



HAL
open science

Évaluation de l'efficacité de dégradation et de décontamination cutanée du CeO₂ vis-à-vis d'un composé organophosphoré, le Paraoxon

Alicia Salerno

► **To cite this version:**

Alicia Salerno. Évaluation de l'efficacité de dégradation et de décontamination cutanée du CeO₂ vis-à-vis d'un composé organophosphoré, le Paraoxon. Biotechnologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1145 . tel-01541051

HAL Id: tel-01541051

<https://theses.hal.science/tel-01541051>

Submitted on 17 Jun 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1145

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale EDISS 205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé)

**Spécialité de doctorat : Sciences pharmacotechniques et
biopharmaceutiques, physicochimie**

Soutenue publiquement le 19/09/2016, par :
Alicia SALERNO

Evaluation de l'efficacité de dégradation et de décontamination cutanée du CeO₂ vis-à-vis d'un composé organophosphoré, le Paraoxon

Devant le jury composé de :

BOCHOT Amélie, Professeur, Université Paris-Sud	Rapporteur
AWITOR Oscar, Professeur, Université d'Auvergne	Rapporteur
JOSSE Denis, Docteur, Service Départemental d'Incendie et de Secours des Alpes-Maritimes	Examineur
MILLERIOUX Jennifer, Docteur, Direction Générale de l'Armement	Examinatrice
BOLZINGER Marie-Alexandrine, Professeur, Université de Lyon	Examinatrice
BRIANÇON Stéphanie, Professeur, Université de Lyon	Directrice de thèse
DEVERS Thierry, Maître de Conférences HDR, Université d'Orléans	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

AVANT PROPOS

Cette thèse a été préparée au sein du laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP, UMR CNRS 5007, Villeurbanne) et du laboratoire d'Interfaces Confinement Matériaux et Nanostructures (ICMN, UMR CNRS 7374, Chartres) grâce au financement de la Direction générale de l'armement (DGA) et du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

En premier lieu, je remercie mes deux directeurs de thèse, Stéphanie Briançon et Thierry Devers, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, pour l'autonomie que vous m'avez accordée et pour m'avoir suivie, que ce soit à Chartres ou à Lyon. Vous m'avez fait rencontrer de nombreuses personnes, toujours bienveillantes, qui ont enrichi ce travail.

Je souhaite également remercier Denis Josse, pour avoir été présent durant ces trois années et pour ses précieux conseils.

Je remercie Marie-Alexandrine Bolzinger, pour toujours avoir été disponible et pour sa relecture minutieuse des articles.

Je remercie Jennifer Millerieux pour avoir accepté d'examiner ce travail, pour les échanges et ses conseils durant ces trois années.

Je remercie également Amélie Bochot et Oscar Awitor pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans de nombreuses personnes de différents laboratoires rencontrées lors de cette thèse, enrichissantes et bienveillantes, qui ont énormément apporté et à qui je souhaite exprimer ma profonde gratitude. Tifenn Boutard, pour sa grande gentillesse, son soutien et pour avoir été de bons conseils. David Amans, pour avoir passé de longues heures à m'expliquer les secrets d'un cliché de diffraction et autres et pour m'avoir rendue la physique moins abstraite ! Isabelle Pitault, pour son soutien, sa persévérance et pour m'avoir grandement aidé sur les modèles cinétiques. Stéphanie Pallier, pour m'avoir aidé lors de la préparation des échantillons, les mesures de surface spécifique. Yves Chevalier, pour m'avoir aidé sur l'aspect physico-chimie des formulations. Les études en Raman n'auraient pas été possibles sans l'équipe IVTV de l'Ecole Centrale de Lyon, plus particulièrement Catherine Bosser et Thierry

Hoc. Je remercie toute l'équipe pour leur accueil à Ecully. Je souhaite également remercier l'équipe C-Biosenss et plus particulièrement Oscar Awitor et Christophe Massard pour leur gentillesse et leur accueil à Aubière. Enfin, je remercie le laboratoire de Chimie de l'Environnement (Université d'Aix Marseille), Marie Spiandore, Anne Piram et Pierre Doumenq pour leur collaboration et pour m'avoir accordé leur temps.

Je remercie tous les membres du LAGEP. Je pense en particulier à Jocelyne Pelletier, indispensable à la vie du laboratoire, toujours présente et indispensable (surtout lorsqu'il faut parler à l'oreille de l'HPLC), Nadia Chapel, pour avoir facilité les démarches administratives et pour sa grande gentillesse, Eyad, Geneviève, Géraldine, Pierre, Sébastien, etc.

Un énorme MERCI à ma binôme de ces trois années, Zoé, aussi bien présente dans le laboratoire qu'à l'extérieur, tu as su me faire apprécier Lyon (ce qui n'était pas évident pour une « Parisienne » comme moi !) et rendre ces trois années inoubliables.

Aux autres doctorants et plus particulièrement à Anissa (bonne nouvelle : je serai désormais plus disponible pour des virées à la Vallée Village), Raphael (moi aussi je t'aimais bien au fond), Audrey (la personne la plus motivée et motivante que je connaisse !), Marion, Sabrina, Matthieu, Augustine, ma stagiaire Marie-Alysée... Vous avez tous contribué à cette bonne ambiance au sein du laboratoire.

A mes chers amis de très longues dates : Amélie, Guillaume (merci pour tous ces allers-retours à Lyon et pour m'avoir changé les idées lorsque j'en avais besoin), Carole, Marion, Emilie, Mario, Elodie, Marine, Céline. J'en oublie sûrement mais merci de m'avoir soutenu à un moment ou un autre de ma vie et d'être toujours là malgré la distance.

Enfin, je consacre mes derniers remerciements à ma famille : mon désormais mari Willy, véritable pilier qui a toujours été présents dans les bons et mauvais moments, mon père Jean-Marc, ma sœur Céline, mon frère Mathias, je n'aurai jamais assez de mots pour leur exprimer mon amour. Merci d'avoir été compréhensifs pendant ces trois années (malgré mon caractère). A Sébastien, mes neveu/nièce, ma grand-mère, mes tantes et oncles. A ma belle-famille, pour me gaver de « chek chiene » à chacune de mes venues sur Paris.

Pour ma mère, qui veille sur moi chaque jour et qui m'a donné sa force !

Résumé:

Les neurotoxiques organophosphorés sont des agents chimiques qui font partie de la menace NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique). Ces agents peuvent pénétrer l'organisme par inhalation, ingestion ou absorption cutanée. La principale voie d'absorption des agents chimiques peu volatils (persistants), tels que le VX et l'ypérite, est la voie cutanée. La décontamination des surfaces cutanées non protégées est donc cruciale pour empêcher une absorption trop importante du toxique et une intoxication. Ce travail s'est attaché à évaluer la capacité de nanoparticules d'oxyde de cérium à adsorber et à dégrader les composés organophosphorés, en utilisant un pesticide organophosphoré, le Paraoxon, et un modèle d'étude *in vitro*, la peau d'oreille de porc. Les résultats ont montré que la cérine, sous forme de poudre de nanoparticules, dégrade le Paraoxon mais ne permet pas de réduire son absorption à travers la peau. Des formes liquides contenant la cérine (suspension aqueuse, émulsion de Pickering) ont été développées, pour éviter la dispersion des nanoparticules dans l'air lors de l'utilisation. Elles permettent une élimination plus efficace du Paraoxon, mais l'activité de dégradation de la cérine est très faible. L'influence des conditions de synthèses sur les propriétés physico-chimiques de la cérine en relation avec l'efficacité de dégradation a été étudiée. Les résultats montrent que la surface spécifique est un paramètre clé et que le protocole d'application des décontaminants doit être adapté.

Mots clefs : Dioxyde de cérium, décontamination cutanée, composés organophosphorés, Paraoxon, nanoparticule d'oxyde métallique, pénétration percutanée *in vitro*, peau d'oreille de porc, émulsion de Pickering.

Abstract:

The organophosphorus nerve agents form part of chemical agents which pose the NRBC threat (nuclear, radio, biological, chemical). These agents can get into the body by inhalation, ingestion or skin absorption. The main route of chemical agent absorption which are low volatile, as VX or yperite, is the dermal route. Decontamination of unprotected skin areas is crucial to prevent excessive absorption of toxic. This work aimed at evaluating the ability of cerium oxide nanoparticles to adsorb and degrade organophosphorus compounds by using an organophosphorus pesticide, Paraoxon, and an *in vitro* model, pig-ear skin. The results showed that ceria, in powder form, degraded the Paraoxon but did not allow reducing its absorption through the skin. Liquid forms containing ceria (aqueous suspension, Pickering emulsion) have been formulated in order to avoid the dispersion of particles in the air during its use. While liquid formulations allow more efficient removal of Paraoxon during decontamination process, the degradation activity of ceria was low. The influence of the synthesis conditions on the physicochemical properties of ceria linked to degradation efficiency of nanoparticles has been studied. The results showed that specific surface area is the key parameter and that the application protocol of decontaminants must be adapted.

Keywords: Cerium oxide, skin decontamination, organophosphorus compound, Paraoxon, metal oxide nanoparticle, *in vitro* skin permeation, pig-ear skin, Pickering emulsion.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	5
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ANNEXES	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
CHAPITRE 1 : LA PÉNÉTRATION CUTANÉE DES COMPOSÉS ORGANOPHOSPHORÉS.....	21
1. LES ARMES CHIMIQUES	21
1.1. Historique d'utilisation.....	21
1.2. Présentation des armes chimiques	22
1.2.1. Les agents neutralisants	22
1.2.2. Les agents incapacitants.....	23
1.2.3. Les agents létaux	23
1.2.3.1. Les agents suffocants	24
1.2.3.2. Les gaz hémotoxiques	24
1.2.3.3. Les agents vésicants.....	24
1.2.3.4. Les composés organophosphorés.....	28
1.2.3.4.1. Structure générale des composés organophosphorés.....	28
1.2.3.4.2. Les pesticides organophosphorés	28
1.2.3.4.3. Les neurotoxiques organophosphorés	30
1.3. Les voies d'intoxication	31
1.4. Le mécanisme d'action	32
1.5. Les signes cliniques	33
1.5.1. La crise cholinergique	33
1.5.2. Le syndrome intermédiaire	34
1.5.3. La polyneuropathie.....	34
2. LA PEAU: VOIE D'ENTRÉE POUR LES COMPOSÉS ORGANOPHOSPHORÉS.....	34
2.1. La fonction barrière de l'épiderme.....	35
2.1.1. Le film hydrolipidique.....	36
2.1.2. Le <i>stratum corneum</i>	36
2.1.3. L'épiderme viable	37
2.1.4. Le tissu de soutien : le derme.....	39
2.1.5. La réserve énergétique : l'hypoderme	39
2.1.6. Les annexes cutanées	39
2.2. L'absorption cutanée	41
2.2.1. Les voies d'absorption cutanée	41
2.2.1.1. La voie transépidermique	42
2.2.1.1.1. La pénétration à travers le <i>stratum corneum</i>	42
2.2.1.1.1.1. Les promoteurs d'absorption	43
2.2.1.1.1.2. Le poids moléculaire et la taille des molécules.....	43
2.2.1.1.1.3. L'affinité de la substance pour le <i>stratum corneum</i>	44
2.2.1.1.1.4. La volatilité des agents chimiques	44
2.2.1.1.1.5. La température	45
2.2.1.1.1.6. La localisation anatomique	46
2.2.1.1.2. La pénétration à travers l'épiderme viable	46
2.2.1.1.3. La résorption au niveau du derme	48
2.2.1.2. La voie transannexielle	49

2.2.2.	Les modèles d'étude de la pénétration cutanée <i>in vitro/in vivo/in silico</i>	50
2.2.2.1.	Les études <i>in vivo</i> sur l'homme.....	50
2.2.2.2.	La pénétration cutanée <i>in vivo</i> sur porc	50
2.2.2.3.	Les études <i>in vitro</i>	52
2.2.2.4.	Les simulants de composés organophosphorés	56

CHAPITRE 2 : LA PRISE EN CHARGE DES VICTIMES APRÈS EXPOSITION ET DÉCONTAMINATION 59

1.	LA PRISE EN CHARGE EN CAS DE CONTAMINATION D'UNE ZONE PAR UN ORGANOPHOSPHORÉ.....	59
1.1.	<i>Les intervenants</i>	60
1.2.	<i>Gestion des victimes sur les lieux de l'événement</i>	60
2.	LA PROTECTION	62
2.1.	<i>La protection physique</i>	62
2.2.	<i>Les topiques protecteurs</i>	62
3.	LA DÉTOXIFICATION	64
4.	LA DÉCONTAMINATION	65
4.1.	<i>Evaluation de l'efficacité de décontamination</i>	65
4.1.1.	<i>In vivo</i>	65
4.1.2.	<i>In vitro</i>	66
4.2.	<i>Les dispositifs et les protocoles de décontamination</i>	67
4.2.1.	La solubilisation dans une grande quantité d'eau (douche ou rinçage intense), ou l'eau savonneuse	68
4.2.2.	L'adsorption/absorption de l'agent toxique.....	70
4.2.2.1.	Les poudres adsorbantes	70
4.2.2.2.	Les tissus absorbants	73
4.2.3.	La dégradation/neutralisation des agents chimiques par un actif	75
4.3.	<i>Les facteurs influençant l'efficacité de décontamination</i>	80
4.3.1.	Les propriétés physico-chimiques du décontaminant.....	80
4.3.2.	La durée entre l'exposition à l'agent toxique et la décontamination	81
4.3.3.	Le protocole de décontamination	83

CHAPITRE 3 : LES NANOPARTICULES D'OXYDES MÉTALLIQUES ET LA DÉGRADATION DES AGENTS TOXIQUES 84

1.	PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE DU DIOXYDE DE CÉRIUM.....	84
1.1.	<i>Définition d'un cristal et structure</i>	84
1.2.	<i>La structure du CeO₂</i>	87
2.	VOIES DE SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES DE CeO ₂	88
2.1.	<i>La précipitation</i>	89
2.2.	<i>La méthode sol-gel</i>	91
2.3.	<i>La synthèse par micro émulsion</i>	92
2.4.	<i>La voie hydrothermale/solvothermale</i>	96
2.5.	<i>Influence du solvant de réaction</i>	97
3.	RÉACTIVITÉ DES NANOPARTICULES	99
3.1.	<i>Propriété de surface</i>	99
3.2.	<i>Domaines d'application du CeO₂</i>	100
3.2.1.	Traitement des eaux usées.....	100
3.2.2.	Absorption des UV.....	101
3.2.3.	Application biomédicales	101
3.2.4.	La cytotoxicité du CeO ₂	102
4.	DÉGRADATION DES COMPOSÉS ORGANOPHOSPHORÉS PAR LES NANOPARTICULES D'OXYDES MÉTALLIQUES. 105	
4.1.	<i>Les réactions mises en jeu</i>	105
4.1.1.	L'hydrolyse	105
4.1.2.	L'oxydation	105
4.1.3.	Photocatalyse	105
4.2.	<i>La dégradation d'un agent vésicant : l'ypérite</i>	106
4.3.	<i>La dégradation des neurotoxiques organophosphorés</i>	109
4.4.	<i>La dégradation d'un pesticide organophosphoré : le Paraoxon</i>	112

4.5. Impact de la surface spécifique et des pores des NPs sur la dégradation des agents toxiques	113
CONCLUSION DE LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	115
PARTIE EXPERIMENTALE	117
CHAPITRE 1 : PROTOCOLES POUR L'ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE DÉGRADATION ET DE DÉCONTAMINATION CUTANÉE DES NANOPARTICULES	118
1. EVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE DÉGRADATION DU CeO ₂ VIS-À-VIS DU PARAOXON	119
1.1. Protocole	119
1.2. Traitement des résultats	120
2. EVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE DÉCONTAMINATION CUTANÉE	121
2.1. Préparation des peaux d'oreille	121
2.2. Conditionnement des cellules	121
2.3. Exposition de la peau au Paraoxon	121
2.4. Décontamination cutanée	122
2.5. Cinétique de pénétration cutanée du Paraoxon et distribution dans les différents compartiments 24 h après exposition	122
2.6. La méthode HPLC	124
2.6.1. Répétabilité et reproductibilité	125
2.6.2. Limite de Quantification (LOQ) et Limite de Détection (LOD)	125
2.6.3. Linéarité du Signal	126
2.6.4. Stabilité à -20°C	126
2.6.5. Le facteur de symétrie des pics	127
2.6.6. Spécificité	127
2.7. Evaluation de la pénétration cutanée du Paraoxon <i>in vitro</i>	128
2.8. Efficacité d'un dispositif de décontamination	130
CHAPITRE 2 : EVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE DÉCONTAMINATION CUTANÉE DU CeO₂ VIS-À-VIS DU PARAOXON EN COMPARAISON AVEC TERRE À FOULON ET RSDL	132
1. INTRODUCTION	132
2. MÉTHODES	133
2.1. Synthèse des nanoparticules de CeO ₂	133
2.2. Formulation de la suspension épaissie en CeO ₂	133
2.3. Caractérisation des NPs	133
2.4. Evaluation de l'efficacité de dégradation du CeO ₂ vis-à-vis du POX	134
2.5. Protocole de décontamination cutanée	134
3. RÉSULTATS SOUS FORME D'ARTICLE : <i>IN VITRO</i> SKIN DECONTAMINATION OF THE ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDE PARAOXON WITH NANOMETRIC CERIUM OXIDE CeO ₂	134
4. CONCLUSION SUR L'ARTICLE	160
5. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	160
5.1. Influence de la décontamination sur le flux et de temps de latence du Paraoxon	160
5.2. Influence de différents paramètres lors de la décontamination sur l'efficacité des systèmes	161
5.2.1. Impact du temps d'action des différents systèmes	162
5.2.2. Décontamination cutanée 5 et 30 min après exposition au Paraoxon	164
5.2.3. Impact de la quantité de CeO ₂ appliqué sur l'adsorption et la dégradation du POX en décontamination cutanée	167
5.3. Activité photocatalytique du CeO ₂	168
5.4. Synthèse des principaux résultats	169
CHAPITRE 3 : DÉVELOPPEMENT D'ÉMULSIONS DE PICKERING À PARTIR DU CeO₂, ÉVALUATION DE LEUR EFFICACITÉ DE DÉCONTAMINATION CUTANÉE.	171
1. INTRODUCTION	171

2.	MÉTHODE	172
2.1.	<i>Formulation des émulsions de Pickering</i>	172
2.2.	<i>Caractérisation des émulsions de Pickering</i>	173
2.3.	<i>Protocole de décontamination cutanée</i>	173
2.4.	<i>Pénétration cutanée du CeO₂</i>	174
3.	RÉSULTATS SOUS FORME D'ARTICLE: FORMULATION OF PICKERING EMULSION STABILIZED BY CeO ₂ , APPLICATION FOR SKIN DECONTAMINATION OF THE ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDE PARAOXON	175
4.	CONCLUSION SUR L'ARTICLE.....	201
5.	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES, ACTIVITÉ CATALYTIQUE DU CeO ₂ EN ÉMULSION	202
CHAPITRE 4 : COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES DE DÉGRADATION DU PARAOXON PAR LES NPS DE CeO₂ EN MILIEU AQUEUX.....		204
1.	INTRODUCTION.....	204
2.	MÉTHODES	205
2.1.	<i>Dégradation du POX très dilué</i>	205
2.2.	<i>Dégradation du POX très concentré</i>	206
2.3.	<i>Expression des résultats</i>	206
2.4.	<i>Modèles cinétiques</i>	207
3.	RÉSULTATS SOUS FORME D'ARTICLE: MODEL-BASED OPTIMIZATION OF PARAMETERS FOR DEGRADATION REACTION OF POX USING CeO ₂ NANOPARTICLES IN WATER MEDIA	207
4.	CONCLUSION SUR L'ARTICLE.....	234
CHAPITRE 5 : IMPACT DES CONDITIONS DE SYNTHÈSES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DU CeO₂		235
1.	INTRODUCTION.....	235
2.	MÉTHODES.....	236
2.1.	<i>Synthèse des nanoparticules de CeO₂</i>	236
2.2.	<i>Caractérisation des NPs</i>	237
2.3.	<i>Evaluation de l'efficacité de dégradation du CeO₂ vis-à-vis du POX</i>	237
3.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	238
3.1.	<i>Structure du CeO₂ : surface spécifique, taille des cristallites et des pores</i>	238
3.1.1.	Impact de la pression lors du traitement hydrothermal	240
3.1.2.	Impact de la température et de l'atmosphère lors de la calcination	240
3.2.	<i>Etat de surface</i>	241
3.2.1.	Observations en MET	241
3.2.2.	Mesure en XPS.....	243
3.2.3.	Mesure en FTIR.....	245
3.3.	<i>Dégradation du Paraoxon par les échantillons de CeO₂</i>	247
4.	CONCLUSION.....	249
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....		251
ANNEXES		254
RÉFÉRENCES.....		260

