and lattice parameter: 0.5410) were functionalized as described previously [41]. The amount of amino groups was determined by elemental analysis: 0.86 mmol/g.

IR (main vibrations): $\nu = 3420\text{ cm}^{-1}$ (hydroxyl groups ($-\text{OH}$) of Ce-OH and water), 2925 cm^{-1} (alkyl groups of amino-silane

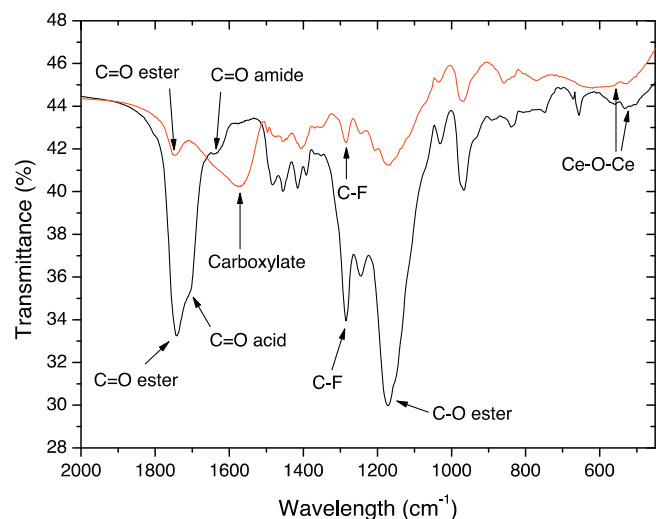


Fig. 3. FTIR spectrum of HASE-F/Ce in neutral (black curve) and basic middle (red curve).

($-\text{CH}_2$)), 1630 cm^{-1} (hydroxyl groups of water ($-\text{OH}$)), 1500 cm^{-1} (N-H vibration of amine), $450\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ (Ce-O-Ce vibration).

2.4.2. Grafting of NPs to the HASE copolymer

Functionalized CeO_2 NPs were grafted on fluorocarbon copolymer previously synthesized (HASE-F containing 13.5 mol.% of long fluorinated chain). The reaction was similar to that realized for silica NPs in a previous work [41] excepted that the equivalent ratio between $-\text{NH}_2$ and $-\text{COOH}$ groups was 0.13 eq (2.6 mmol of $-\text{NH}_2$) for CeO_2 NPs instead of 0.3 eq (5.7 mmol of $-\text{NH}_2$). Fig. 3 represents FTIR spectra of HASE-F/Ce in neutral and basic aqueous solution. In basic medium, the carboxylic acid ionizes and the corresponding carbonyl band is shifted from 1704 cm^{-1} to 1570 cm^{-1} (strong asymmetrical stretching band) whereas the amide carbonyl band stays at 1638 cm^{-1} and the ester one at 1741 cm^{-1} . Moreover, in basic and neutral medium the fluorocarbon band, C-O ester band, and Ce-O-Ce band are at 1285 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} , and 523 cm^{-1} , respectively. IR analysis showed the presence of residual free carboxylic acid functionalities that are necessary for the swelling of the resulting compound in water and the dispersion of nanoparticles in solution.

2.5. In vitro permeation studies

In vitro studies were conducted under a hood at room temperature ($\sim 20^\circ\text{C}$).

2.5.1. Preparation of silicone membranes

A roll of silicone membrane of $400 \pm 100\text{ }\mu\text{m}$ thickness was provided by Samco Silicone Products (Nuneaton, UK). On the day of experiment, it was cut into 9.42 cm^2 -surface area disks that were then soaked in distilled water for 30 min.

2.5.2. Diffusion cells and receptor fluid

Franz-type glass diffusion cells (Laboratoires VERRE LABO-MULA, Corbas, France) had 2-mL and 4-mL donor and receptor compartments, respectively. The membrane area available for

Table 1
Crystallite size, Lattice parameter and specific surface of CeO_2 and Ca^{2+} -doped CeO_2 .

Compound	Crystallite size (nm)	Lattice parameter (nm)	Specific surface (m^2/g)
CeO_2	10.60	0.5410	10.66
15% Ca^{2+} -doped CeO_2	6.17	0.5414	26.82

Table 2
Efficacy of formulation.