Liste des figures

FIGURE 1 : STRUCTURE CHIMIQUE DES COMPOSES ORGANOPHOSPHORES.....	28
FIGURE 2 : TRANSFORMATION DU PARATHION EN PARAOXON, LE COMPOSE ACTIF	29
FIGURE 3 : MECANISME DE VIEILLISSEMENT DE L'ACHE PAR LE SOMAN (ADAPTE DE SIRIN <i>ET AL.</i> , 2012).....	32
FIGURE 4 : STRUCTURE DE LA PEAU	35
FIGURE 5 : SCHEMA REPRESENTANT LA DESQUAMATION.....	36
FIGURE 6 : ORGANISATION DES LIPIDES DU STRATUM CORNEUM (FORSTER, 2010).....	37
FIGURE 7 : STRUCTURE DE L'EPIDERME	38
FIGURE 8 : LES ANNEXES CUTANEEES.....	40
FIGURE 9 : LES VOIES DE PENETRATION AU TRAVERS DE LA COUCHE CORNEE (LANE, 2013)	41
FIGURE 10 : EFFET DE LA TEMPERATURE CUTANEE SUR L'ABSORPTION A TRAVERS UNE PEAU HUMAINE ABDOMINALE APRES 1H D'EXPOSITION A L'YPERITE RADIOMARQUE (RENSHAW, 1946).....	45
FIGURE 11 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA CINETIQUE DE L'ABSORPTION CUTANEE D'UNE SUBSTANCE.....	47
FIGURE 12: IMAGES D'AUTORADIOGRAPHIES DE PEAUX PRISES IMMEDIATEMENT APRES LA MORT DE PORC EXPOSE AU ¹⁴ C-VX. L'AIRES DES ZONES SOMBRES INDIQUENT LES ZONES OU LE VX EST LOCALISE. LEUR AIRES EST INDIQUEE DANS LE COIN SUPERIEUR GAUCHE. LE TEMPS DE LA MORT DE CHAQUE ANIMAL ETAIT DE 120, 62, 43, 180, 57 ET 42 MIN POUR LES ANIMAUX 1-6, RESPECTIVEMENT (CHILCOTT <i>ET AL.</i> , 2005)	51
FIGURE 13: PHOTOS DE ZONES DE PEAUX DE PORC EXPOSEES AU GAZ MOUTARDE. LES ZONES CONTROLES (EXPOSITION, SANS PROTECTION) SONT SITUEES EN BAS DE LA PHOTO. LES ZONES PROTEGEES PAR UN TOPIQUE PROTECTEUR IB1 PUIS EXPOSEES AU GAZ MOUTARDE SONT DANS LA PARTIE HAUTE. (KADAR <i>ET AL.</i> , 2003).....	52
FIGURE 14: SCHEMA D'UNE CELLULE DE FRANZ.....	52
FIGURE 15 : ABSORPTION CUTANEE <i>IN VITRO</i> DU VX (Q ₀ : 5.7 MG/CM ²) A TRAVERS UNE MEMBRANE DE SILICONE (A), UNE PEAU D'OREILLE DE PORC DERMATOMEET (B) UNE PEAU ABDOMINALE HUMAINE DERMATOMEET (MILLERIOUX <i>ET AL.</i> , 2009B).	55
FIGURE 16 : (A) ABSORPTION CUTANEE <i>IN VITRO</i> DU VX (5 MG/CM ²) A TRAVERS LE CUIR CHEVELU HUMAIN, LA PEAU D'OREILLE DE PORC ET LA PEAU DU CRANE DE PORC. (B) COMPARAISON DE L'EPAISSEUR DE LA PEAU ET DU STRATUM CORNEUM, DIAMETRE FOLLICULAIRE ET LA DENSITE FOLLICULAIRE DE PEAU HUMAINE ET DE LA PEAU DE PORC (ROLLAND <i>ET AL.</i> , 2011).....	56
FIGURE 17 : STRUCTURE CHIMIQUE DU VX, SARIN, ET TABUN AINSI QUE LEURS SIMULANTS (NIMP, PIMP, NEMP, AND NEDPA) (MEEK <i>ET AL.</i> , 2012).	57
FIGURE 18 : SCHEMA GENERAL D'UNE INTERVENTION FACE A UNE ACTION TERRORISTE METTANT EN ŒUVRE DES MATIERES CHIMIQUES (CIRCULAIRE 700 DU SGDN DU 7 NOVEMBRE 2008)	61
FIGURE 19 : SUIVI DES SIGNES CLINIQUES APRES INJECTION DE VX (18 MG/KG) EN SOUS CUTANEE CHEZ LE COCHON D'INDE POUR (A) LE CONTROLE (PAS DE DECONTAMINATION), (B) INJECTION D'UNE PHOSPHOTRIESTERASE (<i>BREVUNDIMONAS DIMINUTA</i> PHOSPHOTRIESTERASE MUTEET) 5 MIN APRES EXPOSITION (WOREK <i>ET AL.</i> , 2014).	66
FIGURE 20 : PHOTO D'UN SYSTEME DE DOUCHE POUR LA DECONTAMINATION MASSIVE APRES EXPOSITION A UN AGENT CHIMIQUE (CHILCOTT, 2014).....	68
FIGURE 21 : PHOTOS D'UN GANT ET FLACON POUFREUR CONTENANT LA TERRE A FOULON	71
FIGURE 22 : POURCENTAGE DE VX RETROUVE DANS LE COMPARTIMENT RECEPTEUR (« RF »), DANS LA PEAU (« SKIN ») ET LA QUANTITE TOTALE ABSORBEE (« TOT ABS ») APRES 6H D'EXPOSITION (5 MG/CM ²). LA DECONTAMINATION A ETE EFFECTUEE 15 MIN APRES EXPOSITION. LES LETTRES ET SYMBOLES INDIQUENT UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE AVEC LE CONTROLE ET ENTRE LES DIFFERENTS ABSORBANTS (JOSSE <i>ET AL.</i> , 2013)	74
FIGURE 23 : CAPACITE D'ABSORPTION (GRAMME D'EAU OU D'HUILE ABSORBEE PAR GRAMME DE SUPPORT TESTE) (CHILCOTT <i>ET AL.</i> , 2001).....	74
FIGURE 24 : PHOTOS DU KIT M291	75
FIGURE 25 : PHOTOS DU KIT RSDL.....	76
FIGURE 26 : STRUCTURE CHIMIQUES DE DIFFERENTES OXIMES	78
FIGURE 27 : (A) HYDROLYSE DU PARAOXON PAR L'ARYLDIALKYLPHOSPHATASE (PARAOXONASE), (B) HYDROLYSE DU DIISOPROPYLFLUOROPHOSPHATE (DFP) PAR LA DFPASE (JOKANOVIC, 2011)	79

FIGURE 28 : POURCENTAGE DE ¹⁴ C-MDI RECUPERE DANS LE STRIPPING APRES LAVAGE DE LA PEAU (WESTER ET AL., 1999). LES TIRETS ROUGES PERMETTENT DE SEPARER LES NETTOYANTS HYDROPHOBES ET LES NETTOYANTS HYDROPHILES.....	81
FIGURE 29 : POURCENTAGE DE VX A LA SURFACE DE LA PEAU, DANS LE STRATUM CORNEUM, DANS L'EPIDERME VIABLE ET DANS LE COMPARTIMENT RECEPTEUR APRES 5, 15, 45 MIN, 2 OU 4 H D'EXPOSITION AU VX (5 MG/CM ²) IN VITRO SUR PEAU D'OREILLE DE PORC (ROLLAND ET AL., 2013).	82
FIGURE 30 : REPRESENTATION D'UN MOTIF ELEMENTAIRE ET DES NŒUDS DANS UN CRISTAL.....	84
FIGURE 31 : REPRESENTATION D'UNE MAILLE SELON LES VECTEURS DE BASE ET LES ANGLES ENTRE CES VECTEURS.....	85
FIGURE 32 : LES 7 SYSTEMES CRISTALLINS ET LES 14 RESEAUX DE BRAVAIS (MILLOT & NIEPCE, 2014).....	86
FIGURE 33 : STRUCTURE 3D DU CeO ₂	87
FIGURE 34 : STRUCTURE DE L'OCTAEDRE ET DE L'OCTAEDRE TRONQUE DU CeO ₂ (WANG & FENG, 2003).	88
FIGURE 35 : IMAGES EN MET DE NANOPARTICULES DE CeO ₂ A DIFFERENTS TEMPS DE REACTION : 5 MIN (GAUCHE), 10 MIN (MILIEU) ET 60 MIN (DROITE). LA PRECIPITATION EST EFFECTUEE A 90°C.	90
FIGURE 36 : SCHEMA DE LA FORMATION DE NANOPARTICULE DE CERIUM PAR LA METHODE MICROEMULSION (ADAPTE DE POURNAJAF ET AL., 2014)	93
FIGURE 37: IMAGES EN MET DE NANOPARTICULES DE CeO ₂ OBTENUS APRES SYNTHESE HYDROTHERMALE DE FORME POLYEDRIQUE, BATONNET ET CUBES (MAI ET AL., 2005)	97
FIGURE 38 : INFLUENCE DE LA CONSTANCE DIELECTRIQUE (ε) SUR LE DIAMETRE DES PARTICULES (D _p) OBSERVE EN MET (CHEN & CHANG, 2004).....	98
FIGURE 39 : SITES REACTIFS A LA SURFACE DES NANOPARTICULES (SHARMA & KAKKAR, 2013).....	99
FIGURE 40 : OXYDATION DU PEROXYDE D'HYDROGENE PAR LA CERINE ET LA REGENERATION PAR REDUCTION DE SUPEROXYDE (CELARDO ET AL., 2011).....	102
FIGURE 41 : DEGRADATION DE L'YPERITE PAR LE CUO:ZNO (PRAVEEN KUMAR ET AL., 2013).....	107
FIGURE 42: REACTION DU CEES A LA SURFACE DU ZRO ₂ (VERMA ET AL., 2014)	108
FIGURE 43 : VOIES DE DEGRADATION DU VX EN FONCTION DU PH (KIM ET AL., 2011, MUNRO ET AL., 1999).....	109
FIGURE 44 : DEGRADATION DU VX PAR UN OXYDE DE METAL (MO) (BANDOSZ ET AL., 2012)	109
FIGURE 45 : DEGRADATION DU SARIN ET DU SOMAN PAR UN OXYDE DE METAL (MO) (ADAPTE DE KIM ET AL., 2011, WAGNER ET AL., 1999)	111
FIGURE 46 : DEGRADATION DU TABUN PAR HYDROLYSE (ADAPTE DE KIM ET AL., 2011 ET MUNRO ET AL., 1999)....	112
FIGURE 47 : DEGRADATION DU PARAOXON EN SOLUTION AQUEUSE	113
FIGURE 48 : VITESSE DE DEGRADATION DE L'YPERITE EN FONCTION DES SURFACES SPECIFIQUES DU TiO ₂ NON DOPE, TiO ₂ -ZR, TiO ₂ -GE (STENGL ET AL., 2012)	114
FIGURE 49 : VITESSE DE DEGRADATION DE L'YPERITE EN FONCTION DU VOLUME DES PORES DU TiO ₂ NON DOPE, TiO ₂ -ZR, TiO ₂ -GE (STENGL ET AL., 2012)	114
FIGURE 50 : DEGRADATION DU PARAOXON EN P-NITROPHENOL EN PRESENCE D'UN CATALYSEUR	119
FIGURE 51 : EVALUATION DE L'EFFICACITE DE DEGRADATION DU CeO ₂ VIS-A-VIS DU PARAOXON.....	120
FIGURE 52 : RECUPERATION DES DIFFERENTES FRACTIONS 24 H APRES EXPOSITION AU PARAOXON.	124
FIGURE 53 : MESURE DU FACTEUR DE SYMETRIE D'UN PIC DE CHROMATOGRAPHIE	127
FIGURE 54 : CINETIQUE DE PENETRATION DU PARAOXON A TRAVERS UNE PEAU D'OREILLE DE PORC PENDANT 24 H LES DONNEES SONT EXPRIMEES EN MOYENNE ± SEM (N= 8).	128
FIGURE 55 : DISTRIBUTION DU PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION (Q ₀ =46,6 μMOL/CM ²). LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN MOYENNE +/- SEM (N = 8).	129
FIGURE 56 : SYNTHESE DES NANOPARTICULES DE CeO ₂ PAR VOIE HYDROTHERMALE.	133
FIGURE 57 : DISTRIBUTION DU PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION (Q ₀ =46,6 μMOL/CM ²) ET UNE DECONTAMINATION 1 H APRES EXPOSITION AVEC 36,4 MG DE CeO ₂ OU 260 μL DE RSDL, CeO ₂ -W OU D'EAU EPAISSIE DONT L'EXCEDENT A ETE RETIRE (NOTATION « SYSTEME DE DECONTAMINATION ») OU NON RETIRE (NOTATION « SYSTEME DE DECONTAMINATION 24H ») (N=8).....	162
FIGURE 58 : FRACTION ABSORBEE DE PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION (Q ₀ =46,6 μMOL/CM ²) ET UNE DECONTAMINATION 1 H APRES EXPOSITION AVEC 36,4 MG DE CeO ₂ OU DE TAF OU 260 μL DE RSDL, CeO ₂ -W OU D'EAU EPAISSIE DONT L'EXCEDENT A ETE RETIRE (NOTATION « SYSTEME DE DECONTAMINATION ») OU NON RETIRE (NOTATION « SYSTEME DE DECONTAMINATION 24H ») (N=8). * INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE (TEST DE MANN-WHITNEY, P<0,05) DE LA FRACTION ABSORBEE DE POX AVEC LE CONTROLE.....	163

FIGURE 59 : QUANTITE DE P-NITROPHENOL PRODUITE APRES 24 H D'EXPOSITION AU PARAOXON ($Q_0=46,6 \mu\text{MOL}/\text{CM}^2$) ET UNE DECONTAMINATION 1 H APRES EXPOSITION AVEC 36,4 MG DE CeO_2 OU DE TAF OU 260 μL DE RSDL, $\text{CeO}_2\text{-W}$ OU D'EAU EPAISSIE DONT L'EXCEDENT A ETE RETIRE (NOTATION « SYSTEME DE DECONTAMINATION ») OU NON RETIRE (NOTATION « SYSTEME DE DECONTAMINATION 24H ») (N=8).	163
FIGURE 60 : DISTRIBUTION DU PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION ($Q_0=46,6 \mu\text{MOL}/\text{CM}^2$) ET UNE DECONTAMINATION 5, 30 MIN OU 1 H APRES EXPOSITION AVEC 36,4 MG DE CeO_2 OU DE TAF OU 260 μL DE RSDL OU $\text{CeO}_2\text{-W}$ (N=8).	165
FIGURE 61 : FRACTION ABSORBEE DE PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION ($Q_0=46,6 \mu\text{MOL}/\text{CM}^2$) ET UNE DECONTAMINATION 5, 30 MIN OU 1 H APRES EXPOSITION AVEC 36,4 MG DE CeO_2 OU DE TAF OU 260 μL DE RSDL OU $\text{CeO}_2\text{-W}$ (N=8). * INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE (TEST DE MANN-WHITNEY, $P<0,05$) DE LA FRACTION ABSORBEE DE POX AVEC LE CONTROLE.	165
FIGURE 62 : (A) DISTRIBUTION DU PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION ($Q_0=46,6 \mu\text{MOL}/\text{CM}^2$) ET UNE DECONTAMINATION 30 MIN APRES EXPOSITION AVEC 36,4 OU 100 MG DE CeO_2 . (B) QUANTITE DE P-NITROPHENOL PRODUITE. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN MOYENNE +/- SEM (N = 4).	167
FIGURE 63 : DETERMINATION DE L'ACTIVITE PHOTOCATALYTIQUE PAR DEGRADATION DE L'ACIDE ORANGE-7 (AO7).	168
FIGURE 64 : ABSORBANCE A 482 NM PENDANT LA PHASE D'ADSORPTION ET DE PHOTODEGRADATION DE $5.10^{-5} \text{MOL}/\text{L}$ D'AO7 PAR 50 MG DE CeO_2	169
FIGURE 65 : PROTOCOLE DE PREPARATION DES EMULSIONS DE PICKERING	173
FIGURE 66 : MISE EN PLACE DE LA CELLULE DE FRANZ POUR L'EVALUATION DE LA PENETRATION CUTANEE DU CeO_2 EN MICROSCOPES CONFOCALE RAMAN.	175
FIGURE 67 : SYNTHESE DES NANOPARTICULES DE CeO_2 PAR VOIE HYDROTHERMALE.	236
FIGURE 68 : IMAGES OBTENUES EN MET DES ECHANTILLONS DE CeO_2	239
FIGURE 69 : EVOLUTION DE LA SURFACE SPECIFIQUE DES NANOPARTICULES DE CeO_2 EN FONCTION DU VOLUME DES PORES	240
FIGURE 70 : OBTENTION DU DIAGRAMME DE DIFFRACTION A PARTIR D'UNE IMAGE EN MET	242
FIGURE 71 : FICHE ICDD 00-034-0394 DU CeO_2 CUBIQUE, GROUPE D'ESPACE 225	242
FIGURE 72 : FICHE ICDD 00-023-1048 : Ce_2O_3 HEXAGONAL, GROUPE D'ESPACE 164	243
FIGURE 73 : SPECTRE FTIR DE L'ECHANTILLON DE CERINE OBTENU PAR MW1 ET CALCINE A 500°C SOUS FLUX D'AIR	246
FIGURE 74 : SPECTRE FTIR DE L'ECHANTILLON DE CERINE OBTENU PAR MW1 ET CALCINE A 500°C SOUS FLUX D' H_2	246
FIGURE 75 : POURCENTAGE DE PARAOXON DEGRADE APRES 5H DE MISE EN CONTACT AVEC UN ECHANTILLON DE CeO_2 EN MILIEU HBSS.	247
FIGURE 76 : POURCENTAGE DE DEGRADATION DE PARAOXON APRES 5 H DE MISE EN CONTACT AVEC DU CeO_2 CALCINES A 500°C SUS H_2 OU SOUS AIR, OBTENUS PAR MW1 OU MW2 ET AYANT DES SURFACES SPECIFIQUES DIFFERENTES.	248

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET TOXICITE DES AGENTS VESICANTS (^A CAVALLO <i>ET AL.</i> , 2010, ^B RUSSEL <i>ET AL.</i> , 2003, ^C LILLIE <i>ET AL.</i> , 2005).	25
TABLEAU 2 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET TOXICITE DE QUELQUES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES (^A MIRICIOIU <i>ET AL.</i> , 2013, ^B MILLERIOUX <i>ET AL.</i> , 2009A, ^C MISIK <i>ET AL.</i> , 2015, ^D TIMPERLEY, 2014)	30
TABLEAU 3 : PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES ET TOXICITE DES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES (^A CAVALLO <i>ET AL.</i> , 2010, ^B RUSSEL <i>ET AL.</i> , 2003, ^C LILLIE <i>ET AL.</i> , 2005)	31
TABLEAU 4: RELATION ENTRE LA SEVERITE CLINIQUE D'UNE INTOXICATION AUX ORGANOPHOSPHORES ET LA REDUCTION DE L'ACTIVITE DE L'ACHE (THABET <i>ET AL.</i> , 2009)	33
TABLEAU 5: DL_{50} DES AGENTS G CHEZ DES RATS WISTAR MALES PAR ADMINISTRATION SOUS CUTANEE ET PERCUTANEE (^A JOHN <i>ET AL.</i> , 2009, ^B VILLA <i>ET AL.</i> , 2007, ^C MISIK <i>ET AL.</i> , 2015, ^D MUNRO <i>ET AL.</i> , 1994).	44
TABLEAU 6 : FLUX ET TEMPS DE LATENCE DE COP RETROUVES DANS LA BIBLIOGRAPHIE. LES ETUDES ONT ETE FAITES EN CELLULE DE FRANZ SUR PEAU ENTIERE SAUF, COMME INDIQUE, DANS LE CAS DU SOMAN.	48
TABLEAU 7: COMPARAISON DU POURCENTAGE DE MOLECULE ABSORBEE, <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>	54