Compound	<i>n</i>	$J_{\max}$ (%Q ₀ /h)	λ (min)	$E = \lambda/J_{\max}$	%Q ₀ (end of exposure)
Silicone membrane	9	0.30 ± 0.05	45 ± 28	1 ^a	1.37 ± 0.22
H21 base	6	0.18 ± 0.02	45 ± 16	1.7 ^a	0.98 ± 0.09
H21 CeO ₂	6	0.13 ± 0.03 [*]	70 ± 7	4.0 ^b	0.53 ± 0.15 [*]
H21CeO ₂ -Ca ²⁺	6	0.10 ± 0.02 [*]	72 ± 23	5.1 ^b	0.42 ± 0.06 [*]
HASE-F polymer	4	0.12 ± 0.04 [*]	106 ± 52	6.2 ^b	0.61 ± 0.11 [*]
HASE-F/Ce polymer	6	0.08 ± 0.05 [*]	86 ± 12	10.7 ^c	0.28 ± 0.26 [*]

Superscript lower case letters show significant differences between each groups (a, b, c) ($p < 0.05$).

^{*} Show significant difference with unprotected control (silicone membrane) (p -value < 0.05).

diffusion was 1.13 cm². Hank's Buffer Saline Solution (HBSS) was used as receptor fluid. The receptor compartments of the diffusion cells were immersed in a water bath setting at 36 °C to get a membrane surface temperature of 32 ± 1 °C on a magnetic stirrer bed. They contained a magnetic stir bar that allowed continuous mixing of the receptor fluid.

2.5.3. Application of formulations

Twenty minutes prior to POX exposure, 5.0 ± 0.3 mg/cm² of emulsions or polymers were applied on the membrane surface as homogeneously as possible with a gloved finger.

2.5.4. Dosing

POX was loaded on the middle of the membranes as a liquid droplet (5 mg/cm², i.e. 4.9 µl) by using a positive displacement pipette (Microman M10, Gilson). The exposure duration was 6 h.

2.5.5. Sampling

Four hundred microliters of receptor fluid (RF) were collected regularly from 1 hour and 30 min to the end of the exposure duration. The replenishment of same volume of fresh receptor fluid was performed at each sampling time.

2.6. Quantification of POX

The concentration of POX in the receptor fluid samples was determined by using an enzymatic method already described [7,51]. A stock solution of POX (100 mM) was prepared by the dilution of neat POX in absolute ethanol and stored at −20 °C. When required it was diluted to yield standard solutions from 1 to 25 nM. Stock solution of horse butyrylcholinesterase (BChE) and butyrylthiocholine iodide (BTCh) were prepared respectively at 1 mg/mL and 25 mM in HBSS and stored at +4 °C. Immediately prior to use, the BChE stock solution was diluted 25-fold (“enzyme solution”) and the BTCh stock solution was diluted 10-times (“substrate solution”). The enzyme control (100% activity) consisted of 980 µl of enzyme mixed to 20 µl HBSS (repetition of 3 different cuvettes). In each cuvette, 20 µL of appropriately diluted samples of unknown POX concentration or standards of known POX concentration were mixed with 980 µl of enzyme. Cuvettes were covered with a sealing tape then incubated for 2 h at room temperature. 100 µL of the substrate was then added to each cuvette and the change in absorbance with time was measured spectrophotometrically at 400 nm over 2 min. Standard curves were obtained by plotting the concentration of POX standards versus the logarithm of the percent of enzyme activity remaining in each set of standards. The concentrations of POX in samples were derived from the linear portion of the calibration curve. All spectrophotometric measurements of enzymatic reaction rates were performed at 30 °C using a UV/VIS spectrophotometer (LAMBDA 35, PerkinElmer).

2.7. Data analysis

The cumulative amount of POX, expressed as percent of the applied dose (%Q₀), was plotted against time. For each replicate, maximal flux ($J_{\max}$) values were calculated from the slope of the graph determined after equilibrium was reached, i.e. when the POX penetration rate became constant and maximum. The intercept of this slope with the x-axis corresponds to the apparent lag time (λ).

2.8. Formulations efficacy

As described in previous works [6,7], we chose to evaluate the barrier efficacy of products against POX from the ratio $E = \lambda/J_{\max}$ (% of control values). Ideally, membranes pre-treated with an effective TSP should delay (higher λ) and slow down (lower $J_{\max}$) the permeation of targeted chemicals. Formulations with E values higher than 1 (i.e. delaying and/or slowing down the permeation of POX) could be potentially effective as TSP. Conversely, products with E values equal to or lower than 1 could be viewed as having no effect or enhancing the permeation of POX, respectively.

2.9. Statistical analysis

Multivariate analysis of variance with the Kruskal–Wallis post-hoc test followed by the Dunn test (two-tailed p -value) comparing unprotected silicone membranes (controls) with protected ones (emulsions or polymers) were performed at each time of the penetration kinetic and for the $J_{\max}$, λ and E parameters. Moreover, one-way ANOVA tests followed by unilateral Dunnett tests were used to determine whether these values were significantly lower or higher than the control group. A p -value lower than 0.05 was considered significant. All values were presented as mean ± SD ($n = 6$). The statistical software was XLSTAT.