TABLEAU 8 : CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU SARIN, SOMAN, VX AINSI QUE DE LEUR SIMULANT LE DFP, DSM ET POX (VALLET <i>ET AL.</i> , 2007 ; MILLERIOUX <i>ET AL.</i> , 2009A).....	58
TABLEAU 9 : PROTECTIVE RATION (PR) DES DETERGENTS FACE AUX DIFFERENTS COP, * DIFFERENCE SIGNIFICATIVE (P<0,05) (MISIK <i>ET AL.</i> , 2013).....	69
TABLEAU 10 : PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES DE LA TERRE A FOULON (BAJPAI & VISHWAKARMA, 2003).....	71
TABLEAU 11 : RECAPITULATIF DES ETUDES MENEES SUR L'EVALUATION DE L'EFFICACITE DE DECONTAMINATION DE LA TERRE A FOULON	72
TABLEAU 12 : RECAPITULATIF DES ETUDES MENEES SUR L'EVALUATION DE L'EFFICACITE DE DECONTAMINATION DU RSDL.....	77
TABLEAU 13 : POURCENTAGE RESIDUEL DE ⁹⁹ Tc (A), ¹²³ I (B) ET ⁵¹ Cr (C) APRES LA DECONTAMINATION (MERRICK <i>ET AL.</i> , 1982) (CHAN <i>ET AL.</i> , 2012).....	83
TABLEAU 14 : CARACTERISTIQUES GEOMETRIQUES DES SEPT SYSTEMES CRISTALLINS (MILLOT & NIEPCE, 2014)	85
TABLEAU 15 : SYNTHESE DES NANOPARTICULES DE CeO ₂ PAR LA VOIE SOL-GEL	92
TABLEAU 16 : SYNTHESE DES NANOPARTICULES DE CeO ₂ PAR LA METHODE MICRO-EMULSIONS.....	95
TABLEAU 17 : FORMES ET TAILLES DES ECHANTILLONS DE CeO ₂ OBTENUS PAR VOIE HYDROTHERMALE (MAI <i>ET AL.</i> , 2005).....	96
TABLEAU 18 : CONSTANTES DIELECTRIQUES DES ALCOOLS ET DE L'EAU (HU <i>ET AL.</i> , 2000)	97
TABLEAU 19 : ARTICLES SUR LA DEGRADATION DE L'HD PAR LES NANOPARTICULES D'OXYDES METALLIQUES	107
TABLEAU 20 : DEGRADATION DU VX PAR LE CeO ₂ OBTENU PAR PLUSIEURS VOIES DE SYNTHESSES PUIS CALCINE 2 A 500°C (JANOS <i>ET AL.</i> , 2016).....	110
TABLEAU 21 : FLUX ET TEMPS DE LATENCE DU PARAOXON APRES 24 H D'EXPOSITION ET UNE DECONTAMINATION A 1 H AVEC LA TAF, LE CeO ₂ , LE RSDL ET LE CeO ₂ -W.....	161
TABLEAU 22 : EVOLUTION DU PRONOSTIC FONCTIONNEL (FP) EN FONCTION DU DECONTAMINANT ET DE LA DUREE ENTRE L'EXPOSITION AU PARAOXON ET LA DECONTAMINATION	166
TABLEAU 23 : CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR L'EVALUATION DE LA DEGRADATION DU PARAOXON EN PRESENCE DE CeO ₂ ET D'HBSS. ON CONSIDERE QUE LE PRODUIT INITIAL DE PARAOXON (PUR A 90%) CONTIENT 10% D'EAU.	205
TABLEAU 24 : TAILLES, SURFACE SPECIFIQUE, TAILLE ET VOLUME DES PORES DU CeO ₂ OBTENUS PAR LES DIFFERENTES VOIES DE SYNTHESSES.	238
TABLEAU 25 : RATIOS DES POURCENTAGES ATOMIQUES DE O/Ce, Ce ⁴⁺ ET Na/Ce SUR TROIS ECHANTILLONS DE CERINE.	244

Liste des annexes

ANNEXE 1 : ORGANISATION DES PRIMO-INTERVENANTS (CIRCULAIRE N°700/SGDN/PSE/PPS DU 7 NOVEMBRE 2008).....	254
ANNEXE 2 : ORGANISATION DES SERVICES DE SECOURS (CIRCULAIRE N°700/SGDN/PSE/PPS DU 7 NOVEMBRE 2008)	255
ANNEXE 3 : EXEMPLE DE PROTOCOLE DE DECONTAMINATION APPROFONDIE POUR VICTIMES VALIDES ET INVALIDES (CIRCULAIRE N°700/SGDN/PSE/PPS DU 7 NOVEMBRE 2008)	256
ANNEXE 4 : REPETABILITE DES MESURES POUR LA QUANTIFICATION DU PARAOXON ET P-NITROPHENOL DILUES DANS L'ETHANOL (N= 5)	258
ANNEXE 5 : REPRODUCTIBILITE DES MESURES POUR LA QUANTIFICATION DU PARAOXON ET P-NITROPHENOL DILUES DANS L'ETHANOL (N= 5).....	258
ANNEXE 6 : EQUATION DES DROITES D'ETALONNAGES DU PARAOXON ET P-NITROPHENOL (N=3). LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN MOYENNE +/- SEM (±Cv POUR LA PENTE DE LA DROITE).	258
ANNEXE 7 : STABILITE DU PARAOXON DILUE DANS L'ETHANOL OU 50% ETHANOL, 50% HBSS.	259
ANNEXE 8 : STABILITE DU P-NITROPHENOL DILUE DANS L'ETHANOL OU 50% ETHANOL, 50% HBSS.....	259

Liste des abréviations

AchE	Acétylcholinestérase
ADN	acide désoxyribonucléique
agents G	Germans
agents V	Venimeux
AO7	acide orange-7
ARN	acide ribonucléique
ATR	Attenuated Total Reflectance
aTSP	active TSP
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
BuChE	ButylCholinesterase
BuSCh	butyrylthiocholine
CADI	Centre d'accueil des impliqués
CCTG	caprylic/capric triglycéride
CD	compartiment donneur
CEES	2-chloroethyl ethyl sulfide
CIAC	Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques
COP	composés organophosphorés
COS	commandant des opérations de secours
CR	compartiment receveur
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
CtL₅₀	produit de la concentration atmosphérique (mg/m ³) par le temps (min) létal pour 50% des sujets ayant respiré le produit
Cv	coefficient de variation
DAM	2,3-butanedione monoxime
DFP	diisopropylfluorophosphate
DFPase	diisopropylfluorophosphatases
DKM	Defined keratinocyte Medium
DL₅₀	dose létale pour 50 % des sujets atteints
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxyde
DOS	directeur des opérations de secours
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
DRX	Diffraction aux Rayons X
DSM	demeton-S-methyl
DTNB	acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
EHS	stéarate d'ethyl hexyl
FDA	Food and Drug Administration
FP	pronostic fonctionnel
FS	facteur de symétrie
FTIR	Fourier Transform InfraRed spectroscopy
GA	Tabun

GB	Sarin
GD	Soman
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HD	ypérite au soufre ou gaz moutarde
HN3	ypérite à l'azote ou moutarde à l'azote
HPLC	chromatographie liquide haute performance
ICDD	International Centre for Diffraction Data
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
MCR	Microspectroscopie Confocale Raman
MDI	méthylène diphénylisocyanate
MDPH	module de décontamination pré-hospitalière
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie électronique à Transmission
MPEG	methoxypoly(ethylene glycol)
NAD	Nicotinamine Adénine Dinucléotide
NEDPA	4-nitrophenyl ethyl dimethylphosphoramidate
NEMP	4-nitrophenyl ethyl methylphosphonate
NIMP	4-nitrophenyl isopropyl methylphosphonate
NOP	neurotoxiques organophosphorés
NP(s)	nanoparticule(s)
NRBC	nucléaire, radiologique, biologique, chimique
NTE	neuropathy target esterase
OB	octyl benzoate
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OIAC	Organisation pour l'interdiction des armes chimiques
OP	organophosphorés
OSC	Oxygen storage capacity
PEG	polyethylene glycol
PFPE	perfluoroalkylpolyéther
PIE	perte insensible en eau
PIMP	phthalimidyl isopropyl methylphosphonate
PMA	poste médical avancé
PNT	p-nitrophénol
POP	pesticides organophosphorés
POX	Paraoxon
PR	protective ratio
PRD	point de regroupement des personnes décédées
PRE	point de répartition des évacuations
PRI	point de regroupement des personnes impliquées
PRV	point de regroupement des victimes
PTFE	polytétrafluoroéther
RPM	rotation par minutes
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSDL	Reactive Skin Decontamination Lotion

SCh	thiocholine
SDIS	service départemental d'incendie et de secours
SERPA	Skin Exposure Reduction Paste Against Chemical Warfare Agents
CWA	
SGDSN	secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale
TAF	Terre de Foulon
t_{lag}	temps de latence
TNB	5-thio-2-nitrobenzoate
TSP	Topical Skin Protectant
UV	Ultra-Violet
XPS	spectrométrie photoélectronique X
ZC	zone contrôlée
ZE	zone d'exclusion
ZS	zone de soutien

Introduction générale

Les neurotoxiques organophosphorés (VX, sarin, soman, tabun) et les vésicants (ypérite, lewisite) font partie des agents chimiques qui constituent la menace NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique). Malgré la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) qui oblige la destruction et interdit la fabrication des armes chimiques des 193 Etats actuellement signataires, l'exposition à une arme chimique, conçue pour provoquer la mort, reste encore actuellement une menace pour la population comme l'a démontré l'attaque de Ghouta (Syrie) en Août 2013.

Les agents chimiques pénètrent dans l'organisme par inhalation, ingestion et absorption cutanée. Certains neurotoxiques organophosphorés, qui sont peu volatils comme que le VX, représentent essentiellement un risque de contamination par contact avec les zones cutanées non protégées. Après le passage de la barrière cutanée, les agents atteignent la circulation générale et peuvent provoquer la mort de l'individu. Les premiers signes d'intoxication à un neurotoxique organophosphoré peuvent apparaître très rapidement, soit 2-3 heures après exposition cutanée (Thabet *et al.*, 2009). Les services de secours doivent donc intervenir très rapidement. Après une exposition à un agent chimique, le protocole de décontamination prévoit un déshabillage puis une douche de la victime (circulaire 700 du SGDN du 7 novembre 2008). En complément ou en cas de non accès à de l'eau courante, l'utilisation de dispositifs de décontamination sur la surface corporelle non protégée par les vêtements est cruciale pour empêcher une absorption trop importante de l'agent. Parmi les dispositifs de décontamination, la Terre à Foulon (TAF) est largement utilisée car elle permet une adsorption efficace de tous les composés organophosphorés. Un autre dispositif, la RSDL, est un système liquide permettant la neutralisation de l'agent mais qui, malgré plusieurs études aient prouvé son efficacité, reste très couteux pour une utilisation élargie (Hamilton *et al.*, 2004 ; Bjarnason *et al.*, 2008 ; Taysse *et al.*, 2007 ; Sawyer *et al.*, 2011 ; Rolland *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant de développer un nouveau système de décontamination cutanée, permettant l'adsorption et/ou la neutralisation du toxique et ayant un coût de fabrication peu élevé. Les nanoparticules d'oxydes métalliques, de par leur capacité d'adsorption et leur réactivité, sont de bons candidats pour de tels développements (Sharma & Kakkar, 2013).

Dans de nombreux secteurs (médecine, cosmétique, électronique, informatique, environnement, énergie, agroalimentaire, etc), on assiste à un essor considérable des nanosciences et nanotechnologies. Elles consistent à construire, comprendre et contrôler la fonctionnalité de nanoparticules (NPs) dont la taille est comprise entre 1 nm et 100 nm (Recommandation de la Commission Européenne n° 2011/696/UE du 1810/2011). Leurs

nanodimensions leurs permettent d'avoir des surfaces spécifiques élevées ce qui démultiplie leur effet. Parmi ces NPs, le dioxyde de cérium ou cériine (CeO_2) est utilisé comme antioxydant dans l'industrie pharmaceutique, catalyseur dans l'automobile, et filtre des ultraviolets en cosmétique. Il est possible de synthétiser le CeO_2 par voie hydrothermale au sein du laboratoire d'Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN) et ainsi, de contrôler les conditions de synthèses. Le CeO_2 synthétisé à l'ICMN a déjà démontré une bonne capacité de protection vis-à-vis du Paraoxon (POX), un pesticide organophosphoré (Zenerino *et al.*, 2015 ; Bignon *et al.*, 2016). Il nous a paru intéressant d'utiliser cette cériine pour la décontamination cutanée des composés organophosphorés en vérifiant qu'elle permet leur dégradation en condition opératoire.

L'évaluation de l'efficacité de décontamination est réalisée selon différents protocoles (*in vitro*, *in vivo*, site d'application du toxique, quantité de décontaminant appliquée, etc) et modèles de peau ce qui rend difficile la comparaison de l'efficacité entre différents systèmes de décontamination. La thèse de P. Rolland (2013) a démontré que la peau d'oreille de porc, qui est une alternative plus éthique et peu coûteuse, était un bon modèle de la peau humaine. L'utilisation d'une molécule ayant des propriétés physico-chimiques chimiques (appelée simulant) similaire à un agent chimique est également possible dans la mesure où la manipulation des agents chimiques doit faire l'objet de précaution particulière, surtout dans le cas du VX. Le POX est, par exemple, utilisé comme simulant du VX (Millerioux *et al.*, 2009a). La mise en place d'un protocole unique pour la comparaison de l'efficacité de décontamination de différents systèmes est donc nécessaire.

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité de décontamination cutanée du CeO_2 vis-à-vis du POX en se basant sur le protocole décrit dans la thèse de P. Rolland (2013) et en utilisant un modèle d'étude *in vitro*, la cellule de Franz, un modèle de la peau humaine, la peau d'oreille de porc et un simulant du VX, le POX. Dans la partie bibliographique, on présentera les propriétés des agents chimiques, leur mode d'action et les facteurs influençant leur absorption par la peau. Les dispositifs de décontamination cutanée et l'évaluation de leur efficacité seront ensuite décrits. Enfin, la structure du CeO_2 , les méthodes de synthèses et les réactions mises en jeu pour la dégradation des composés organophosphorés seront développées.

La méthode de synthèse développée à l'ICMN a été utilisée pour la synthèse de NPs de cériine dans des conditions différentes (température de calcination, dopage). Par ailleurs, une autre méthode de synthèse a été évaluée. Il a tout d'abord été nécessaire de mettre en place un protocole permettant de sélectionner rapidement les NPs les plus efficaces pour la dégradation du POX. Les NPs les plus efficaces ont ensuite été utilisées pour la décontamination cutanée *in*

vitro. Les études de décontamination vis-à-vis des organophosphorés utilisent très souvent une méthode enzymatique pour le dosage des organophosphorés résiduels. Cette méthode, ne permet pas de doser les produits de dégradation des organophosphorés et, en particulier, ceux du POX (le para-nitrophénol) qui n'ont pas d'activité enzymatique. Une méthode chromatographique (HPLC) permettant de doser le POX et également le produit de dégradation a été développée. Les protocoles d'études de la dégradation et de la décontamination, qui ont été utilisés pour l'ensemble du travail, sont décrits dans la première partie expérimentale.

En vue d'une application cutanée, il est difficile d'utiliser le CeO₂ sous sa forme d'origine, c'est-à-dire poudre de NPs, car il existe un risque de toxicité par les voies respiratoires. Il faut donc envisager une forme liquide contenant le CeO₂, qui ne favorise pas l'absorption du toxique et qui permette de conserver l'activité catalytique de la NP. A ce titre, les émulsions de Pickering, émulsions stabilisées par des particules solides, seront une forme galénique visée. La formulation des NPs dans des émulsions de Pickering fait l'objet du chapitre expérimental 3. L'efficacité de décontamination du CeO₂ et de systèmes contenant le CeO₂ sera comparé aux deux systèmes références pour la décontamination, la TAF et la RSDL aux chapitres 2 et 3. Le comportement du POX après contact avec la peau puis décontaminé avec un système sec ou un système liquide permettra d'appréhender le développement de systèmes adaptés à la décontamination.

Enfin, les dernières parties expérimentales (chapitres 4 et 5) s'intéresseront à l'impact des conditions de synthèses ou des conditions expérimentales (lors de la décontamination cutanée ou lors de l'évaluation de l'efficacité de dégradation en suspension aqueuse) sur les propriétés de surface (groupements chimiques, état d'oxydation), de structure (surface spécifique, volume des pores, etc) et donc l'efficacité de dégradation du POX. La compréhension de ces phénomènes permettra d'évaluer la cinétique de dégradation du POX par le CeO₂ en surface cutanée, d'optimiser la réactivité du CeO₂ et le protocole d'utilisation en condition opératoire.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : La pénétration cutanée des composés organophosphorés

1. Les armes chimiques

1.1. Historique d'utilisation

Comme le décrit l'article II de la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) (CIAC, 13 Janvier 1993), les armes chimiques sont :

- des produits chimiques toxiques, c'est-à-dire qui peuvent provoquer, chez les êtres humains ou les animaux, la mort, une incapacité temporaire ou des dommages permanents,
- des munitions et des dispositifs spécifiquement conçus pour provoquer la mort ou d'autres dommages, en libérant l'action toxique des produits chimiques toxiques,
- tout matériel spécifiquement conçu pour être utilisé en liaison directe avec l'emploi des munitions et des dispositifs.

L'usage des armes chimiques est très ancien puisqu'il remonte à l'antiquité gréco-romaine (Lepick, 1998). Par exemple, les cavaliers romains au siège d'Ambrasia (- 187 avant J.C.) utilisaient des fumées suffocantes et des cendres caustiques pour neutraliser leurs adversaires.

L'utilisation des armes chimiques a cependant été plus remarquable lors de la première Guerre Mondiale. Le 22 avril 1915, les Allemands utilisent 180 tonnes de chlore lors de la deuxième bataille d'Ypres provoquant la mort de 10 000 personnes. Par la suite, les belligérants développent des produits volatils de plus en plus toxiques, notamment l'ypérite utilisé pour la première fois sur le front le 11 juillet 1917 lors de la troisième bataille d'Ypres (d'où son nom). Les combattants ont donc besoin de masques de protection de plus en plus performants.

En 1925, le protocole de Genève interdit l'emploi des armes chimiques mais ne prohibe pas leur mise au point, leur possession ou encore leur utilisation dans des situations autres qu'en temps de guerre.

A la veille de la seconde guerre mondiale, l'armée française se prépare à une guerre chimique en stockant d'importantes quantités de munitions chimiques et utilise de l'hypochlorite de chaux sur l'ypérite pour le neutraliser. Les stocks n'ont finalement pas été utilisés sur les champs de bataille. Le non-emploi des armes chimiques pendant la seconde guerre n'est pas très bien expliqué (Lepick, 1998). Les allemands développent tout de même les neurotoxiques organophosphorés (NOP) qui sont la dernière génération d'arme chimique.

De 1983 à 1985, la guerre qui oppose l'Irak à l'Iran fait réapparaître l'arme chimique. L'armée de Saddam Hussein utilise ces armes sur la population Iranienne. L'Iran réplique mais avec des moyens plus limités.

En 1993, la CIAC (CIAC, 13 Janvier 1993) interdit cette fois-ci la mise au point, la fabrication, le stockage et l'usage des armes chimiques. Les Etats qui ont signé la convention doivent détruire leur stock d'armes chimiques. Au 17 October 2015, 192 membres des nations unies ont signé la convention (site internet de l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques ou OIAC, www.opcw.org/fr, qui recense les Etats membres). Cependant, l'attaque de Ghouta en Août 2013 en Syrie montre que des stocks existent encore et que les armes chimiques restent une menace pour la population. Selon certains médias, 1 180 tonnes de l'arsenal chimique du régime syrien ont été entièrement détruits sur un navire spécial en juin 2014 en Méditerranée, dans le cadre de l'accord conclu entre la Syrie, les Etats-Unis et la Russie. Malgré cela, le renseignement américain pense qu'il est possible que Daesh soit en mesure de produire ses propres armes chimiques grâce à une «petite cellule de recherche». Cette information est confirmée par la suite puisqu'en février 2016, l'OIAC révèle que les combattants de l'Etat islamique ont utilisé du gaz moutarde lors de combats contre des forces kurdes en Août 2015.

1.2. Présentation des armes chimiques

Les armes chimiques de guerre sont classées en fonction des effets qu'ils génèrent (Cavallo, 2010):

- s'ils rendent l'ennemi inapte au combat pendant toute la durée de l'exposition, on parle des agents neutralisants,
- s'ils mettent l'ennemi hors de combat pendant plusieurs heures ou plusieurs jours, ce sont des agents incapacitants,
- s'ils tuent l'ennemi ou le blessent grièvement, on parle alors des agents létaux.

1.2.1. Les agents neutralisants

Les agents neutralisants (ou incapacitants à court terme) entraînent rapidement une invalidité temporaire dont la durée n'excède pas le temps d'exposition à l'agent. Dispersé sous forme de gaz ou de particules de 0,3 à 5 µm, ce sont des irritants des organes sensoriels dont les symptômes sont les réponses reflexes de l'organisme à l'irritation. On distingue deux catégories d'agents neutralisants en fonction du tissu avec lesquels ils entrent en contact :

- les lacrymogènes (ex : ω -chloroacétophénone ou CN) lorsque l'agent entre en contact avec la conjonctive et provoque des sécrétions de larmes,
- les sternutatoires (ex : adamsite ou DM) lorsque l'agent passe dans les fosses nasales et les voies respiratoires supérieures et provoque une sensation de brûlure des fosses nasales et de la gorge, des vomissements, une hypersécrétion salivaire, une toux et des éternuements violents et parfois une atteinte oculaire,
- les urticants (ex : oxime de phosgène) provoquant des démangeaisons démentes. Les plus puissants des urticants peuvent provoquer des lésions pulmonaires graves et ne peuvent donc pas être classés parmi les agents neutralisants.

Les agents neutralisants ont été les premières armes chimiques utilisées pendant la première guerre mondiale. Aujourd'hui, la police les emploie pour disperser des émeutiers ou chasser des personnes d'un endroit.

1.2.2. Les agents incapacitants

Les agents incapacitants doivent avoir pour conséquence une incapacitation prolongée mais non définitive dans des conditions contrôlées. Ces produits doivent remplir certaines conditions : la dose incapacitante doit être différente de la dose létale (pour que l'éventualité d'un décès soit improbable), présenter un intérêt militaire, l'invalidation d'un groupe de personnes doit atteindre un nombre prévisible et élevé. Les psychotropes tels que le LSD (dont les effets durent jusqu'à 12h après exposition) ou l'agent BZ (qui immobilise jusqu'à 2 à 4 jours) sont aussi des agents incapacitants. Ces agents sont sous forme d'aérosol lorsqu'ils sont utilisés comme gaz de combat. Dans le cas de l'agent BZ, les effets peuvent être progressifs :

- 1-4 h après l'exposition, le sujet présente une tachycardie, des vomissements des vertiges...,
- 4-12 h après, le sujet est incapable de réagir efficacement aux stimuli du milieu ou de se déplacer,
- 12-96 h après l'exposition, son activité est accrue, son comportement devient imprévisible.

1.2.3. Les agents létaux

Les agents létaux proviennent de toxiques tissulaires ou généraux et sont utilisés pour tuer. On distingue différents groupes d'agents létaux : les agents suffocants (ou agents asphyxiants, irritants pulmonaires), les gaz hémotoxiques, les agents vésicants, ou encore les composés organophosphorés (COP) (qui font l'objet de cette thèse et que l'on développera plus particulièrement).

1.2.3.1. Les agents suffocants

Les agents suffocants lèsent les tissus des voies respiratoires, induisent une accumulation de fluide dans les poumons et provoquent la suffocation de la victime. Parmi les agents suffocants, on peut citer le chlore (utilisé par les Allemands pendant la première guerre mondiale) ou le phosgène.

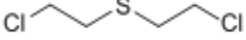
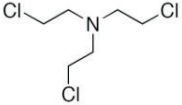
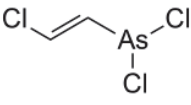
1.2.3.2. Les gaz hémotoxiques

Les agents hémotoxiques, comme le cyanure d'hydrogène ou le chlorure de cyanogène, bloquent le processus d'oxygénation par l'intermédiaire du sang, ou l'échange de gaz carbonique à l'interface sang/tissu ou sang/air des poumons. Ils agissent très rapidement et entraînent la mort par asphyxie.

1.2.3.3. Les agents vésicants

Les agents vésicants sont des irritants tissulaires généraux induisant des dommages oculaires, respiratoires et cutanés, locaux ou systémiques. Ils sont persistants car, à l'état liquide, ils conservent leur toxicité sur le support où ils se sont déposés et peuvent ainsi contaminer d'autre support en contact. Les principaux représentants des agents vésicants sont l'ypérite au soufre (ou gaz moutarde, ou HD), l'ypérite à l'azote (ou moutarde à l'azote ou HN3) et la lewisite (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques et toxicité des agents vésicants (^aCavallo *et al.*, 2010, ^bRussel *et al.*, 2003, ^cLillie *et al.*, 2005)

Agent toxique	Ypérite au soufre (HD)	Ypérite à l'azote (HN3)	Lewisite
Nom chimique	Sulfure de 2,2'-dichlorodiéthyle	2,2',2''-trichloroéthylamine	2-chlorovinyl-dichlorarsine
Formule brute	C ₄ H ₈ Cl ₂ S	C ₆ H ₁₂ Cl ₃ N	C ₂ H ₂ Cl ₃ As
Structure			
Masse molaire (g/mol) ^b	159,08	204,53	207,35
Odeur ^c	Odeur de moutarde	Inodore à l'état pur Odeur de poisson ou savon si impur	Inodore à l'état pur Odeur de geranium si impur
Etat physique à 20°C ^a	Liquide + vapeur	Liquide	Liquide + vapeur
Point de fusion (°C) ^a	14,5	-3,8	-13
Point d'ébullition (°C) ^a	227,8	144	190
*Volatilité (mg/m ³) à 25°C ^a	625	120	4400
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/L) ^b	0,92	Faible	0,95
**CtL ₅₀ (mg.min/m ³) chez l'homme ^a	1500	1500	1500
***DL ₅₀ (mg/kg) chez l'homme ^a	100	/	35
Persistance dans l'environnement ^a	2 à 7 jours à 10°C <3 jours à 40°C	/	1 jour à -10°C 1 h à 15°C

* La **volatilité** est la mesure de la capacité d'une substance à se vaporiser. Elle peut être définie comme le rapport de la masse de phase gazeuse sur le volume de la phase liquide. La **pression de vapeur** d'une substance est la pression exercée par sa vapeur lorsque celle-ci est en équilibre dynamique avec la phase condensée. Une pression de vapeur élevée indique que les molécules d'un liquide ne sont liées les unes aux autres que par de faibles forces intermoléculaires. Inversement, une faible pression de vapeur est preuve que les interactions intermoléculaires sont fortes.

**CtL₅₀ : produit de la concentration atmosphérique (mg/m³) par le temps (min) létal pour 50% des sujets ayant respiré le produit

***DL₅₀ = dose létale pour 50 % des sujets atteints.

L'ypérite (plus communément appelé « gaz moutarde ») constitue l'une des principales menaces chimiques actuelles. Malgré son nom, et comme l'indique sa volatilité (

Tableau 1), une fraction de gaz moutarde est sous forme gaz et l'autre sous forme liquide à 25°C. Il est caractérisé par un pouvoir de pénétration très rapide (moins de 3 min) et provoquent de multiples effets généraux :

- des effets oculaires : larmolement, picotement, sensation de brûlure lorsque l'intoxication est légère (effets apparaissant 4 à 12 h après le contact avec le toxique). Si l'intoxication est forte, les effets peuvent aller jusqu'à une conjonctivite sévère et une atteinte cornéenne rapidement (3 à 6 h après l'exposition),
- des effets sur les voies respiratoires dépendants de la température (plus elle est élevée et plus l'ypérite est sous forme de vapeur toxique). A des concentrations faibles en ypérite, le nez, les sinus et le pharynx sont irrités, il y a une sensation de brûlure. Pour des concentrations élevées, les voies respiratoires hautes sont atteintes avec lésion de la trachée et des bronches supérieures.
- des effets cutanés : l'humidité et la chaleur favorisent la pénétration percutanée. 1 à 3 h après l'intoxication, un érythème comparable à un coup de soleil apparaît. Il s'en suit un œdème puis des apparitions de petites vésications provoquant des lésions suintantes puis nécrotiques de l'épiderme et du derme.
- des effets gastro-intestinaux : anorexie, nausée, vomissement
- des effets sur le système hématopoïétique : diminution du nombre de leucocyte, puis des érythrocytes et des plaquettes.
- des effets neurologiques : effets cholinergique (vomissement, tremblement, nausée, myosis) et trouble de la personnalité, fatigue, anxiété, agitation ou dépression.

Le mécanisme d'action de l'ypérite qui conduit à la mort cellulaire est encore mal connu mais plusieurs hypothèses sont possibles (Kehe *et al.*, 2009). L'ypérite est un agent alkylant qui réagit rapidement avec les protéines et les acides nucléiques (ARN et l'ADN) ce qui inhibe la synthèse protéique et les mitoses. Les cellules à divisions rapides (épidermique, hématopoïétique, intestinale) sont les plus atteintes par ce phénomène.

L'ADN altéré provoque aussi une activation des poly (ADP-ribose) polymérase, entraînant une déplétion en NAD (Nicotinamine Adénine Dinucléotide). Il en résulterait une libération de protéases responsables de la formation des vésicules. Le résultat en est une nécrose cellulaire associée à une réaction inflammatoire.

Une autre hypothèse dominante serait que l'ypérite provoque une baisse de la concentration en glutathion intracellulaire qui engendre une inhibition du transport des ions calcium. Ceci favorise une dégradation des protéines, des cassures de l'ADN et l'hydrolyse des phospholipides.

1.2.3.4. Les composés organophosphorés

Les composés organophosphorés (COP) regroupent deux catégories :

- les pesticides organophosphorés (POP) dont les intoxications humaines provoquent encore une mortalité relativement élevée (Saïssy & Rüttimann, 1999),
- les neurotoxiques organophosphorés (NOP) qui figurent parmi les agents chimiques de guerre les plus toxiques.

1.2.3.4.1. Structure générale des composés organophosphorés

Les COP ont une structure chimique et un mode d'action commun. Leur formule générale a été définie par Schrader (Figure 1) (Biljana *et al.*, 2008).

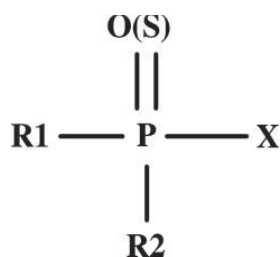


Figure 1 : Structure chimique des composés organophosphorés

Le substituant X est celui qui sera soumis à l'hydrolyse. Selon la nature de X, on distingue quatre classes de composés (Thabet *et al.*, 2009):

- la classe I où X contient un ammonium quaternaire ; les COP de cette classe sont de puissants toxiques et ne sont pas utilisés en agriculture,
- la classe II : X = F ; les COP sont aussi toxiques que ceux de la classe I. Ils possèdent une forte tension de vapeur. Ils sont donc utilisés majoritairement comme gaz de combat (sarin),
- la classe III : X = CN, OCN, SCN ou un halogène autre que F. Le tabun fait partie de cette classe et est utilisé comme gaz de combat,
- la classe IV : X = autre substituant ; les COP de la classe IV regroupent la plupart des POP.

1.2.3.4.2. Les pesticides organophosphorés

Le développement d'armes chimiques a mis en évidence les propriétés insecticides (de la famille des pesticides) de certains composés chlorés (les insectes étaient utilisés pour tester les capacités de ces composés chimiques à tuer des hommes). Les organochlorés ont donc été créés. D'autres insecticides ont été ensuite développés comme les organophosphorés (OP), carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse et benzoylurées.

Les OP sont des toxiques létaux qui inhibent les cholinestérases. Cette inhibition bloque la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques (voir § 1.4). Si on reprend la Figure 2, les COP possédant la fonction P=O sont des inhibiteurs directs et rapides des enzymes. Les COP contenant la fonction P=S sont des inhibiteurs indirects qui sont métabolisés en leur composé actif P=O comme le parathion qui se transforme en paraoxon (POX) (Figure 2).

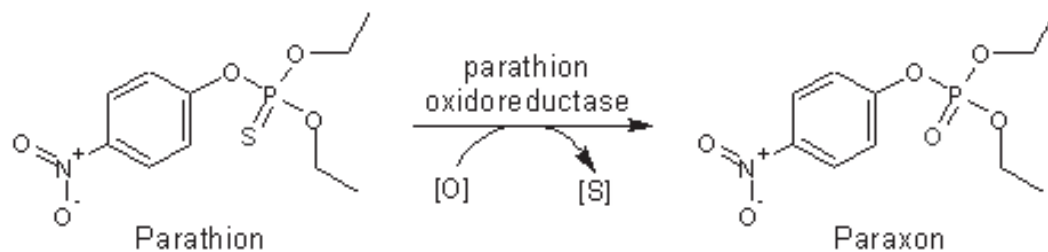


Figure 2 : Transformation du parathion en paraoxon, le composé actif

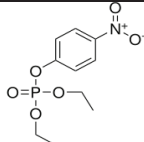
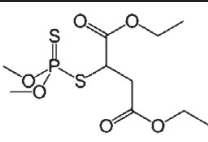
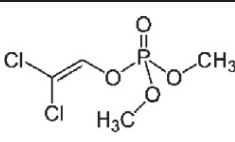
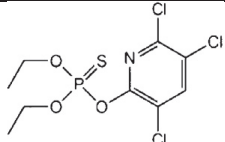
Aujourd'hui, les intoxications par les POP touchent fréquemment les pays en voie de développement. Ainsi, au Sri Lanka, on dénombre 10 000 intoxications dont 10% provoquent des décès.

La plupart des POP sont très liposolubles, peu volatils. Ce sont des insecticides de contact (

Tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques et toxicité de quelques pesticides organophosphorés

(^aMircioiu *et al.*, 2013, ^bMillerioux *et al.*, 2009a, ^cMisik *et al.*, 2015, ^dTimperley, 2014)

pesticides organophosphorés	Paraoxon	Malathion	Dichlorvos	Chlorpyrifos
Nom chimique	diéthyl 4-nitrophényl phosphate	O,O-diméthylphosphorodithioate de diéthyl-mercaptosuccinate	2,2-dichlorovinyl diméthyl phosphate	O,O-diéthyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothionate
Formule brute	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
structure				
Masse molaire (g/mol)	275,19 ^b	330,36 ^a	220,98 ^a	350,58 ^a
Solubilité (g/L) à 25°C	13 ^b	0.13 ^a	10 ^a	0.002 ^a
Log P	1.98 ^b	2,9 ^a	1,2 ^a	4,8 ^a
DL ₅₀ ^c (mg/kg) percutanée chez le rat	4.3 ^c	60-1300 ^d	30-50 ^d	1-30 ^d

1.2.3.4.3. Les neurotoxiques organophosphorés

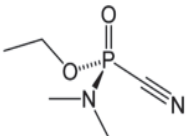
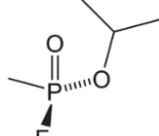
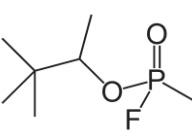
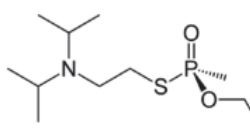
Les NOP sont divisés en deux groupes. Tout d'abord, les agents G (pour « Germans ») qui sont des dérivés esters de l'acide cyano ou fluorophosphonique. La toxicité des agents G est dépendante du groupement X. Ce sont des liquides suffisamment volatils pour être utilisés sous forme d'aérosols. Ils agissent principalement par voie respiratoire. Ils sont détruits facilement par hydrolyse, ils sont considérés comme peu ou non persistants. Ils sont solubles dans l'eau, les solvants organiques et les graisses. Les principaux représentants des agents G sont le tabun, le sarin et le soman.

Les agents V (pour « Vénimeux ») constituent le second groupe. Ce sont des esters de l'acide thio-phosphonique. Contrairement aux agents G, ce sont des toxiques persistants car ils montrent une plus grande résistance à l'hydrolyse et sont peu volatils. Le principal représentant des agents V est le VX. L'intoxication par le VX est généralement la conséquence d'une exposition par voie cutanée.

Le tableau 3 regroupe les principales propriétés chimiques des NOP.

Tableau 3 : Propriétés physico chimiques et toxicité des neurotoxiques organophosphorés

^aCavallo *et al.*, 2010, ^bRussel *et al.*, 2003, ^cLillie *et al.*, 2005)

Neurotoxique organophosphoré	Tabun (GA)	Sarin (GB)	Soman (GD)	VX
Nom chimique	Diméthyl-phosphoro-amido-cyanidate d'éthyle	Méthyl-fluoro-phosphonate d'isopropyle	Méthyl-fluoro-phosphonate de pinacolyle	O-éthyl S-(2-diisopropylamino-éthyl) méthylphosphonot hioate
Formule brute	C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₂ P	C ₄ H ₁₀ FO ₂ P	C ₇ H ₁₆ FO ₂ P	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ PS
Structure				
Masse molaire (g/mol) ^b	162,13	140,09	182,17	267,37
Odeur ^c	Odeur faiblement fruitée à inodore	Inodore	Odeur fruitée	Inodore
Etat physique à 20°C ^a	Liquide + vapeur	Liquide + vapeur	Liquide + vapeur	Liquide
Point de fusion (°C) ^a	-49	-56	-70	-30
Point d'ébullition (°C) ^a	240	147	167	300
Volatilité (mg/m ³) à 25°C ^a	612	17000	3000	8-10
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/l) ^b	98	Miscible	31	30
CtL ₅₀ (mg/min/m ³) ^a	400	100	70	50
DL ₅₀ (mg/kg) ^a (percutanée chez l'homme)	14,28	24	0,42	0,14

1.3. Les voies d'intoxication

Suivant leur état physique (vapeur/liquide/solide), les toxiques pénètrent dans l'organisme par voie respiratoire, muqueuse, cutanée ou digestive. Pour les COP sous forme de vapeur, la toxicité est appréciée par les valeurs CtL₅₀ (mg/min/m³) (Cavallo, 2010). La plupart des agents toxiques sont très peu volatils et sont présents à l'état liquide ou solide, c'est la DL₅₀ (mg/kg) qui est alors définie. Ils représentent essentiellement un risque de contamination par contact

avec la peau, le toxique pouvant après pénétration atteindre la circulation sanguine et manifester sa toxicité.

1.4. Le mécanisme d'action

Les COP agissent en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine en choline et acide acétique. L'acétylcholine est un neurotransmetteur excitateur stocké dans des vésicules d'une membrane présynaptique. Au cours de l'influx nerveux, pour transmettre l'information nerveuse d'un neurone au suivant, l'acétylcholine est libérée au niveau des synapses des neurones dites «cholinergiques» du système nerveux central et périphérique. L'acétylcholine se fixe ensuite sur le récepteur du neurone post synaptique. Ces récepteurs sont de type muscariniques (fibres nerveuses post ganglionnaires) ou nicotiniques (système nerveux central, ganglions du système nerveux autonome, muscles squelettiques).

Les COP sont des molécules très lipophiles qui franchissent rapidement les barrières biologiques (voies transcutanées, respiratoires, digestives). Grâce à leurs radicaux phosphates, les COP se lient aux sites estérasiques des cholinestérases, responsable de la liaison avec l'acétylcholine et de son hydrolyse. Il en résulte une inhibition de l'AChE et donc une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses nerveuses et une stimulation continue des fibres cholinergiques des systèmes périphériques et centraux. Dans un premier temps, l'enzyme peut être réactivée par déphosphorylation, soit spontanément par hydrolyse, soit après instauration d'un traitement médical adapté (par une oxime). Si une déphosphorylation n'a pas eu lieu, après 24 à 48 h, la déalkylation de l'OP rend la liaison entre le COP déalkylé et l'enzyme irréversible (phénomène de « vieillissement » de l'enzyme ou aging). Le temps de vieillissement de l'enzyme dépend de la nature et de la stœchiométrie du COP (Figure 3). Le temps de demi-vie de vieillissement peut varier de quelques minutes pour l'AChE inhibée par le soman à plusieurs dizaines d'heures pour une inhibition par le VX (Sidell & Borak, 1992).

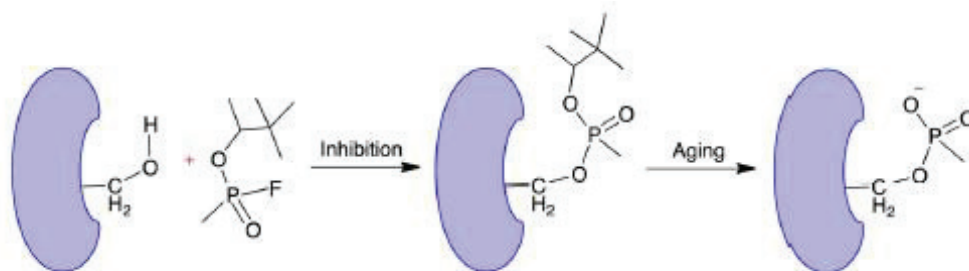


Figure 3 : mécanisme de vieillissement de l'AChE par le soman (adapté de Sirin *et al.*, 2012)

D'autres enzymes du système nerveux central sont phosphorylées par les COP, notamment la « neuropathy target esterase » NTE. Cette enzyme est présente au niveau membranaire des neurones du système nerveux central mais aussi dans les leucocytes et les plaquettes. Elle intervient dans la voie de signalisation cellulaire contrôlant les interactions entre les neurones et les cellules gliales au cours du développement du système nerveux. Le syndrome neuropathique retardé peut apparaître si la NTE subit un vieillissement suite à la phosphorylation de la sérine catalytique par un COP.

1.5. Les signes cliniques

Les signes cliniques de l'intoxication aux COP évoluent en trois phases successives :

- la crise cholinergique qui apparaît dès l'intoxication et au cours de laquelle le décès peut survenir à tout moment,
- entre la 24^{ième} et la 96^{ième} heure après une intoxication sévère, le syndrome intermédiaire peut apparaître,
- plus tardivement, une polyneuropathie.

1.5.1. La crise cholinergique

L'accumulation de l'AchE au niveau synaptique augmente la réponse des récepteurs muscariniques au niveau des cibles du système parasympathique (syndrome muscarinique) et des récepteurs nicotiques au niveau ganglionnaire des systèmes parasympathiques et sympathiques. La gravité de l'intoxication dépend du taux de composé toxique (Tableau 4).

Tableau 4: relation entre la sévérité clinique d'une intoxication aux organophosphorés et la réduction de l'activité de l'AchE (Thabet *et al.*, 2009)

Activité AchE (%)	Degré de sévérité	Signes et symptômes
21-50	Léger	Myosis, hypersalivation, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, bradycardies...
11-20	Modéré	Altération de l'état de conscience, troubles de l'élocution, fasciculations musculaires, fièvre, hypersécrétion bronchique, hypertension artérielle
<10	Sévère	Paralysie, œdème pulmonaire, détresse respiratoire, hypotension, coma, convulsions

Le délai d'apparition de ces symptômes dépend du mode de contamination et du toxique (Rousseau *et al.*, 2000). Les symptômes apparaissent au bout de quelques minutes par inhalation et après 2-3 h par voie cutanée. Lorsque le toxique est très liposoluble, il peut être stocké dans les graisses et les symptômes apparaîtront avec un retard de 24 h.

1.5.2. Le syndrome intermédiaire

Le syndrome intermédiaire apparaît après la crise cholinergique. Il s'agit d'une atteinte neuromusculaire avec des paralysies au niveau des muscles proximaux des membres, des muscles fléchisseurs de la nuque, des muscles à innervation céphalique et des muscles respiratoires (Thabet *et al.*, 2009). L'atteinte du diaphragme fait apparaître une insuffisance respiratoire. Les causes de cette myopathie sont encore discutées. Elle dépendrait de l'importance de l'intoxication et donc de la baisse de l'activité de l'AchE (De Bleecker & Engel, 1995). En raison de la diminution de la sensibilité des récepteurs post-synaptique, il y aurait une mobilisation accrue de flux calcique et donc une stimulation des récepteurs nicotiques présynaptiques induisant le syndrome intermédiaire (Karalliedde & Henry, 1993).