3. Results

Firstly, the effect of NP on the efficacy when introduced in emulsion (Fig. 4) or when grafted (Fig. 5) were studied. Secondly, the dispersion of CeO₂ NP in formula vs. in polymeric matrix were compared (Table 2). Due to their standard deviation all λ were considered similar to unprotected controls (Table 2).

3.1. Effectiveness of emulsions

The base emulsion (H21) did not show an effective protection (Fig. 4, Table 2). Emulsion containing pure CeO₂ NPs or Ca²⁺-doped CeO₂ NPs showed the same significant decrease of POX penetration in comparison to unprotected control. Maximal fluxes were 42% (CeO₂) and 33% (CeO₂-Ca²⁺) of the control (Table 2). Amount of POX recovered in the receptor fluid at the end of exposure were 2–3-times reduced (Fig. 4, Table 2). The efficacy of formulated CeO₂ and Ca²⁺-doped CeO₂ NPs were confirmed by their E values being greater than 1 (respectively 4.0 and 5.1).

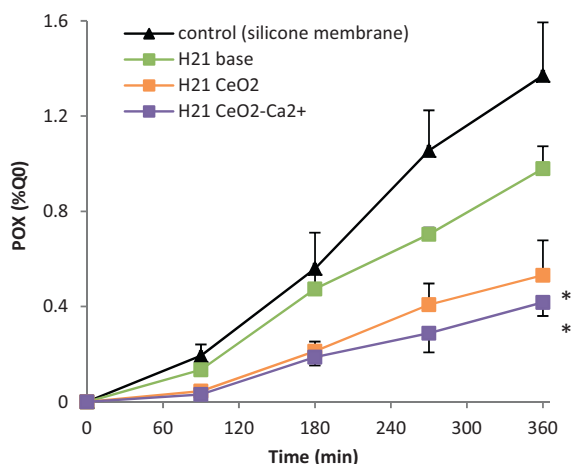


Fig. 4. Cumulative percent of the applied dose of POX penetrated through formulations (mean $\pm$ SD). Stars show significant differences in POX penetration (1 h 30 min–6 h) compared to the unprotected control (silicone membranes) (* $p < 0.005$).

3.2. Effectiveness of polymers

Both polymers showed a significant reduction of the maximal flux, from a 2-fold factor for HASE to 4-fold for CeO₂ NPs grafted to HASE polymer (Table 2). Penetrated percent of POX recovered in the receptor fluid at the end of exposure was 2–5-times reduced (Fig. 5, Table 2). The effectiveness of both polymers was confirmed by their *E* values significantly greater than 1 (Table 2). Moreover, the *E* value of HASE-F/CeO₂ polymer was significantly greater than the *E* value of HASE-F polymer (10.7 vs. 6.2) (Table 2, $p < 0.05$).

3.3. Comparative efficacy of the two dispersions ways of CeO₂ NPs

The comparison of CeO₂ NPs dispersed in emulsion or grafted to HASE-F polymer also provides information on how the grafting influences overall efficacy. *E* values show significant differences between formulated and grafted CeO₂ (4.0 vs. 10.7) (Table 2). Then the grafting positively impacts the efficiency of CeO₂ NPs.

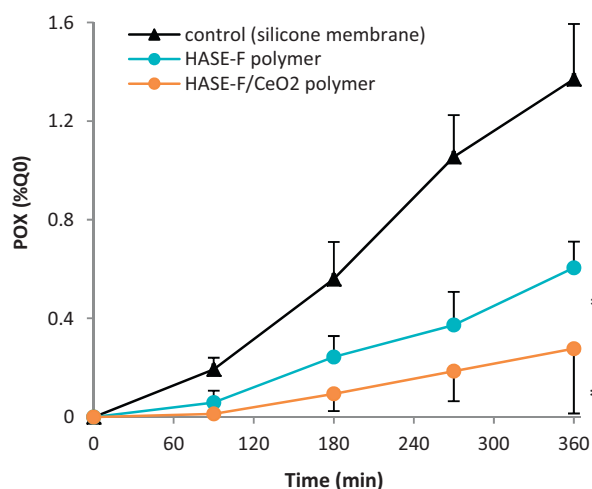


Fig. 5. Cumulative percent of the applied dose of POX penetrated through polymers (mean $\pm$ SD). Stars show significant differences in POX penetration (1 h 30 min–6 h) compared to the unprotected control (silicone membranes) (* $p < 0.05$).