1.5.3. La polyneuropathie

La polyneuropathie survient une à trois semaines après l'intoxication. Elle est caractérisée, entre autres, par des crampes musculaires douloureuses au niveau des membres inférieurs, une hypotonie (diminution du tonus musculaire), des troubles sensitifs. Le syndrome évolue pendant une année avec la possibilité qu'il reste des séquelles. Cette polyneuropathie n'est par contre pas dépendante de l'inhibition des cholinestérases mais plutôt de la phosphorylation de la NTE.

2. La peau: voie d'entrée pour les composés organophosphorés

La peau représente le plus important organe humain avec une superficie de 1,8 m² et un poids de 4 kg en moyenne (Roberts & Walters, 2008). La peau a la caractéristique d'être à la fois imperméable, puisqu'elle constitue la première barrière de protection de l'organisme (thermique et chimique), et perméable comme une zone d'échange privilégiée. Elle comprend trois couches superposées de tissus qui correspondent, de la surface à la profondeur, à l'épiderme, au derme puis à l'hypoderme (Figure 4). Son épaisseur varie en fonction des zones anatomiques (de 0,5 mm à 5 mm), on parle alors de peau fine ou de peau épaisse (Coujard &

Poirier, 1980). Pour une meilleure compréhension de la pénétration cutanée des COP, la structure et propriétés de chaque couche vont être décrites. Le mécanisme d'absorption percutané sera ensuite abordé.

Il faut distinguer la pénétration de la perméation. La **pénétration** est le passage d'un produit à travers une annexe cutanée, une cellule, etc. La **perméation** est l'absorption, la diffusion et la résorption d'une molécule à travers la peau.

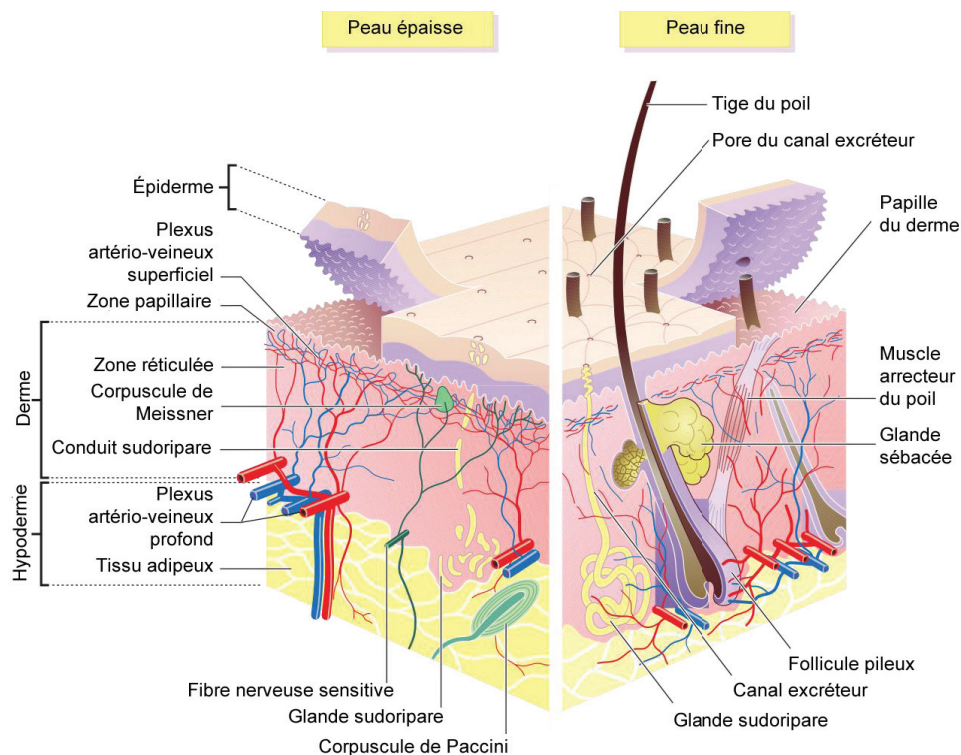


Figure 4 : Structure de la peau

2.1. La fonction barrière de l'épiderme

L'épiderme est constitué de deux couches cellulaires : l'épiderme viable (où les kératinocytes vont migrer jusqu'à la surface de la peau) et le *stratum corneum* (ou couche cornée, composée de cellules mortes ou cornéocytes). L'épaisseur de l'épiderme est en moyenne de 100 µm mais peut varier de 20 µm sur le visage à 5 mm sous la plante des pieds. Il est non vascularisé et composé à 80% de kératinocytes qui vont se différencier en

cornéocytes. Ce cycle de différenciation est estimé à 28 jours et permet le renouvellement constant de la peau.

2.1.1. Le film hydrolipidique

A la surface de la peau, on retrouve les pores des glandes sébacées et sudoripares engendrant la sécrétion du sébum et de la sueur. Cette sécrétion permet de créer à la surface une émulsion composée de sébum, de sueur, d'eau (provenant des couches plus profondes) et de cellules kératinisées ou mortes. Cette émulsion est le film hydrolipidique qui forme le manteau acide de la peau (pH de 4-5).

La quantité et la composition du film hydrolipidique varient selon les zones du corps et dépendent également de facteurs exogènes et endogènes (tels que le moment de la journée, la saison, l'humidité de l'air, l'alimentation ou encore le stress).

2.1.2. Le *stratum corneum*

Les cornéocytes qui composent le *stratum corneum* ne possèdent pas de noyau et sont remplis de kératine. Entre les cornéocytes, on retrouve des lipides tels que des céramides (45-50%), du cholestérol (25%) et des acides gras libres (15%). Ces cellules sont reliées entre elles par des cornéodesmosomes permettant la formation d'un réseau (tel un mur de briques). A la partie la plus superficielle, les protéases clivent les protéines constitutives des cornéodesmosomes et cassent ainsi ce réseau : c'est la desquamation (Figure 5). L'épaisseur du *stratum corneum* varie en fonction des besoins : 15-20 assises cellulaires au niveau du dos et plus d'une centaine à la plante du pied.

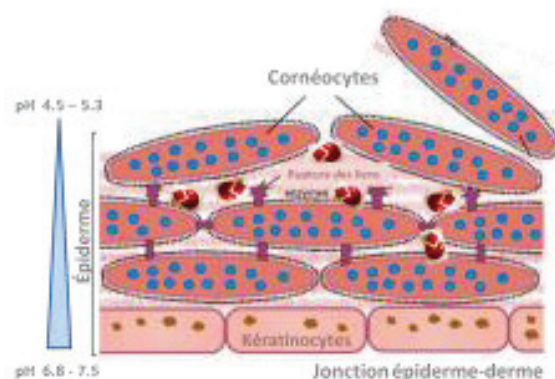


Figure 5 : Schéma représentant la desquamation

L'architecture des lipides épidermiques du *stratum corneum* et leurs natures jouent un rôle majeur dans les mécanismes de pénétration cutanée. Les chaînes linéaires des céramides et des acides gras constituant les lipides intercellulaires du *stratum corneum* forment des domaines très ordonnés. Ces conformations limitent la perméabilité de la membrane. Il existe trois types de conformations (Figure 6):

- orthorhombique, rigide et compact, il permet une forte résistance à l'absorption cutanée (Rawlings & Matts, 2005),
- hexagonale, moins dense dû à l'impact du sébum sur lipides intercellulaires. Celui-ci provoquerait soit la formation directe de phases hexagonales, soit la transformation des phases orthorhombiques en phase hexagonale,
- lamellaire ou liquide cristallin. Cette forme est présentée comme un liquide fluide (Boncheva *et al.*, 2008 ; Bouwstra & Ponc, 2006) augmentant plus encore la perméabilité de la peau.

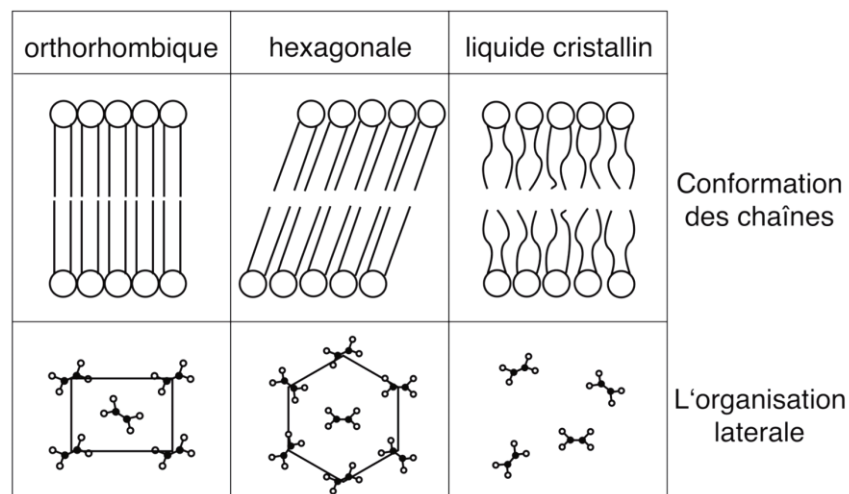


Figure 6 : Organisation des lipides du *stratum corneum* (Forster, 2010)

L'organisation lipidique change durant la migration des cornéocytes des couches plus profondes vers les couches supérieures de la couche cornée, où une plus grande proportion de lipides en phase hexagonale a été observée (Pilgram *et al.*, 1999). Ces études sont en accord avec l'affaiblissement de la barrière en surface de la couche cornée (on parle de « fluidification des lipides dans les couches les plus superficielles du *stratum corneum* »).

2.1.3. L'épiderme viable

Sous le *stratum corneum* se trouve l'épiderme viable où les kératinocytes vont se différencier et migrer jusqu'à la surface. Elle possède différentes couches (Figure 7):

- le *stratum lucidum* ou couche de transition présente seulement dans la peau épaisse et composée de 3 ou 4 couches de cellules jointives. Cette couche cellulaire permet de réduire les forces de friction et les contraintes entre le *stratum corneum* et la couche granuleuse.

- le *stratum granulosum* ou couche granuleuse composée de 1 à 4 assises de kératinocytes dont le noyau commence à dégénérer et qui contient les précurseurs de la kératine et des lipides. Les kératinosomes (ou corps d'Oadland) synthétisent à l'intérieur des kératinocytes des phospholipides et glycolipides (qui se transforment en céramides, cholestérol et acides gras libres) responsables du ciment intercellulaire.

- le *stratum spinosum* ou couche épineuse est constituée de 5 à 10 couches de cellules volumineuses et polyédriques. Elles sont reliées entre elles par des desmosomes qui vont donner une apparence d'épines sur leur contour, d'où leur nom. Différentes cellules sont présentes: les kératinocytes, les mélanocytes (produisant la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau), des terminaisons nerveuses (toucher) et des cellules de Langerhans (assurent la défense immunologique de la peau).

- le *stratum germinativum* ou couche basale est composée d'une seule assise de kératinocytes cubiques reliées entre elles par des desmosomes. Dans cette couche, les cellules se divisent : une reste dans la couche basale et l'autre migrera dans les couches supérieures de l'épiderme.

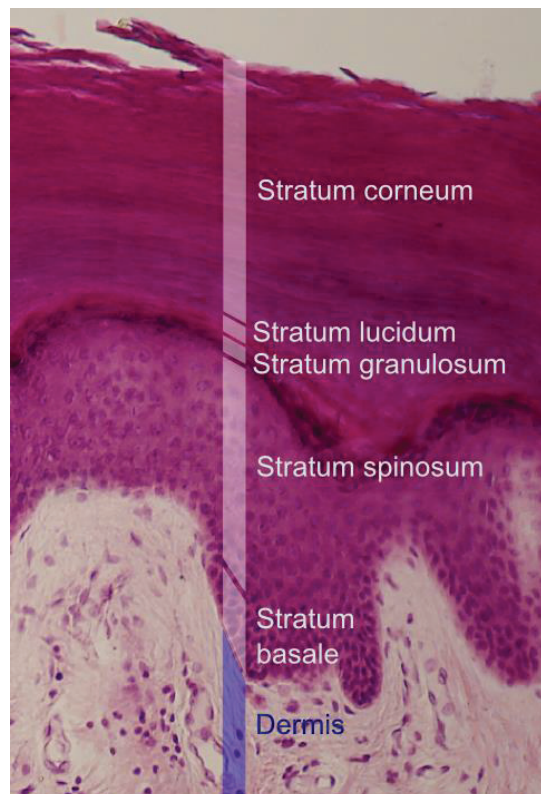


Figure 7 : Structure de l'épiderme

2.1.4. Le tissu de soutien : le derme

Le derme est un tissu conjonctif 10 à 40 fois plus épais que l'épiderme, c'est-à-dire qui peut atteindre jusqu'à plusieurs millimètres d'épaisseur. A la différence de l'épiderme, il est vascularisé, ce qui lui permet d'apporter à l'épiderme énergie et nutriments et participe à la thermorégulation cutanée. Une fois l'actif ou le COP dans le derme, celui-ci est distribué dans tout le corps via la circulation sanguine. Le derme est aussi riche en terminaisons nerveuses libres reliées à des corpuscules nerveux (corpuscules de Meissner, de Pacini et de Ruffini) à l'origine des sensations provenant de la peau : tact, chaud, froid ou pression. On distingue :

- le derme papillaire formant des saillies à l'intérieur de l'épiderme. Les fibroblastes sont majoritairement présents dans cette couche et ont pour rôle de synthétiser les fibres de collagène et d'élastine constituant de la matrice extra-cellulaire. Ces fibres, orientées perpendiculairement à la surface de la peau, confèrent la résistance aux tensions et aux tractions, ainsi que les propriétés élastiques de la peau.

- le derme réticulaire plus dense de par sa présence en collagène. Il est pauvre en cellules. A ce niveau, les fibres d'élastine et de collagène sont disposées de façon multidirectionnelle.

2.1.5. La réserve énergétique : l'hypoderme

L'hypoderme est la continuation du derme en profondeur grâce à des liaisons de collagène et d'élastine. C'est la couche la plus épaisse de la peau représentant 15 à 30 % du poids corporel. Il est composé de lobules graisseux séparés par du tissu conjonctif très vascularisé. Il joue le rôle de réserve énergétique en libérant la graisse contenue dans les lobules graisseux pour les transférer dans la circulation sanguine. Les adipocytes constituent aussi un maintien souple et déformable et permettent de protéger l'organisme des chocs physiques.

2.1.6. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont composées des glandes cutanées (sudoripares et sébacées) et des phanères (poils et ongles). Ainsi, à la surface de l'épiderme, on retrouve des pores sudoraux et des ostiums pilaires. La figure 8 montre les différentes annexes cutanées.

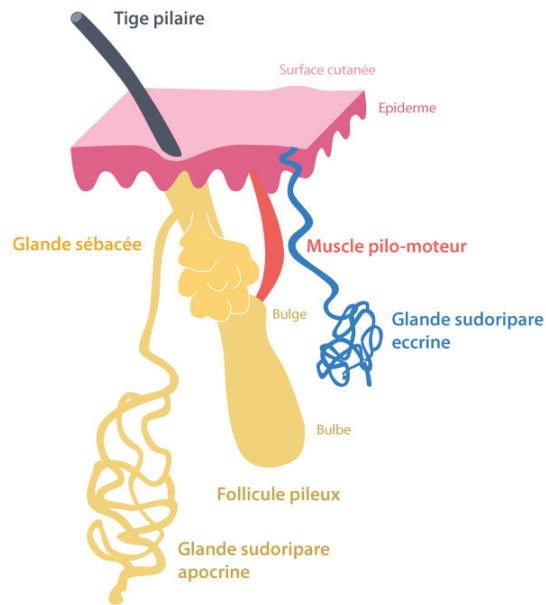


Figure 8 : Les annexes cutanées

Les glandes sébacées sont majoritairement annexées aux poils (leur taille étant inversement proportionnelle à celle du poil), formant les follicules pilo-sébacés. Elles sont abondantes au niveau du dos, visage et du cuir chevelu. La portion sécrétrice est au niveau du derme. Le sébum, principalement composé de triglycérides, est déversé dans le canal excréteur de la glande sébacée puis passe dans le conduit pilosébacé.

Les glandes sudoripares sécrètent la sueur et on en distingue deux types :

- les glandes sudoripares eccrines présentes sur tout le corps mais plus abondantes sur la paume des mains, sur la plante des pieds et sur le front. La partie sécrétrice se trouve dans le derme et le canal excréteur s'étend jusqu'à la surface de la peau. Elles jouent un rôle important dans la thermorégulation et l'hydratation. La sueur est composée à 99% d'eau et d'électrolytes (chlorure de sodium, calcium, magnésium, potassium). Les glandes sudoripares eccrines sont indépendantes des poils.

- les glandes sudoripares apocrines présentes uniquement dans certaines régions de l'organisme : les aisselles et les régions urogénitales. Elles sont annexées à certains follicules pilo-sébacés. La portion sécrétrice est située dans l'hypoderme et le canal excréteur débouche dans le conduit pilo-sébacé, au-dessus du canal excréteur de la glande sébacée.

Le follicule pileux est une invagination particulière de l'épiderme qui s'étend jusqu'au derme et produit le poil. Il comporte ses annexes : la glande sébacée (comme vu précédemment, le tout formant l'unité pilo-sébacée), le muscle arrecteur du poil (sous sa contraction, dû à une

émotion ou au froid, il va permettre de redresser le poil) et la gaine épithéliale qui permet de diriger la tige pileuse en formation.

Le poil/cheveu est composé de kératine mais aussi, en moindre pourcentage, d'eau, de lipides, de mélanine et de minéraux (Dubois & Demelin, 2007). La kératine est formée de deux chaînes polypeptidiques associées en fibres, torsadées en hélices dont la cohésion est assurée par les liaisons hydrogènes et les ponts disulfures. Le point isoélectrique (le pH pour lequel la charge globale est nulle) de la kératine est de 3,7. En atmosphère humide, la surface du cheveu et du poil est donc chargée négativement (Feughelman, 1997; Robbins, 2002).

L'unité pilo-sébacée du follicule se divise en quatre compartiments :

- le bulbe pileux : portion inférieure à l'origine de la pousse du poil.
- le renflement ou 'bulge' : où s'attache le muscle arrecteur du poil.
- l'isthme : situé entre la protubérance du muscle pilo-arrecteur et l'abouchement du canal de la glande sébacée.
- l'infundibulum : portion superficielle située entre l'abouchement du canal de la glande sébacée et la surface de la peau. L'écoulement du sébum jusqu'à la surface de la peau s'effectue via le canal infundibulaire, qui abrite une importante flore microbienne.

2.2. L'absorption cutanée

2.2.1. Les voies d'absorption cutanée

L'absorption cutanée est, par définition, l'ensemble des mécanismes permettant le passage d'une substance depuis le milieu extérieur jusqu'à la circulation sanguine du derme. Il existe deux voies d'absorption (Figure 9):

- via les annexes cutanées : c'est la voie transannexielle,
- via la couche cornée : c'est la voie transépidermique.

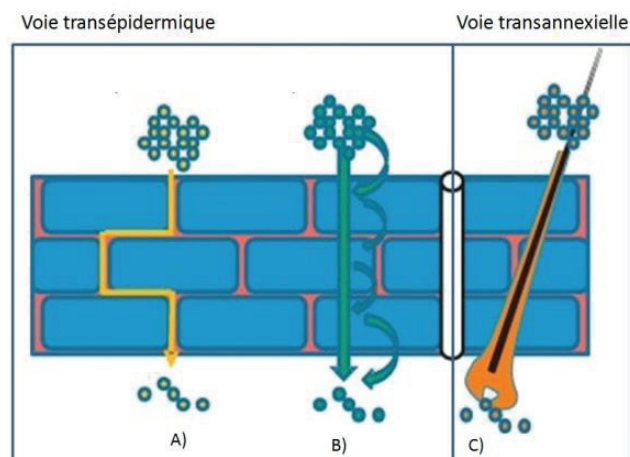


Figure 9 : Les voies de pénétration au travers de la couche cornée (Lane, 2013)

2.2.1.1. La voie transépidermique

L'absorption cutanée à travers l'épiderme se déroule en plusieurs étapes :

- contact avec le film hydrolipidique et pénétration à travers le *stratum corneum*,
- diffusion à travers les différentes couches de la peau,
- résorption permettant le passage vers le réseau sanguin et/ou lymphatique.

2.2.1.1.1. La pénétration à travers le *stratum corneum*

Lorsqu'une substance doit traverser la peau, elle entre d'abord en contact avec le film hydrolipidique de la peau puis pénètre le *stratum corneum*. La pénétration des molécules dépend donc de leur affinité pour la couche cornée, majoritairement lipidique.

A travers la couche cornée, les molécules peuvent soit :

- passer à travers les cornéocytes, c'est la voie transcellulaire qui est privilégiée dans le cas de molécules hydrophiles,
- passer par les lipides intercellulaires, entre les cornéocytes, c'est la voie intercellulaire. Cette voie est la voie préférentielle pour les composés hydrophobes.

La voie intercellulaire est la voie préférentielle de la plupart des molécules alors que la longueur du « trajet » à effectuer pour atteindre l'épiderme viable est 40 à 80 fois supérieure à l'épaisseur de la couche cornée (800 µm).