4. Discussion

To evaluate the efficacy against organophosphate POX we use in vitro permeation tests through silicone membranes as first screening tests. In this work, we study the best way to disperse and improve the protectant efficacy of cerium NPs. Firstly we measure the contribution of CeO₂ NPs on the protection efficiency. Secondly, since the doping of CeO₂ NP by calcium enhances the effectiveness for UV protection [32], we study its potential effect on the protection against OPs penetration by comparing effectiveness of pure and doped NPs dispersed in O/W emulsions. Finally, we study the influence of the two dispersion methods on the efficiency. Thereby, we compare the effectiveness of NPs dispersed in emulsion and once grafted to a new fluorocarbon HASE polymer.

4.1. Positive effect of CeO₂ NPs in formulations

The emulsion base (H21 base) is composed of 5% of PTFE, 5% of silicone and 10% of paraffin. These ingredients were chosen for their film-forming properties so as to create a barrier against the POX penetration. Moreover, perfluorinated polymers have a known effectiveness in TSP [16,52] due to their low surface tension energy giving them oleophobic and hydrophobic properties [53]. However, the H21 emulsion used as reference control does not show any efficiency. The ineffectiveness of the base emulsion can be explained: (1) silicone and paraffin are hydrophobic and lipophilic ingredients, they probably create affinity with the tested lipophilic agent POX and (2) the H21 base emulsion is composed with 5% of PTFE. Efficient perfluorinated-based TSP such as SERPACWA are composed with 100% perfluorinated compounds (50% of perfluoropolyether oil and 50% of PTFE) [52]. 5% of PTFE on the H21 base emulsion is not sufficient to provide an effective protection. The addition of the CeO₂ and calcium doped-CeO₂ NPs into H21 base emulsion (H21CeO₂ and H21CeO₂-Ca²⁺) induces a significant effectiveness in comparison to unprotected controls ($E = 4.0$ – 5.1). Therefore, the efficiency of H21CeO₂ and H21CeO₂-Ca²⁺ emulsions in comparison to the H21 base demonstrates that the protection is due to the presence of NPs.

Perfluorinated HASE polymer (HASE-F) show an efficient protection against the penetration of POX ($E = 6.2$). The grafting of NPs onto polymer allows to disperse them easily in water thanks to the rheological properties of the HASE polymers that form physical gels in water at neutral pH. Thereby, neutralized suspension in water containing 10 wt.% of polymer or grafted polymer can be easily spread on silicone membrane. HASE-F/CeO₂ formulation shows a better efficiency in comparison to HASE-F ($E = 10.7$). Therefore, we demonstrate that (1) the application of fluorocarbon HASE polymer on silicone membrane reduces by half the permeation of POX, thanks to the repellent properties of the fluorinated polymer and (2) as well as for emulsions, the presence of CeO₂ NPs significantly reduces the permeation of POX as they are known to be active agents for their adsorption and degradation properties [11,22,25–27,34,54].

Moreover, Millerioux *et al.* [7] tested, with silicone membrane, the protective efficacy of O/W emulsion (BCw $E = 1.03$) and perfluorinated polymers-based cream (BCp $E = 230$) against POX. Our emulsions and polymers containing NPs show a better protective efficiency than BCw due to the addition of NPs (*E* value respectively, 4.0 for H21CeO₂; 5.1 for H21CeO₂-Ca²⁺; 6.2 for HASE-F and 10.7 for HASE-F/Ce). However, both NPs emulsions and polymers are less protective than BCp. BCp is a perfluorinated compounds-based barrier cream composed of 100% fluorinated compounds and difficult to spread, used here as a positive control. Therefore, the introduction of NPs in an emulsion or onto a thickener allows to create an efficient barrier against the penetration of POX that is less

expensive due to a lower amount of perfluorinated compounds and with better spreading properties.

4.2. Effect of the doping by calcium of CeO₂ NP for skin protection

Doping of CeO₂ NPs by calcium increase their UV filtration and makes its better to use for the solar skin protection [32]. It could be interesting to see if some similar properties could be observed for the skin protection against the penetration of OPs. The 15 mol.% of Ca²⁺ doping was chosen to reach the recommended dose to observed a gain in the efficiency of UV protection (>10%) [32]. H21CeO₂ and H21CeO₂-Ca²⁺ have the same protection efficiency (respectively, $E = 4.0$ and 5.1). The compared efficiency between both type of NPs introduced in emulsion does not highlight any enhanced efficiency of Ca²⁺-doped CeO₂. Thus, the doping and the observed modifications of physicochemical properties are not sufficient to impact significantly the effectiveness of CeO₂ NPs in the case of OP skin protection.

The advantage of the emulsion formulation is to disperse active ingredients (NPs) in a matrix at lower cost and with good spreadability. Moreover, thanks to the presence of the ingredients, the coating is homogenous and film-forming that allows a good reproducibility of the results. Indeed, at the end of exposure, the relative standard deviation ($RDS = SD/mean$) of the percent of the initial dose (%Q₀) is nearly the same as unprotected control (16%): H21, 9%; H21CeO₂, 21%; H21CeO₂-Ca, 14%. But, due to their size and their high active surface NPs aggregate easily in aqueous solution making its difficult to realize homogeneous dispersions. Moreover, at the nano-state they can be an issue for safety assessments [35–40]. In that context, we propose a new approach to disperse NPs in formula: their covalent grafting onto HASE polymers that limit their toxicological impact on the environment [50].

4.3. Efficiency of CeO₂ NPs in emulsion or grafted to a thickening polymer

Since pure and calcium doped-CeO₂ NPs having the same protection, we choose to graft only the pure NPs. The advantages of the grafting are (1) to conserve the high active surface of NPs by better dispersing NPs and keeping them at the individual state [41] and (2) to limit the potential toxicological impact thanks to the covalent grafting of NP on a polymeric matrix [50]. The dispersion by grafting NPs to a thickening polymer ($E_{HASE-F/CeO_2} = 10.7$) show a better effectiveness than the dispersion in emulsion ($E_{H21CeO_2} = 4.0$). However, the deposit of the grafted polymer can slightly crack during the drying. Indeed, at the end of exposure, the relative standard deviation ($RDS = SD/mean$) of the percent of the initial dose (%Q₀) is 5-time higher for the HASE-F/CeO₂ (92%) than the HASE-F (18%, similar to unprotected membranes). The same ratio is observed for the J_{max} (39% for HASE-F/Ce polymer and 19% for the H21CeO₂ emulsion). Although the CeO₂ NPs grafted onto HASE-F polymer show a better effectiveness, the risk of a cracking increases appreciably the standard deviation of our results. Thus, the choice is a compromise between a good effectiveness or a film-forming spreading and a good reproducibility.

5. Conclusion

In this work, we demonstrated that relative to CeO₂ NPs, Ca²⁺-doped CeO₂ NPs do not enhance efficiency for the skin protection against the penetration of OP toxic agent POX. We also studied two ways to integrate CeO₂ NPs in TSP: formulating them into O/W emulsions or grafting them on the fluorocarbon associative polymer (HASE-F). These two formulations were more effective in comparison to their base (H21 base and HASE-F polymer): the use of

NPs enhances protection properties. This tendency must be verified by other *in vitro* tests using excised pig or human skin.

In conclusion, the emulsion formulation is the best way to obtain film-forming coating allowing a good reproducibility of the penetration results. However, the use of free NPs as an active ingredient has two main issues: they can easily aggregate in emulsion and they can induce a possible healthy risk since NP penetration and accumulation in biological membranes is suspected. On the contrary, the grafting of NPs on fluorinated polymeric matrix link them covalently to macromolecules that allows to disperse them homogeneously without any toxicological issues of the NPs. But, the deposit cracks at drying and thus the reproducibility is impacted. Therefore, the best way to disperse NPs could be to introduce the grafted polymer in a film-forming formula.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge Direction Générale de l'Armement for their grant and support.