D'une manière générale et selon les règles de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997 ; Choi & Prausnitz, 2011), une molécule pourra d'autant plus pénétrer dans la peau qu'elle aura :

- un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol,
- un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogènes inférieur à 10 (atomes N and O notamment),
- nombre de donneurs de liaisons hydrogènes inférieur à 5 (groupements OH et NH),
- un caractère lipophile (log P compris entre -2 et 5),
- une flexibilité (nombre de « rotules » inférieur à 5).

D'autres paramètres influencent la pénétration cutanée à travers le *stratum corneum* et vont être détaillés dans les paragraphes suivants.

2.2.1.1.1.1. Les promoteurs d'absorption

Les lipides intercellulaires peuvent être désorganisés réversiblement par des molécules, appelées, promoteurs d'absorption, qui permettent d'augmenter la perméabilité à travers la couche cornée. Ces promoteurs d'absorption peuvent soit:

- interagir avec la partie polaire des lipides,
- interagir avec les chaînes carbonées, provoquant l'augmentation de leur fluidité et facilitant la pénétration de molécules hydrophobes.

Il existe de nombreux promoteurs d'absorption. L'eau est un promoteur d'absorption très efficace. Le *stratum corneum* contient 15-20% du poids en tissu sec en eau (Williams & Barry, 2012) mais ce contenu peut augmenter jusqu'à 400% dans des conditions d'occlusion (empêchant l'évaporation d'eau). L'humidité ou la sueur émise lors d'un stress, un effort physique ou une augmentation de la température, augmentent donc la pénétration cutanée. Wester *et al.*, (2000) ont comparé l'absorption cutanée *in vitro* de parathion sur peau nue, peau recouverte d'un tissu d'un uniforme sec ou humidifié par de l'eau. L'absorption du parathion est plus importante sur peau recouverte d'un tissu humide (0,65% de parathion absorbée) comparée à une peau recouverte d'un tissu sec (0,29%). Misik *et al.* (2011) a aussi démontré que la pénétration cutanée du POX était plus importante pour une peau humidifiée.

Le diméthyl sulfoxyde (DMSO) est un autre promoteur d'absorption très utilisé pour solubiliser des substances actives lors de traitement des inflammations par exemple (Williams & Barry, 2012). Lorsque la concentration en DMSO dépasse 60%, la barrière lipidique du *stratum corneum* peut se trouver perturbée, cela peut aussi provoquer des érythèmes cutanés et dénaturer les protéines du *stratum corneum* (kératine). Il a été montré que le DMSO quadruple la pénétration du parathion (Grissom & Shah, 1992 ; McDermot *et al.*, 1967) de même que celle du sarin (Fredriksson, 1969) en provoquant un gonflement des cellules basales.

2.2.1.1.1.2. Le poids moléculaire et la taille des molécules

Les cornéocytes étant imbriqués les uns dans les autres, les molécules ayant un faible poids moléculaires (inférieur à 500 g/mol) pourront diffuser plus facilement (Benson, 2005; Magnusson *et al.*, 2004, Lipinski *et al.*, 1997).

La taille des particules est aussi un facteur déterminant pour la sélection de la voie à emprunter. Les particules peuvent soit être assez petites pour passer par diffusion dans la peau ou pénétrer par le follicule pileux. La taille conditionnant la voie de passage est encore largement discutée dans la littérature. Selon Larese Filon *et al.*, (2015), si le diamètre de la

particule (ex : nanoparticule minérale) est supérieur à 21 nm, elle restera à la surface de la peau saine. S'il est compris entre 4 et 20 nm, la particule peut potentiellement entrer par diffusion. Enfin, si le diamètre est inférieur à 4 nm, la particule entre par le *stratum corneum* par diffusion.

2.2.1.1.1.3. L'affinité de la substance pour le *stratum corneum*

L'affinité de la substance (évaluée par le coefficient de partage, ou log P) pour la couche cornée peut augmenter ou réduire la pénétration cutanée. Les lipides intercellulaires du *stratum corneum* confèrent des propriétés hydrophobes à cette couche. L'agent chimique doit ensuite passer par l'épiderme viable qui est hydrophile. Idéalement, un composé amphiphile (avec une partie hydrophobe et une partie hydrophile) pourra pénétrer facilement puisqu'il aura de l'affinité pour le *stratum corneum* et pour l'épiderme viable. Si la molécule est hydrophile, elle ne pourra pas passer la couche cornée, si elle est lipophile, la substance aura tendance à être stockée dans le *stratum corneum* (Naik *et al.*, 2000). La diffusion d'une substance à travers la peau est plus importante quand son log P est compris entre 1 et 3 (Brain & Chilcott, 2008). Les log P des NOP sont compris entre 1 et 3 et pénètrent donc rapidement dans la peau. Dans une étude réalisée par Saleh *et al.* (1997), la distribution de ¹⁴C-malathion a été étudiée par autoradiographie électronique de sections du corps entier des rats traités après administration intraveineuse, orale et par voie cutanée. Il a été ainsi démontré que la peau peut jouer le rôle de réservoir pour le composé après l'application cutanée.

2.2.1.1.1.4. La volatilité des agents chimiques

La volatilité des armes chimiques de guerre affecte leur toxicité en réduisant la quantité d'agent toxique disponible pour la pénétration cutanée. Par exemple, pour le VX qui est peu volatil, toute la quantité déposée sur une surface cutanée peut pénétrer dans la peau. Pour les agents G, très volatils, la dose létale (DL₅₀) percutanée est 1000 fois moins importante que la DL₅₀ en intraveineuse (Chilcott, 2007) (Tableau 5).

Tableau 5: DL₅₀ des agents G chez des rats Wistar males par administration sous cutanée et percutanée (^aJohn *et al.*, 2009, ^bVilla *et al.*, 2007, ^cMisik *et al.*, 2015, ^dMunro *et al.*, 1994).

	Tabun	Sarin	Soman	VX
Pression de vapeur (Pa)	4,9	280	53	9,3.10 ⁻²
Volatilité (mg/m ³)	612	17000	3000	10
DL ₅₀ sous cutanée (mg/kg)	0,270 ^a	0,11 ^a	0,12 ^a	0,012 ^a
DL ₅₀ percutanée (mg/kg)	83 ^a	118 ^c	9,98 ^c	0,085 ^d

Les pommades ou les vêtements imperméables empêchent l'évaporation des agents chimiques, l'agent restera donc sous forme liquide. La volatilité des agents chimiques est réduite et leur pénétration cutanée augmentée (Brain & Chilcott, 2008; Wester *et al.*, 2000).

2.2.1.1.1.5. La température

La diffusion à travers la peau est dépendante de la température :

$$D = D_0 e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Avec :

D_0 = coefficient de diffusion à dose infinie (m^2/s)

E_a = énergie d'activation (J/mol)

R = la constante des parfaits (8,31 J/mol/K)

T = la température (K)

La chaleur corporelle et l'environnement modulent alors la pénétration cutanée. C'est ce qu'a démontré Renshaw en 1946 en montrant l'influence de la température cutanée sur la pénétration de l'ypérite (Figure 10).

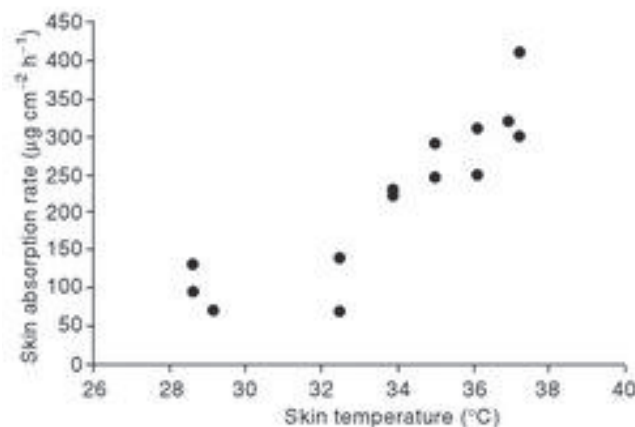


Figure 10 : Effet de la température cutanée sur l'absorption à travers une peau humaine abdominale après 1h d'exposition à l'ypérite radiomarqué (Renshaw, 1946).

Craig *et al.* (1977) ont exposé des hommes placés dans des chambres à température contrôlée de $-18^{\circ}C$ à $46^{\circ}C$ au VX. La vitesse de pénétration du VX est évaluée en fonction du taux d'inhibition des cholinestérases dans le sang. A $-18^{\circ}C$, la quantité de VX ayant pénétré la peau après 3h d'exposition est de 4%. A $46^{\circ}C$, le taux de pénétration est augmenté d'un facteur 10

(32%). Ainsi, le temps de stockage des agents lipophiles tels que le VX peut diminuer lorsque la température est augmentée car celle-ci modifie la fluidité du *stratum corneum*.

2.2.1.1.1.6. La localisation anatomique

La différence de composition et l'épaisseur du *stratum corneum*, la composition du film hydrolipidique, le nombre et taille des follicules pileux en fonction des sites anatomiques influencent la perméabilité aux agents chimiques (Wester & Maibach, 1999 ; Maibach *et al.*, 1971 ; Craig *et al.*, 1977).

Maibach *et al.* (1971) ont montré des vitesses d'absorption cutanée de parathion radiomarké différentes en fonction des sites anatomiques de volontaires masculins en analysant l'urine sur 5 jours. Ils ont démontré que le scrotum était la zone la plus sensible avec une absorption de 100% de parathion. L'absorption minimale est au niveau de l'avant-bras avec 8.6% de parathion absorbé. Les zones habituellement exposées et sensibles telles que le front et le cuir chevelu relativement perméables sont à protéger en premier lieu lors d'une exposition à un COP.

2.2.1.1.2. La pénétration à travers l'épiderme viable

Après le passage de la couche cornée, les molécules passent à un environnement plutôt hydrophile. La pénétration va dépendre d'autres facteurs et notamment du coefficient de diffusion D (en m²/s) de la substance appliquée. Le passage des molécules du milieu extérieur au travers de la peau se fait par diffusion passive définie par la loi de Fick (Crank, 1979):

$$J = \frac{dQ}{dt} = K_p \cdot S \cdot (C_1 - C_2)$$

$$K_p = \frac{D \cdot K}{e}$$

Avec :

J : flux ou vitesse d'absorption (µg/cm²/s)

K_p : coefficient de perméabilité (cm/s)

S : surface d'application (cm²)

C₁-C₂ : différence de concentration appliquée (µg/cm³)

D : coefficient de diffusion de la substance (cm²/s)

K : coefficient de partage de la substance

e : épaisseur de la membrane (cm)

Selon cette équation, on en déduit que la diffusion est d'autant plus importante que la différence de concentration est grande (une couche doit être proche de la saturation) et que l'épaisseur de la peau est petite.

Un paramètre à contrôler est la dose appliquée. Il est possible de travailler soit dans des conditions de dose dite « finie », soit en « dose infinie ». La technique de dose infinie consiste à appliquer une dose suffisante pour que les changements de concentration du milieu donneur, causés par la diffusion ou par évaporation soient négligeable (Brain *et al.*, 2002). La dose finie reproduit les conditions réelles d'utilisation, la cinétique présente alors un ralentissement final témoignant de la déplétion du milieu donneur. En dose infinie, le calcul de K_p est possible sur la partie linéaire de la cinétique de perméation en appliquant la loi de Fick.

Wester & Maibach (1993) ont montré que la quantité absorbée de benzène par la peau est proportionnelle à la concentration déposée sur la peau.

Lorsqu'une étude est faite sur la cinétique de pénétration d'une substance, la quantité de produit absorbée est mesurée en fonction du temps. Trois paramètres sont déterminés à partir de la courbe (Figure 11) :

- les quantités absorbées,
- le temps de latence (t_{lag}) qui est le point d'intersection entre l'extrapolation de la portion linéaire et l'axe des abscisses. Ce temps de latence correspond à la saturation de la couche la plus superficielle permettant ensuite le phénomène de diffusion vers la couche moins superficielle. Plus le temps de latence d'un toxique est grand, plus on a le temps pour effectuer la décontamination.
- le flux J correspondant à la pente de cette portion linéaire.

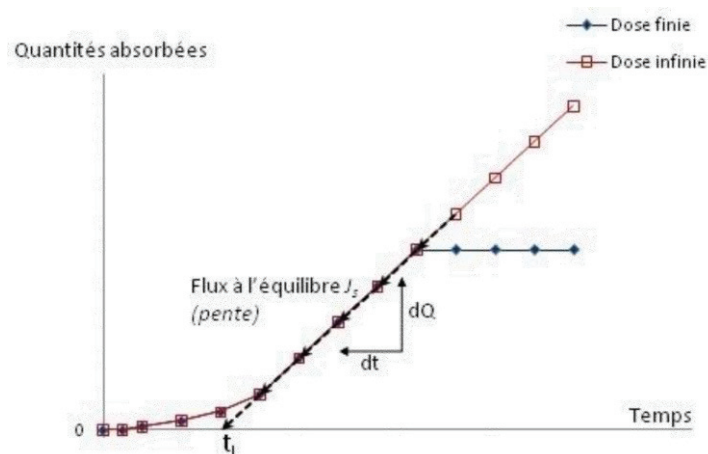


Figure 11 : Représentation graphique de la cinétique de l'absorption cutanée d'une substance

Ici, la perméation va surtout dépendre de la nature de la substance pénétrante mais aussi de l'épaisseur de l'épiderme et du derme.

Le tableau 6 indique le flux et temps de latence calculés et trouvés dans la littérature après étude de la pénétration de différents COP à travers un explant de peau.

Tableau 6 : Flux et temps de latence de COP retrouvés dans la bibliographie. Les études ont été faites en cellule de Franz sur peau dermatomée

Agent chimique	Nature de la peau	Epaisseur peau (μm)	Quantité d'agent déposé	J_{max} ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$)	T_{lag} (h)	Référence
VX	Cochon d'Inde	500	100 μL	2,41 \pm 0,98	0,9 \pm 0,2	Dalton <i>et al.</i> , 2006
	porc	500		0,21 \pm 0,06	6,3 \pm 0,9	
	homme	500		0,33 \pm 0,23	4,6 \pm 1,2	
VX	porc	440 \pm 10	5,7 μL	0,10 \pm 0,01	1,6 \pm 0,6	Vallet <i>et al.</i> , 2008
Soman	Porc	500	50 μL	0,01 \pm 3,09	Non renseigné	Dalton <i>et al.</i> , 2015
Paraoxon	porc	530 \pm 50	5,7 μL	0,006 \pm 0,006	3.4 \pm 1,7	Millerioux <i>et al.</i> , 2009b
DFP (simulant des agents G)	homme	610 \pm 140	5.7 μL	0,06 \pm 0,02	1,8 \pm 0,2	Vallet <i>et al.</i> , 2007
	porc	610 \pm 140		0,09 \pm 0,01	1,0 \pm 0,1	

On remarque ainsi que le POX, malgré des propriétés physico-chimiques similaires au VX, pénètre beaucoup moins rapidement et est plus longtemps stocké dans le *stratum corneum* que le VX.

On peut aussi noter que la peau de cochon d'Inde est 10 fois plus perméable au VX que la peau humaine (Dalton *et al.*, 2006) et constitue un mauvais modèle pour la pénétration cutanée.

2.2.1.1.3. La résorption au niveau du derme

Au niveau du derme, la circulation sanguine va résorber une partie de la substance et la microcirculation cutanée va aussi jouer sur l'absorption. La proximité des capillaires sanguins augmente la vitesse de résorption et explique le haut taux de pénétration à l'arrière de l'oreille par exemple (Rougier *et al.*, 1999).

Les modifications de flux sanguin dans le cas d'érythèmes provoqués par absorption de tensioactifs, de solvants, d'acides, de bases vont augmenter l'absorption dans la circulation générale. Ainsi, Singh & Roberts (1994) ont aussi montré que la vasoconstriction des vaisseaux grâce à la phényléphrine diminuait la perméation cutanée de l'acide salicylique.

2.2.1.2. La voie transannexielle

La voie transannexielle permet le passage d'ions, de molécules de grosses tailles (jusqu'à 300 nm), d'électrolytes ou de particules avec moins de résistance qu'au travers les différentes couches de l'épiderme. Alvarez-Román *et al.* (2004) a démontré que les nanoparticules (NPs) de polystyrène (diamètres 20 et 200 nm) s'accumulent préférentiellement dans les follicules pileux de la peau de porc.

Les follicules pilo-sébacés ont longtemps été considérés comme des shunts permettant le passage plus rapide des molécules dans des zones comportant de forte densité de follicules (comme le cuir chevelu). Cette voie mène les molécules jusqu'au derme réticulaire. Les molécules auront donc d'autant plus de facilité à passer directement dans le derme qu'elles pourront diffuser dans leur contenu, le sébum lipophile. Les molécules pourront donc passer facilement dans les follicules pileux et les glandes sébacées. Le sébum représente par contre une barrière pour les molécules hydrophiles (Grams & Bouwstra, 2005). Les formulations de type nanoémulsion peuvent pénétrer jusque dans les tissus plus profonds grâce à la voie folliculaire chez les rats (Lauer *et al.*, 1997) et les souris avec poils (Wu *et al.*, 2001).

Certaines études comparent le taux d'absorption des molécules via la voie folliculaire et via la voie transépidermique. Barry (2002) a démontré que la pénétration percutanée via les follicules pileux du mannitol, hydrophile, *in vitro*, représente 54% de la pénétration percutanée totale. Teichmann *et al.* (2005) a étudié l'absorption cutanée, *in vivo* sur le dos d'un homme, d'une émulsion huile dans eau marqué à la fluorescéine. Il a ainsi démontré que, 30 min après application, 5% de la fluorescéine était retrouvée dans l'infundibulum et 95% dans le *stratum corneum*. Ces études sont donc en contradiction avec les articles cités précédemment.

La densité annexielle est par conséquent un paramètre important pour la perméation cutanée. Des études comparant la pénétration d'une gamme de médicaments à travers le cuir chevelu humain et à travers la peau abdominale montrent l'influence d'une plus grande densité des follicules (Ogiso *et al.*, 2002). Cone (1996) a constaté une corrélation positive entre la pénétration folliculaire et l'activité des follicules pileux (production de sébum et croissance du follicule). Il a aussi été démontrée que la perméabilité au VX étant plus importante sur peau d'oreille de porc, dont le diamètre des follicules est plus important que la peau abdominale

humaine (Rolland *et al.*, 2011). Ceci suggère que l'infundibulum joue un rôle de réservoir du VX.

2.2.2. Les modèles d'étude de la pénétration cutanée *in vitro/in vivo/in silico*

Selon l'objectif de l'étude et ses contraintes, plusieurs approches expérimentales peuvent être envisagées :

- *in vivo* : le processus biologique est directement étudié sur l'homme ou sur l'animal,
- *in vitro* : signifie que le test est effectué en dehors de l'organisme vivant ou de la cellule,
- *in silico* : les résultats des expérimentations sont déduits à partir de modèles informatiques en utilisant les propriétés structurales et physicochimiques des composés.

2.2.2.1. Les études *in vivo* sur l'homme

Les premières études de pénétration cutanée des COP ont été effectuées *in vivo* sur homme. La majorité des expérimentations portent sur l'absorption cutanée du VX. Même si les propriétés physico-chimiques et la dose létale du VX diffèrent des autres agents G (Sidell 1997; Opresko *et al.* 1998; Munro *et al.* 1994), les différences relatives à l'absorption de l'agent étudié en fonction du site anatomique donné seraient similaires pour tous les agents neurotoxiques d'intérêt, indépendamment de propriétés chimiques et physiques spécifiques à l'agent (Watson *et al.*, 2003).

Pour comparer les taux d'absorption en fonction des sites anatomiques, les auteurs dosent le taux de cholinestérase dans le sang ou observent les signes et symptômes (Sim & Stubbs, 1960; Sim, 1962; Craig *et al.*; 1977). D'autres articles utilisent des COP radio-marqués. La substance radio-marquée est visualisée par autoradiographie dans tous les tissus du corps, excréta ou plasma.

2.2.2.2. La pénétration cutanée *in vivo* sur porc

Les études sont majoritairement effectuées sur animal pour des raisons éthiques et réglementaires. En effet, les études sur volontaires sont lourdes (nombre important de biopsies nécessaires pour certaines études), chères, et désormais très réglementées (Déclaration

d'Helsinki, 1964 et mises à jour: World Medical Association, 2004; International Conference on Harmonization Guideline for Good Clinical Practice: ICH, 1996).

Les animaux de laboratoire comme le lapin, le rat et le cochon d'Inde ont une peau plus perméable aux substances que la peau humaine (Dalton *et al.*, 2006). Il a été montré que le porc était le modèle animal le plus pertinent pour l'homme pour les études de pénétration percutanée d'agents neurotoxiques, à la fois *in vivo* (Chilcott *et al.*, 2005, Duncan *et al.* (2002); Bartek *et al.*, 1972) et *in vitro* (Dalton *et al.*, 2006 ; Schmook *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2002 , Rolland *et al.*, 2011). Les caractéristiques histologiques de la peau de porc et de la peau humaine sont comparables (Rolland *et al.*, 2011 ; Jacobi, 2007). Jacobi (2007) a comparé la structure de la peau d'oreille de porc (épaisseur des différentes couches, annexes cutanées) avec celle de l'homme (trouvé dans la littérature). L'épaisseur du *stratum corneum* de la peau d'oreille de porc est de 21 μm vs 6-19 μm pour l'homme, l'épaisseur de l'épiderme viable est de 72 μm vs 70-80 μm pour l'homme, le derme a une épaisseur de 1,86 mm vs 1,8 mm chez l'homme. Les lipides du *stratum corneum* sont aussi organisés de manière orthorhombique. Les annexes cutanées sont aussi semblables à ceux retrouvés chez l'homme. Malgré quelques différences dans la structure et la composition de la peau, la peau d'oreille de porc est un modèle pertinent de la peau humaine.