References

- [1] J.K. Smart, History of Chemical and biological warfare: an american perspective. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, in: F.R. Sidell, E.T. Takafuji, D.R. Franz (Eds.), From the Textbook of Military Medicine, 1997, Chapter 2.
- [2] T. Okumura, K. Taki, K. Suzuki, T. Satoh, The Tokyo Subway Sarin Attack: Toxicological Whole Truth, in: C. Ramesh Gupta (Ed.), From the Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 2009, Chapter 4.
- [3] United Nations Mission to Investigate Allegations of the Use of Chemical Weapons in the Syrian Arab Republic Report on the Alleged Use of Chemical Weapons in the Ghouta Area of Damascus on 21 August 2013.
- [4] K. Musilek, M. Dolezal, F. Gunn-Moore, K. Kuca, Design, evaluation and structure–activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides, Med. Res. Rev. 31 (2011) 548–575.
- [5] A. Watson, D. Opreko, R. Young, V. Hauschild, J. King, K. Bakshi, et al., Organophosphate Nerve Agents, in: C. Ramesh Gupta (Ed.), From the Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 2009, Chapter 6.
- [6] J. Millerioux, C. Cruz, A. Bazire, G. Lallement, L. Lefeuvre, D. Josse, *In vitro* selection and efficacy of topical skin protectants against the nerve agent VX, Toxicol. In Vitro 23 (April) (2009) 539–545.
- [7] J. Millerioux, C. Cruz, A. Bazire, V. Polly, G. Lallement, L. Lefeuvre, et al., Evaluation of *in vitro* tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds, Toxicol. In Vitro 23 (February) (2009) 127–133.
- [8] V. Vallet, C. Cruz, J. Licausi, A. Bazire, G. Lallement, I. Boudry, Percutaneous penetration and distribution of VX using *in vitro* pig or human excised skin validation of demeton-S-methyl as adequate simulant for VX skin permeation investigations, Toxicology 246 (April (3)) (2008) 73–82.
- [9] F.K. Chang, M.L. Chen, S.F. Cheng, T.S. Shih, I.F. Mao, Field protection effectiveness of chemical protective suits and gloves evaluated by biomonitoring, Occup. Environ. Med. 64 (November) (2007) 759–762.
- [10] D.H. Brouwer, R.J. Aitken, R. Oppl, J.W. Cherrie, Concepts of skin protection: considerations for the evaluation and terminology of the performance of skin protective equipment, J. Occup. Environ. Hyg. 2 (2005) 425–434.
- [11] O. Koper, K.J. Klabunde, Reactive nanoparticles as destructive adsorbents for biological and chemical contamination, US Patent WO 01/78506 A1, 2001.
- [12] E.H. Braue, S.T. Hobson, J. White, R. Bley, Actives topical skin protectants using polyoxometallates, US Patent 6,420,434 B1, 2002.
- [13] S.T. Hobson, E.H. Braue, E.K. Lehnert, K.J. Klabunde, O.P. Koper, S. Decker, Active topical skin protectants using reactive nanoparticles, US Patent 6,403,653 B1, 2002.
- [14] E.H. Braue, M.M. Mershon, C.R. Braue, R.A. Way, Active topical skin protectants containing S-330, US Patent 6,472,438 B1 2002.
- [15] S.T. Hobson, E.H. Braue, E.K. Lehnert, K.J. Klabunde, S. Decker, C.L. Hill, et al., Active topical skin protectants using combinations of reactive nanoparticles and polyoxometallates or metal salts, US Patent 6,410,603 B1 2002.
- [16] R.P. Chilcott, C.H. Dalton, I. Hill, C.M. Davison, K.L. Blohm, E.D. Clarkson, et al., Evaluation of a barrier cream against the chemical warfare agent VX using the domestic white pig, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 97 (July) (2005) 35–38.
- [17] S.T. Lin, K.J. Klabunde, Adsorption and decomposition of phosphorus compounds, Langmuir 1 (1985) 600–605.
- [18] Y.-X. Li, O. Koper, M. Atteya, K.J. Klabunde, Adsorption and decomposition of organophosphorus compounds on nanoscale metal oxide particles. *In situ*