Comme pour l'homme, la vitesse de pénétration du toxique est suivie par dosage d'acétylcholinestérase dans le sang, suivi de la molécule radiomarquée au ^{14}C (Chilcott *et al.*, 2005 ; Figure 12), ou, pour le cas d'agent vésicant par analyse morphométrique de la zone endommagée de la peau, érythème (colorimétrie) (Kadar *et al.*, 2003 ; Figure 13).

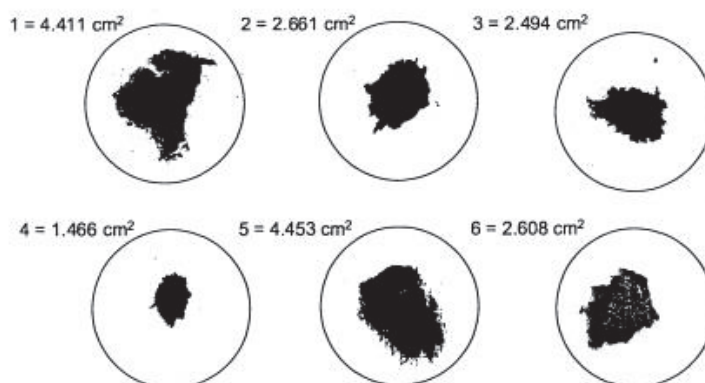


Figure 12: Images d'autoradiographies de peaux prises immédiatement après la mort de porc exposé au ^{14}C -VX. L'aire des zones sombres indiquent les zones où le VX est localisé. Leur aire est indiquée dans le coin supérieur gauche. Le temps de la mort de chaque animal était de 120, 62, 43, 180, 57 et 42 min pour les animaux 1-6, respectivement (Chilcott *et al.*, 2005)

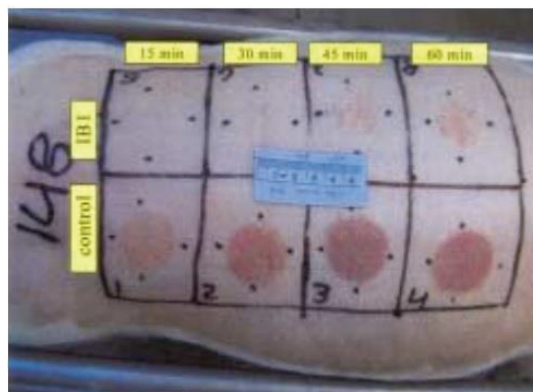


Figure 13: Photos de zones de peaux de porc exposées au gaz moutarde. Les zones contrôles (exposition, sans protection) sont situées en bas de la photo. Les zones protégées par un topique protecteur IB1 puis exposées au gaz moutarde sont dans la partie haute. (Kadar *et al.*, 2003).

2.2.2.3. Les études *in vitro*

Les études *in vitro* se font en cellule de Franz (Franz, 1975) et consistent à déterminer la pénétration des COP appliqués sur une membrane (peau, membrane silicone, peau reconstruite) placée entre un compartiment donneur et receveur (Figure 14).

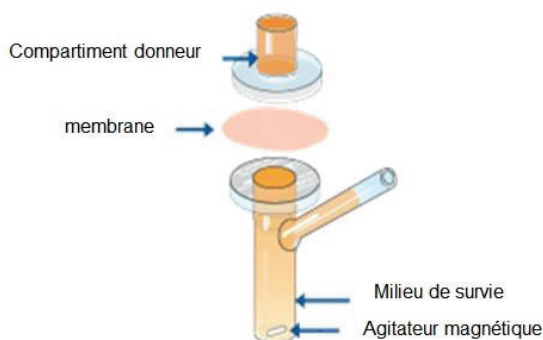


Figure 14: schéma d'une cellule de Franz

Le compartiment receveur (CR) est rempli d'un liquide physiologique, le "milieu de survie", dont le rôle est de maintenir la viabilité, l'hydratation et l'intégrité morphologique de la membrane. La cellule est placée dans un bain marie à 36°C environ afin de maintenir une température de peau à 32°C. Au début de l'étude, le toxique est déposé à la surface de la peau via le compartiment donneur. Selon l'étude, des prélèvements au niveau du CR peuvent être effectués afin de suivre la pénétration du toxique à travers la membrane en fonction du temps. A la fin de l'étude, la peau est récupérée et le toxique peut être quantifié dans plusieurs

fractions : sur peau entière ou dans les différentes couches de la peau (*stratum corneum*, épiderme viable, derme), dans le CR et à la surface de la peau.

Ces méthodes sont standardisées grâce aux directives de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), où sont détaillées les recommandations sur le protocole à suivre pour des études *in vitro* d'absorption percutanée (OCDE, 2004) comme la nature du milieu de survie à privilégier, les épaisseurs des peaux acceptées, la température de la surface cutanée, etc.

Les études *in vitro* font appel à deux grands types de membranes :

- biologiques ou explants cutanés d'origine humaine (déchets opératoires de plasties chirurgicales ou prélèvements post mortem) ou animale. Elles peuvent être utilisées sous différentes formes : la peau entière où les trois couches tissulaires de la peau (épiderme, derme, hypoderme) sont représentées et la peau dermatomée (épiderme et derme papillaire) dont le derme profond et l'hypoderme ont été éliminés. L'épaisseur des peaux est plus contrôlée dans le cas des peaux dermatomées (à l'aide d'un appareil: le dermatome pneumatique) que dans le cas des peaux entières (l'hypoderme est retiré par le manipulateur à l'aide d'un scalpel),
- artificielles telles que les peaux reconstruites ou des membranes synthétiques. Les peaux reconstruites sont des membranes assemblées *in vitro* à partir de cultures de différentes cellules cutanées humaines (Epiderm™, Episkin™, SkinEthic™). Les membranes synthétiques sont des monocouches homogènes en silicone, acétate de cellulose, polysulfone ou polyuréthane.

Un certain nombre d'études d'absorption cutanée (Bronaugh & Maibach, 1985; Bronaugh & Franz, 1986; Cnubben *et al.*, 2002) ont été effectuées à la fois *in vitro*, en dosant la molécule d'intérêt dans le CR et *in vivo*, en dosant cette même molécule excrétée dans l'urine.

La plupart des études montrent une bonne corrélation entre les études *in vitro* et *in vivo* (Tableau 7).

Tableau 7: Comparaison du pourcentage de molécule absorbée, *in vivo* et *in vitro*

Références	Molécules d'intérêt	Pourcentage d'absorption <i>in vivo</i> (%)	Pourcentage d'absorption <i>in vitro</i> (%)
Bronaugh & Maibach, 1985	2,4-dinitrochlorobenzene	53,1±6,2	32,5±8,7
	nitrobenzène	1,5±0,3	7,8±1,2
Bronaugh & Franz, 1986	Caféine dans de l'eau gélifiée	4,5±0,5	4,7±0,8
	Caféine dans de l'éthylène glycol gélifiée	55,6±11,7	52,2±7,3
	Caséine dans de la vaseline	40,6±6,1	40,6±2,2
Cnubben <i>et al.</i> , 2002	Ortho phenylphenol	42,9±3,7 Semi occlusif, rat	12,3±1,9 rat
		29,0±3,0 Non occlusif homme	19,5±4,7 homme

Cependant, certaines études (Bronaugh & Maibach, 1985 ; Bronaugh & Franz, 1986 ; Cnubben *et al.*, 2002) montrent que la pénétration des composés est plus faible *in vitro*. Ces résultats peuvent être expliqués par des conditions différentes telles que la température plus basse de la peau *in vitro* comparé au *in vivo* (Bronaugh & Franz, 1986), les effets d'occlusion (Cnubben *et al.*, 2002), les substances lipophiles ont aussi tendance à être stockées dans le tissu adipeux *in vivo*. Le métabolisme plus ou moins important peut aussi jouer sur ces différences d'absorption cutanée *in vitro/in vivo* (Bronaugh & Maibach, 1985; Bronaugh & Franz, 1986). D'autres facteurs peuvent expliquer ces différences : la possibilité de pénétration contrôlée par des mécanismes actifs (transporteurs) qui ne le sont pas *in vitro*, le flux sanguin mal représenté par la cellule de Franz, le renouvellement du milieu dans le CR, etc.

Des études ont porté sur la comparaison de l'absorption cutanée de COP à travers une peau humaine/ peau de porc ou peau/membranes synthétiques/reconstruites :

Une partie de l'article de Bignon *et al.* (2016) porte sur l'évaluation de la cinétique de pénétration du POX (5 mg/cm²) sur différentes membranes. L'étude est effectuée *in vitro*, en cellule de Franz, sur 3 types de membranes : une membrane reconstruite (Strat-M[®]), une membrane silicone et une peau humaine. Des prélèvements sont effectués régulièrement dans le CR de la cellule jusqu'à 24 h après exposition. Les résultats montrent que la perméabilité des membranes reconstruites (20% de POX est dosé dans le CR après 24 h d'exposition) est plus

importante que sur membrane silicone (15% de POX dans le CR) et encore plus importante que sur peau humaine (2,5% de POX).

Millerioux *et al.* (2009b) ont étudié l'absorption du VX ($Q_0 : 5,7 \text{ mg/cm}^2$) *in vitro* en cellules de Franz à travers différentes membranes: peau d'oreille de porc dermatomée (épaisseur de $530 \mu\text{m}$), peau abdominale humaine dermatomée ($430 \mu\text{m}$) et membrane en silicone ($400 \mu\text{m}$). Le flux de VX à travers la membrane en silicone (flux de $71,3\% Q_0/\text{h}$) est beaucoup plus important que celui obtenu à travers la peau d'oreille de porc ($5,3\% Q_0/\text{h}$), avec un temps de latence 10 fois plus court. Comparée à la peau d'oreille de porc, la perméation du VX à travers la peau abdominale humaine a un temps de latence supérieur et une vitesse de pénétration moins élevée (Figure 15).

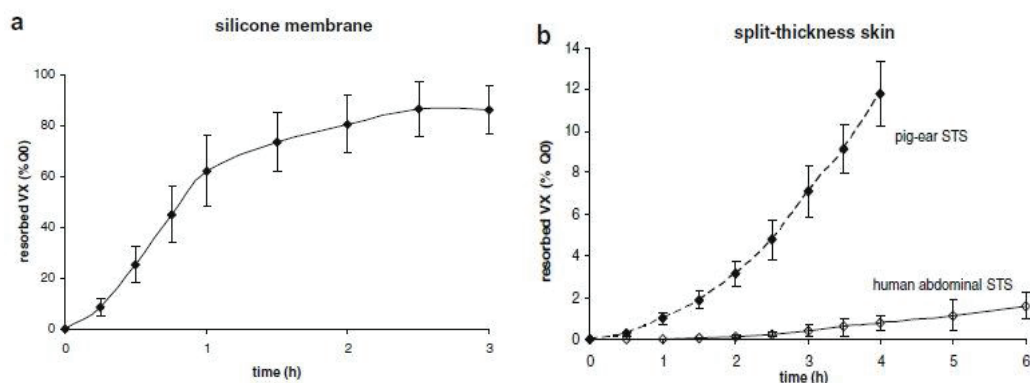


Figure 15 : Absorption cutanée *in vitro* du VX ($Q_0 : 5.7 \text{ mg/cm}^2$) à travers une membrane de silicone (a), une peau d'oreille de porc dermatomée et (b) une peau abdominale humaine dermatomée (Millerioux *et al.*, 2009b).

Rolland *et al.* (2011) ont comparé l'absorption cutanée du VX ($Q_0 : 5 \text{ mg/cm}^2$) à travers différents explants cutanés : le cuir chevelu humain, la peau d'oreille de porc, la peau de la tête du porc dans le but de concevoir un modèle pertinent du cuir chevelu humain. Ils ont montré que la peau d'oreille de porc était le modèle le plus pertinent pour prédire la perméabilité du cuir chevelu humain *in vitro*. L'étude montre aussi que la peau d'oreille de porc et la peau abdominale humaine ont des épaisseurs de peau, *stratum corneum*, densité folliculaire semblables (Figure 16).

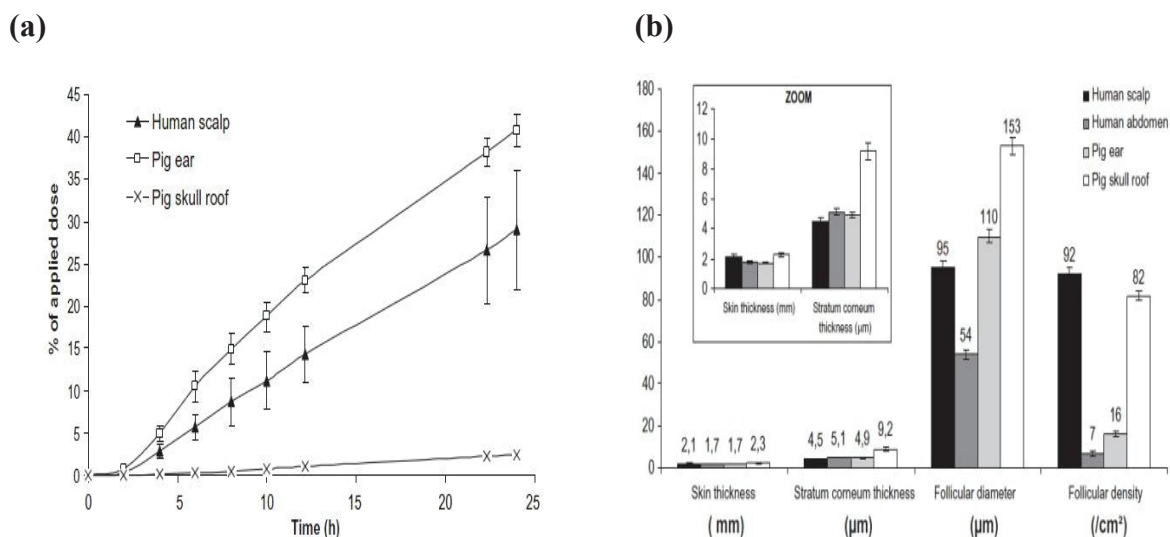


Figure 16 : (a) Absorption cutanée *in vitro* du VX (5 mg/cm²) à travers le cuir chevelu humain, la peau d'oreille de porc et la peau du crane de porc. (b) Comparaison de l'épaisseur de la peau et du stratum corneum, diamètre folliculaire et la densité folliculaire de peau humaine et de la peau de porc (Rolland *et al.*, 2011)

Mircioiu *et al.*, 2013 ont étudié l'absorption cutanée du soman et de POP (chlorpyrifos, dichlorvos et malathion) à travers une peau fémorale humaine, des membranes synthétiques hydrophiles (cuprophane, acétate de cellulose, méthyl éthyl cellulose) et des membranes synthétiques hydrophobes (l'acétophénane et nylon). Lors de l'utilisation des membranes synthétiques, aucun temps de latence n'est observé contrairement à la peau humaine. Le taux de POP absorbé par les membranes dépend directement de leur coefficient de partage et de leur affinité avec les membranes synthétiques. Néanmoins, le pourcentage de POP transféré est comparable avec la peau humaine.

En conclusion, il est difficile de comparer les résultats entre différents articles/études car les conditions et modèles sont différents. Les membranes synthétiques sont plus simples d'utilisation et présentent une meilleure reproductibilité rapport à un explant de peau humaine ou animale. Cependant, ce modèle n'est pas pertinent car le temps de latence est très différent de celui mesuré avec la peau humaine.

2.2.2.4. Les simulants de composés organophosphorés

A cause de la grande toxicité des armes chimiques de guerre et de leur accessibilité restreinte aux laboratoires des Armées, des simulants moins toxiques et ayant des propriétés physico-chimiques similaires sont utilisés par des laboratoires universitaires. Des auteurs

cherchent par exemple à trouver un simulant qui inhibe l'acétylcholinestérase, et mime le phénomène de vieillissement de l'enzyme. Meek *et al.* (2012) synthétisent quatre simulants différents: 4-nitrophenyl ethyl dimethylphosphoramidate (NEDPA, simulant du tabun), 4-nitrophenyl ethyl methylphosphonate (NEMP, simulant du VX), phthalimidyl isopropyl methylphosphonate (PIMP) et 4-nitrophenyl isopropyl methylphosphonate (NIMP), deux simulants du sarin (Figure 17). Le NIMP est moins dangereux à synthétiser que le PIMP, plus stable et inhibe l'AchE comparé à d'autres simulants comme le bis-isopropyl methylphosphonate utilisé dans l'étude d'Ohta *et al.* (2006). Il pourrait donc être utilisé pour les études visant à réactiver l'AchE. Le NEDPA inhibe moins l'AchE que le tabun et n'est donc pas conseillé comme simulant.

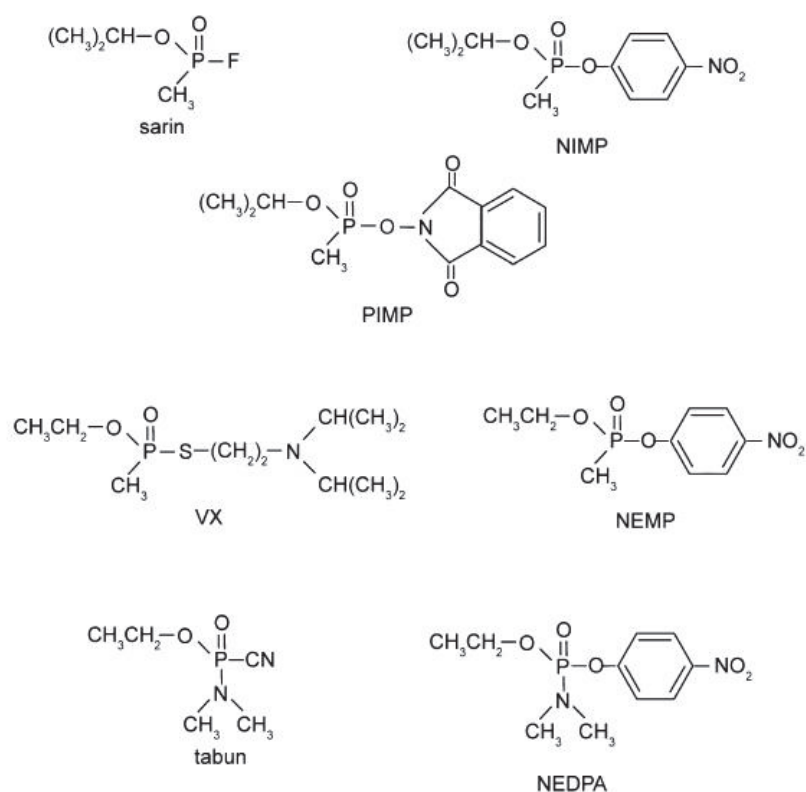


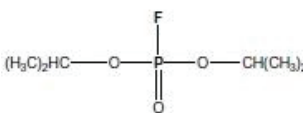
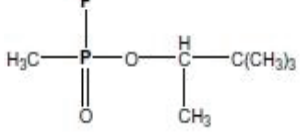
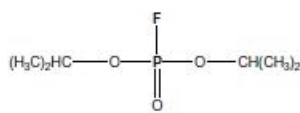
Figure 17 : Structure chimique du VX, sarin, et tabun ainsi que leurs simulants (NIMP, PIMP, NEMP, and NEDPA) (Meek *et al.*, 2012).

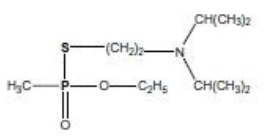
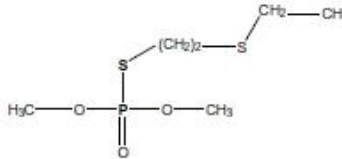
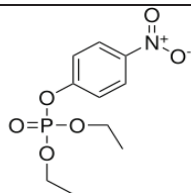
D'autres études visent à avoir des simulants ayant les mêmes propriétés d'absorption cutanée que les COP.

La volatilité, la lipophilie et les masses moléculaires, leur métabolisme dans la peau sont pris en compte pour le choix du simulant puisque ces propriétés influencent la vitesse de pénétration. Le parathion ou le POX sont des simulants connus du VX (Koper *et al.*, 1999 ; Millerioux *et al.*, 2009a ; Wester *et al.*, 2000) pour l'absorption cutanée. Vallet *et al.* (2007) utilise les pesticides DSM (demeton-S-methyl), comme simulant du VX, et le DFP

(diisopropylfluorophosphate), comme simulant des agents G, leurs propriétés physico-chimiques étant semblables (Tableau 8).

Tableau 8 : caractéristiques physico-chimiques du sarin, soman, VX ainsi que de leur simulant le DFP, DSM et POX (Vallet *et al.*, 2007 ; Millerioux *et al.*, 2009a).