- GC–MS studies of pulsed microreactions over magnesium oxide, *Chem. Mater.* 4 (1992) 323–330.
- [19] S. Sundarajan, S. Ramakrishna, Fabrication of nanocomposite membranes from nanofibers and nanoparticles for protection against chemical warfare stimulants, *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 8400–8407.
 - [20] A. Saxena, A.K. Srivastava, B. Singh, A.K. Gupta, M.V.S. Suryanarayana, P. Pandey, Kinetics of adsorptive removal of DECIIP and GB on impregnated Al_2O_3 nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* 175 (2010) 795–801.
 - [21] G.W. Wagner, L.R. Procell, R.J. O'Connor, S. Munavalli, C.L. Carnes, P.N. Kapoor, et al., Reactions of VX, GB, GD, and HD with nanosize Al_2O_3 . Formation of aluminophosphonates, *Am. Chem. Soc. 123* (2001) 1636–1644.
 - [22] A. Saxena, A.K. Srivastava, B. Singh, A. Goyal, Removal of sulphur mustard, sarin and simulants on impregnated silica nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* 211–212 (2012) 226–232.
 - [23] B. Cojocaru, V.I. Parvulescu, E. Preda, G. Iepure, V. Somoghi, E. Carbonell, et al., Sensitizers on inorganic carriers for decomposition of the chemical warfare agent yperite, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4908–4913.
 - [24] Y.-X. Li, K.J. Klabunde, Nano-scale metal oxide particles as chemical reagents. Destructive adsorption of a chemical agent simulant, dimethyl methylphosphonate, on heat-treated magnesium oxide, *Langmuir* 7 (1991) 1388–1393.
 - [25] G.W. Wagner, P.W. Bartram, O. Koper, K.J. Klabunde, Reactions of VX, GD, and HD with nanosize MgO , *J. Phys. Chem. B* 103 (April) (1999) 3225–3228.
 - [26] G.W. Wagner, O. Koper, E. Lucas, S. Decker, K.J. Klabunde, Reactions of VX, GD, and HD with Nanosize CaO : Autocatalytic Dehydrohalogenation of HD, *J. Phys. Chem. B* 104 (June) (2000) 5118–5123.
 - [27] B. Singh, A. Saxena, A.K. Nigam, K. Ganesan, P. Pandey, Impregnated silica nanoparticles for the reactive removal of sulphur mustard from solutions, *J. Hazard. Mater.* 161 (January (30)) (2009) 933–940.
 - [28] A. Corma, P. Atienzar, H. García, J.-Y. Chane-Ching, Hierarchically mesostructured doped CeO_2 with potential for solar-cell use, *Nat. Mater.* 3 (2004) 394–397.
 - [29] L. Vivier, D. Duprez, Ceria-based solid catalysts in organic chemistry, *ChemSusChem* 3 (2010) 654–678.
 - [30] S. Tsunekawa, T. Fukuda, A. Kasuya, Blue shift in ultraviolet absorption spectra of monodisperse nanoparticles, *J. Appl. Phys.* 87 (2000) 1318–1321.
 - [31] S. Tsunekawa, J.-T. Wang, Y. Kawazoe, A. Kasuya, Blueshifts in the ultraviolet absorption spectra of cerium oxide nanocrystallites, *J. Appl. Phys.* 92 (2003) 3654–3656.
 - [32] L. Truffault, T. Ma, T. Devers, K. Konstantinov, V. Harel, C. Simmonard, et al., Application of nanostructured Ca doped CeO_2 for ultraviolet filtration, *Mater. Res. Bull.* 45 (2010) 527–535.
 - [33] M.H. Kuchma, C.B. Komanski, J. Colon, A. Teblum, A.E. Masunov, B. Alvarado, et al., Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles, *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 6 (2010) 738–744.
 - [34] N.M. Zholobak, V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov, A.S. Shaporev, O.S. Polezhaeva, A.Y. Baranchikov, et al., UV-shielding property, photocatalytic activity and photocytotoxicity of ceria colloid solutions, *J. Photochem. Photobiol. B* 102 (January (10)) (2011) 32–38.
 - [35] S. Hackenberg, A. Scherzed, A. Technau, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzkey, et al., Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro, *Toxicol. In Vitro* 25 (April) (2011) 657–663.
 - [36] R.K. Shukla, V. Sharma, A.K. Pandey, S. Singh, S. Sultana, A. Dhawan, ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicol. In Vitro* 25 (February) (2011) 231–241.
 - [37] B.C. Heng, X. Zhao, S. Xiong, K.W. Ng, F.-Y.-C. Boey, J.S.-C. Loo, Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format, *Arch. Toxicol.* 85 (June) (2011) 695–704.
 - [38] F. Dechsakulthorn, A. Hayes, S. Bakand, L. Joeng, C. Winder, In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts, *AATEX* (2008) 397–400.
 - [39] T. Boutard, B. Rousseau, C. Couteau, C. Tomasoni, C. Simonnard, C. Jacquot, et al., Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO_2 , *Mater. Lett.* 108 (October) (2013) 13–16.
 - [40] I. Celardo, M. De Nicola, C. Mandoli, J.Z. Pedersen, E. Traversa, L. Ghibelli, Ce^{3+} ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles, *ACS Nano* 5 (June (28)) (2011) 4537–4549.
 - [41] A. Zenerino, S. Amigoni, E. Taffin de Givenchy, D. Josse, F. Guittard, New fluorinated hybrid organic/inorganic water soluble polymeric network, *Polymer* 54 (October) (2013) 6089–6095.
 - [42] S. Dai, K.C. Tam, R.D. Jenkins, Light Scattering of hydrophobically modified alkali-soluble emulsion (HASE) polymer: ionic strength and temperature effects, *Macromol. Chem. Phys.* 202 (January (1)) (2001) 335–342.
 - [43] K. Nagashima, V. Strashko, P.M. Macdonald, R.D. Jenkins, D.R. Bassett, Diffusion of model hydrophobic alkali-swellaable emulsion associative thickeners, *Macromolecules* 33 (December) (2000) 9329–9339.
 - [44] W. Ng, K. Tam, R. Jenkins, Rheological properties of methacrylic acid/ethyl acrylate co-polymer: comparison between an unmodified and hydrophobically modified system, *Polymer* 42 (January) (2001) 249–259.
 - [45] F. Petit, I. Iliopoulos, R. Audebert, S. Szönyi, Associating polyelectrolytes with perfluoroalkyl side chains: aggregation in aqueous solution, association with surfactants, and comparison with hydrogenated analogues, *Langmuir* 13 (August) (1997) 4229–4233.
 - [46] Y. Li, P. Li, J. Wang, Y. Wang, H. Yan, C. Dong, et al., Thermodynamics of micellization for partially fluorinated cationic gemini surfactants and related single-chain surfactants in aqueous solution, *J. Colloid Interface Sci.* 287 (July (1)) (2005) 333–337.
 - [47] R. Oda, I. Huc, D. Danino, Y. Talmon, Aggregation properties and mixing behavior of hydrocarbon, fluorocarbon, and hybrid hydrocarbon-fluorocarbon cationic dimeric surfactants, *Langmuir* 16 (December) (2000) 9759–9769.
 - [48] M. Pabon, J.M. Corpart, Fluorinated surfactants: synthesis, properties, effluent treatment, *J. Fluorine Chem.* 114 (April) (2002) 149–156.
 - [49] O. Odde, S. Amigoni, E. Taffin de Givenchy, P. Reeve, Y. Duccini, F. Guittard, Influence of fluorinated segments of variable length on the thickening properties of a model HASE skeleton, *J. Appl. Polym. Sci.* 120 (June (5)) (2011) 2685–2692.
 - [50] L. Clément, A. Zenerino, C. Hurel, S. Amigoni, E. Taffin de Givenchy, F. Guittard, et al., Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles, *Sci. Total Environ.* 450–451 (April (15)) (2013) 120–128.
 - [51] W.K. Loke, B. Karlsson, L. Waara, A.G. Nyberg, G.E. Cassel, Enzyme-based microassay for accurate determination of soman in blood samples, *Anal. Biochem.* 257 (March (1)) (1998) 12–19.
 - [52] M.J. McCrerry, Topical skin protectant, US Patent 5,607,979, 1997.
 - [53] A. Zenerino, T. Darmanin, E. Taffin de Givenchy, S. Amigoni, F. Guittard, Connector ability to design superhydrophobic and oleophobic surfaces from conducting polymers, *Langmuir* 26 (August (17)) (2010) 13545–13549.
 - [54] S. Yabe, Cerium oxide for sunscreen cosmetics, *J. Solid State Chem.* 171 (March (1)) (2003) 7–11.

Résumé

Les agents chimiques de guerre et leurs dérivés pesticides sont des molécules toxiques qui provoquent une incapacité temporaire ou des dommages permanents allant jusqu'à la mort de l'individu. Une des voies majeures de la contamination est la pénétration cutanée. La protection de la peau semble donc importante pour prévenir de ces dangers. Cette thèse concerne l'élaboration de nouveaux topiques protecteurs cutanés contenant des polymères HASE fluorés greffés avec des nanoparticules de silice, dioxyde de cérium ou dioxyde de titane. Dans un premier temps les actifs ont été synthétisés en grosse quantité et leurs propriétés oléophobes améliorées. Les tests toxicologiques ont montré que les actifs n'étaient pas irritants pour la peau et non toxiques pour l'environnement. La formulation de ces polymères a permis le développement de deux nouvelles crèmes barrières contre la pénétration du paraoxon dont l'efficacité est dépendante de la présence des nanoparticules. Le greffage des nanoparticules à un polymère HASE fluoré et leur formulation a donc permis le développement de nouveaux topiques efficaces. L'évaluation de l'efficacité a été réalisée sur membranes artificielles et confirmée sur explants de peaux humaines. Enfin, le peu de disponibilité des explants de peaux humaines a motivé le développement d'un modèle d'efficacité utilisant des épidermes humains reconstruits.

Abstract

Chemical warfare agents and pesticides are toxic molecules causing temporary incapacitation or permanent harms leading to the death of people. One of the major routes of contamination is the percutaneous penetration. Skin protection is important to prevent these dangers. The aim of this thesis is to develop new active topical skin protectants based on nanoparticular networks containing fluorinated HASE polymers grafting with silica, cerium or titanium dioxides nanoparticles. First, polymers were synthesized in larger quantity and their oleophobic properties improved. Toxicological studies have showed that these compounds are non-irritant and non-toxic for the environment. The formulation of these polymers has led to the elaboration of two new barrier creams against paraoxon penetration whose efficiency is dependent on the presence of nanoparticles. Therefore, the grafting of nanoparticles to fluorinated HASE polymer and their formulation have enabled the development of new active topical skin protectant. Efficiency evaluation was done using artificial membranes and was confirmed on *ex vivo* human skin. The limited availability of human skin explants has motivated the development of a new efficiency model using reconstructed human epidermis.