	Sarin	Soman	DFP
Formule			
Poids moléculaire (g/mol)	140,1	182,2	184,15
Masse volumique (g/mL)	1,09	1,02	1,055
Pression de vapeur (Pa)	280	53	77
Solubilité dans l'eau (g/L) à 25°C	1,103	21	15,4
Log P	0,3	1,78	1,13

	VX	DSM	POX
Formule			
Poids moléculaire (g/mol)	267,4	230,3	275,2
Masse volumique (g/mL)	1,008	1,207	1,274
Pression de vapeur (Pa)	$9,3 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
Solubilité dans l'eau (g/L) à 25°C	30	3,3	2,4
log P	2,09	1,32	1,98

Sur peau de porc, le pourcentage de DFP absorbé par la peau après 3h d'exposition est identique à la quantité de VX absorbée déterminée par Chilcott *et al.* (2005). Néanmoins, le temps de latence est différent. Le DFP est quant à lui dégradé dans le CR et ne peut donc pas être utilisé comme simulant des agents G, même si les produits de dégradation sont similaires au soman et sarin.

Chapitre 2 : La prise en charge des victimes après exposition et décontamination

Plusieurs termes sont à différencier. La **contamination** a lieu lorsqu'un agent chimique se dépose sur un objet ou un être, ou bien est ingéré ou inhalé par la victime (Amiard, 2011). La **protection** permet d'agir en amont de la contamination et limite la pénétration du toxique. La **décontamination** se fait après le contact avec le COP et a pour but d'éliminer le toxique de l'organisme et d'éliminer ses effets (Vivien *et al.*, 2012). L'intoxication est un ensemble de troubles du fonctionnement de l'organisme dus à l'absorption de l'agent chimique.

La thèse se portant sur la décontamination, cette partie sera plus particulièrement développée.

1. La prise en charge en cas de contamination d'une zone par un organophosphoré

Les risques appelés NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique) sont des risques dus à une exposition « exceptionnelle » à des agents non conventionnels nucléaires, radiologiques, biologiques ou chimiques. Ces risques peuvent être liés à une pratique intentionnelle (guerre, terrorisme), non intentionnelle (catastrophe industrielle, transport de matières dangereuses) ou à un événement naturel comme une épidémie. Un agent chimique est d'autant plus dangereux s'il persiste sur tout ce qui a été touché (objets, vêtement, peau) amplifiant le nombre de victimes.

Le secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale (SGDSN) assure une mission de coordination interministérielle en matière de prévention et de réponse aux menaces de terrorisme NRBC-E (E pour explosif) (circulaire 700 du SGDN du 7 novembre 2008). Le SGDSN définit un programme interministériel d'actions en fonction de la nature de l'attaque terroriste. La circulaire 700 du SGDN (du 7 novembre 2008) concerne le plan d'action lors d'une contamination par des agents chimiques. Cette méthodologie est appliquée au niveau national permettant une coordination entre les équipes intervenant sur place et une meilleure efficacité face à une attaque chimique. Les dispositions figurant dans la circulaire sont destinées à orienter les services et les organismes chargés de la planification et de la conduite des opérations.

1.1. Les intervenants

Le commandement est composé du directeur des opérations de secours (DOS) et du commandant des opérations de secours (COS). Le DOS est soit le maire, soit le préfet représentant de l'Etat dans le département. Le COS est déterminé par le service départemental d'incendie et de secours (SDIS) à l'exception de la commune de Marseille, et des départements de Paris, Hauts-de-Seine, Seine-Saint-Denis et Val-de-Marne, où les fonctions de COS sont exercées conformément aux règles d'emploi respectivement par le commandant du Bataillon des marins-pompiers de Marseille et celui de la Brigade des sapeurs-pompiers de Paris.

Les premiers intervenants sur le terrain (services de secours, services de police, forces de gendarmerie, SMUR...) ont pour rôle de limiter la dispersion des victimes potentiellement contaminées et contaminantes et limiter la durée d'intoxication des victimes. L'organisation des actions des premiers intervenants et des services de secours est donnée en annexes 1 et 2.

1.2. Gestion des victimes sur les lieux de l'événement

La circulaire 700 décrit un schéma général d'intervention. Différentes zones sont mises en place. En premier lieu, la **zone d'exclusion (ZE)** correspondant à la zone contaminée ou contaminante (Figure 18). Elle est divisée en zone de danger immédiat (100 mètres autour du point d'attentat ou d'accident) et une zone de danger sous le vent (500 mètres autour du point d'attentat ou d'accident). En ZE, les équipes doivent avoir une tenue de protection adaptée aux risques. Une fois les victimes extraites de la ZE, une première décontamination dite d'urgence peut se faire avec de la terre à foulon sur les parties visuellement contaminées.

Les victimes sont ensuite dirigées dans une zone dite **contrôlée (ZC)** au point de regroupement des victimes (PRV) située à l'air libre ou dans une pièce non contaminée. A ce niveau, les victimes sont triées et dirigées vers :

- le point de regroupement des personnes impliquées (PRI) (victimes asymptomatiques mais potentiellement contaminées). Les victimes sont partiellement déshabillées (retrait d'au moins la couche de vêtements la plus extérieure ainsi que des chaussures) afin de limiter le plus possible l'intoxication (liée à la désorption des agents). Une fois tout risque de transfert de contamination écarté, elles sont conduites vers le Centre d'accueil des impliqués (CADI) se situant dans la zone de **soutien (ZS)**,

- le point de regroupement des victimes symptomatiques (PRV) où elles sont séparées en victimes valides et invalides. Celles-ci sont alors décontaminées : décontamination

d'urgence (déshabillage partiel et usage de dispositifs spécifiques pour la décontamination de la surface corporelle non protégée par les vêtements) puis approfondie (déshabillage complet et douche). Une fois décontaminées, les victimes passent en ZS et sont dirigées vers le poste médical avancé (PMA),

- le point de regroupement des personnes décédées (PRD).

La ZS est située au vent par rapport à la ZE. Après le PMA, les victimes vont vers le PRE (point de répartition des évacuations) où elles sont évacuées vers les établissements de soins.

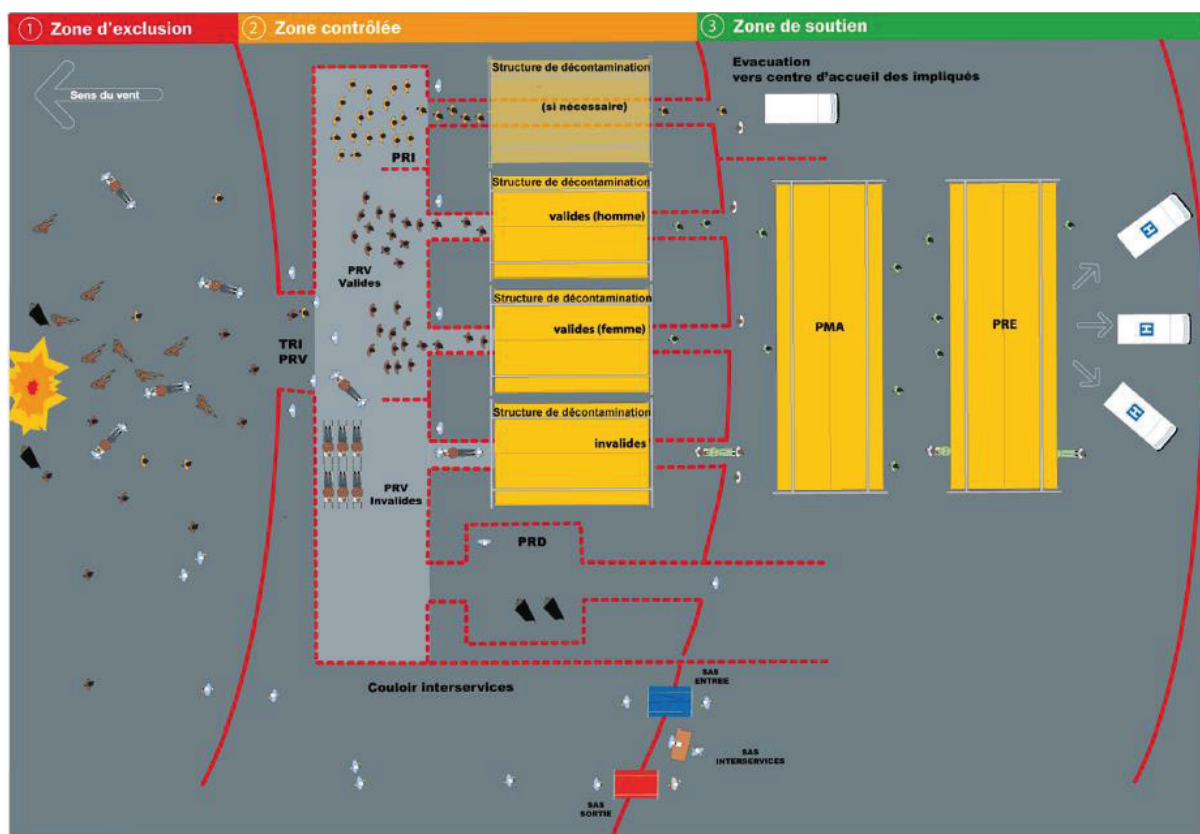


Figure 18 : Schéma général d'une intervention face à une action terroriste mettant en œuvre des matières chimiques (circulaire 700 du SGDN du 7 novembre 2008)

Le module de décontamination pré-hospitalière (MDPH) peut être envoyé sur tout le territoire comme renfort des secours locaux. Il peut être mobilisé et acheminé en quelques heures sur le terrain.

Les formations militaires de la sécurité civile sont équipées d'une chaîne de décontamination de masse qui permet la décontamination et le rhabillage de 1000 personnes valides et assure un flux de 100 personnes à l'heure.

Une signalétique est mise en place sur le lieu de l'intervention afin de visualiser rapidement les emplacements des sites et des zones de travail, permettre le contrôle des déplacements des intervenants (sapeurs-pompiers, services de police et forces de gendarmerie, SMUR, personnels militaires, équipes spécialisées d'expertise, d'analyse et d'intervention NRBC, personnes impliquées et victimes...), faciliter la communication entre les acteurs, porteurs de masques à gaz ou de cagoules de protection et les services, les victimes et les personnes impliquées. Les moyens de signalisation des périmètres de sécurité sont mis en place par les services de police et les forces de gendarmerie, conformément aux instructions du DOS après avis du COS.

2. La protection

2.1. La protection physique

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les militaires arrivent sur la ZE avec une tenue adaptée contre les risques chimiques permettant de protéger la surface corporelle et les voies respiratoires. Ces tenues sont composées de sous-gants carbonés et de gants en butyle pour les mains, de chaussettes carbonées et de surchaussures pour les pieds, d'une capuche et d'un masque pour la tête, et d'une tenue contenant, de l'extérieur vers l'intérieur, une couche hydrofuge, oléofuge et carbonée. Néanmoins, ces équipements présentent plusieurs inconvénients. En premier lieu, ces tenues posent un problème d'ergonomie et de confort réduisant l'efficacité des secours sur place. Si les tenues sont mal ajustées ou s'il y a des déchirures, il y a rupture d'étanchéité et risque de contamination. De plus, lors du déshabillage, il y a un risque de transfert de contamination d'une personne à une autre.

Ainsi des recherches sont menées afin d'augmenter l'ergonomie et le confort des tenues. Aussi, afin d'éviter les contaminations par transfert et d'augmenter la protection contre des agents chimiques, des topiques protecteurs ont été développés.

Les pompiers sont protégés par leur tenue de feu. Ces tenues ont été testées par le centre d'étude du Bouchet. Elles confèrent une protection contre l'ypérite liquide de 15 min (circulaire 700 du SGDN du 7 novembre 2008).

2.2. Les topiques protecteurs

Les topiques protecteurs cutanés ont pour objectif de ralentir et de limiter la pénétration des composés organophosphorés et de l'ypérite. Ils agissent en complément à une protection physique sur les zones cutanées les plus vulnérables et les plus perméables aux agents

chimiques comme le visage, le coup, les mains. Le topique protecteur idéal doit rassembler le maximum de critères suivantes (Josse *et al.*, 2006):

- être efficace c'est-à-dire ralentir et prévenir la pénétration cutanée des COP. Pour une quantité donnée, la durée de l'efficacité après application doit être la plus longue possible,
- la stabilité sur la peau, en fonction notamment de l'hydratation cutanée et de la transpiration,
- l'innocuité (non irritants et non allergisants),
- la quantité à appliquer et la simplicité de mise en œuvre. Les équipes américaines ont estimé que 15 g de topique protecteur sont suffisants pour couvrir 20 % de la surface corporelle,
- la tolérance (ex. : compatibilité avec la pratique d'une activité physique),
- la compatibilité avec le dispositif de décontamination associée,
- un coût faible,
- compatibles avec d'autres topiques cutanés comme les crèmes solaires, insectifuges, camouflages...

Depuis l'utilisation de l'ypérite lors de la première guerre mondiale, l'armée américaine a cherché à formuler des topiques protecteurs de première génération (« Topical Skin Protectant » ou TSP) sous forme de pommade ou de lotion (Romano & Filbert, 1999). Ces topiques agissent comme une barrière passive : les toxiques sont non neutralisés et une décontamination associée est indispensable. Quelques formulations ont permis de réduire les rougeurs sur la peau due à la contamination par des vésicants mais aucune n'a permis de protéger efficacement la peau. La recherche sur ces TSP a continué entre les deux guerres et lors de la seconde guerre mondiale, la crème M-5 a été développée pour renforcer la protection de la peau vis-à-vis de l'ypérite. Il s'en est suivi un élargissement du spectre d'efficacité de cette crème aux composés organophosphorés pendant la seconde guerre mondiale. Les recherches ont mené vers des matrices à base de polyethylene glycol (PEG) montrant une bonne efficacité de protection in vivo vis-à-vis de plusieurs composés organophosphorés. Cependant, ces crèmes comportaient plusieurs inconvénients : l'épaisseur importante nécessaire pour leur efficacité (0,22 mm), leur faible résistance à la transpiration ou à l'exposition à l'eau.

Récemment, la recherche s'est tournée vers l'utilisation de produits à bases de composés perfluorés. Ces composés ont des propriétés aussi bien hydrophobes qu'hydrophiles qui permettent la formulation de topiques résistant à l'eau, et efficaces avec une épaisseur de 0,1 mm. Ces recherches ont conduit au développement de la SERPACWA (Skin Exposure

Reduction Paste Against Chemical Warfare Agents) aux Etats-Unis, approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en 2000 pour une utilisation en complément d'une tenue de protection. La SERPACWA est une pâte composée de 50% de perfluoroalkylpolyéther (PFPE) et 50% de polytétrafluoroéther (PTFE). Les britanniques développent aussi un TSP appelé l'Ag-7 ("anti-gas n°7"), une émulsion composée 70% de PFPE et de 30% de PTFE (Chilcott et al, 2005). L'hydrogel A16 (contenant des polymères hydrophiles donner plus de détails comme pour les autres produits) a montré une protection supérieure *in vitro* (réduction significative du flux de VX à travers une membrane de silicone, augmentation significative du temps de latence par rapport au contrôle non protégé) (Millerioux *et al.*, 2009b).

Tous ces travaux ont mené au développement de topiques protecteurs de seconde génération ou « active TSP (aTSP) » incorporant des molécules capables de piéger ou de dégrader les composés organophosphorés ainsi que l'ypérite (ex: NPs d'oxydes métalliques). Actuellement, des équipes américaines cherchent à transformer la SERPACWA en aTSP. En France, des polymères ont été greffés à des NPs d'oxydes métalliques (CeO₂) (HASE-F/CeO₂) permettant la dégradation du Paraoxon. La pénétration du Paraoxon *in vitro* à travers une membrane siliconée est réduite de moitié lorsque ce HASE-F/CeO₂ est utilisé en protection en comparaison à l'utilisation du polymère non greffé (Zenerino *et al.*, 2015).

3. La détoxification

Le traitement après intoxication à un OP suit quatre axes (Bertrand *et al.*, 2006):

- oxygénothérapie, voire intubation orotrachéale et ventilation artificielle afin de corriger le manque d'oxygène (hypoxie).

- injection d'atropine (anticholinergique) permettant de corriger le syndrome muscarinique de l'intoxication en bloquant les récepteurs cholinergiques. L'atropine est sous forme injectable et l'administration est effectuée en intraveineuse ou intra musculaire (2 mg toutes les 5-10 min jusqu'à l'assèchement des sécrétions bronchiques, levée de la bronchoconstriction, tachycardie légère (fréquence cardiaque supérieure ou égale à 80/min) et réduction de la transpiration.

- injection de pralidoxime, une oxime qui réactive les AchE. Les oximes sont des agents très nucléophiles qui peuvent par ailleurs permettre la dégradation des COP. Jusqu'à 2 g peuvent être injectés en intra veineuse ou intra musculaire.

- Les convulsions sont ensuite arrêtées par une injection intramusculaire de benzodiazépines (diazépam).

Une unique injection de pralidoxime ou d'atropine permet de prolonger la survie de la victime de plusieurs heures. Des injections répétées (200 à 400 mg à renouveler 30 min plus tard puis toutes les 4 à 6 h pour atteindre une dose totale de 4 g) permettent, en revanche, de rendre le traitement efficace aussi longtemps qu'il perdure. En cas de décontamination non efficace, le traitement peut être administré pendant toute la période où l'agent toxique qui a déjà pénétré dans la peau est résorbé (Joosen *et al.*, 2010).

4. La décontamination

4.1. Evaluation de l'efficacité de décontamination

4.1.1. *In vivo*

Les auteurs utilisent plusieurs méthodes pour comparer l'efficacité de décontamination de certaines substances. Dans le cas d'étude *in vivo* sur animal, le pourcentage d'inhibition de l'AchE, le flux du contaminant à travers la peau, le temps de latence, la fraction absorbée de toxique sont comparés. Ces mesures permettent d'avoir des données chiffrées permettant de faire des tests de différence significative entre le contrôle non décontaminé et un décontaminant ou entre plusieurs décontaminant.

L'apparition des symptômes liés à une intoxication à un COP est souvent mesurée en parallèle (Taysse *et al.*, 2007 ; Sawyer *et al.*, 2011 ; Hamilton *et al.*, 2004 ; Bjarnasson *et al.*, 2008; Worek *et al.*, 2014). Lors de l'exposition à l'ypérite, la surface de l'érythème peut être mesurée (Taysse *et al.*, 2007). Dans la majorité des autres cas, il s'agit de noter l'apparition et la durée des symptômes (salivation, convulsions locales ou généralisées, dépression respiratoire...) jusqu'à la mort de l'animal (Figure 19).

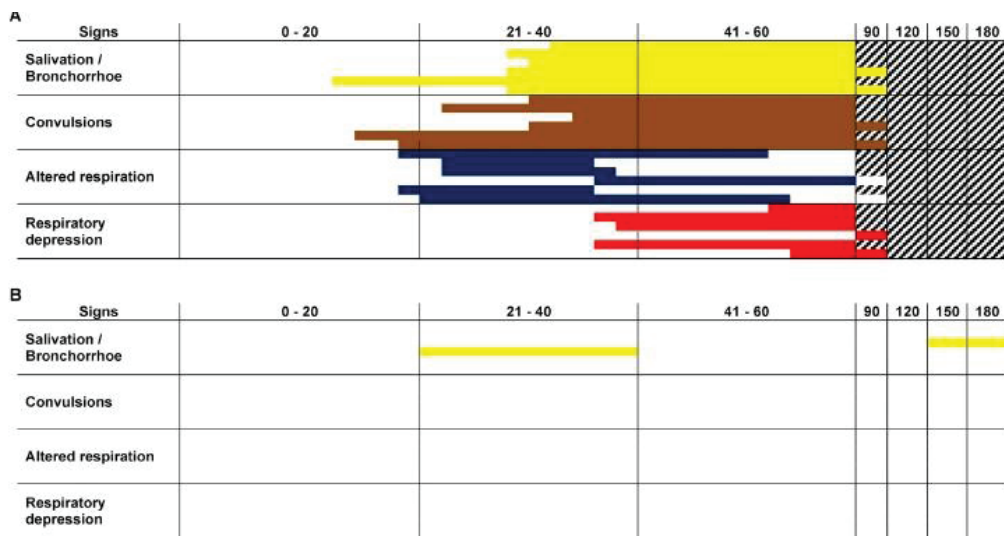


Figure 19 : Suivi des signes cliniques après injection de VX (18 mg/kg) en sous cutanée chez le cochon d'Inde pour (a) le contrôle (pas de décontamination), (b) injection d'une phosphotriesterase (*Brevundimonas diminuta* phosphotriesterase mutée) 5 min après exposition (Worek *et al.*, 2014).

La seconde méthode est de comparer la DL nécessaire pour tuer 50% des sujets dans le cas du contrôle et dans le cas des peaux décontaminées (Hurst, 1997 ; Clarkson *et al.*, 2012, Vücemilovic *et al.*, 2008, 2009). Le ratio entre la DL₅₀ pour les animaux décontaminés et la DL₅₀ pour les animaux non décontaminés est appelé « protective ratio » ou PR (Misik *et al.*, 2013). Il permet de comparer plusieurs décontaminant.

$$PR = \frac{DL_{50}(\text{animaux décontaminés})}{DL_{50}(\text{animaux non décontaminés})}$$

Ainsi, plus le PR est élevé, plus le décontaminant est efficace.

4.1.2. *In vitro*

Dans le cas d'étude *in vitro*, des ratios comparant les peaux décontaminés et non décontaminés peuvent être calculés. Par exemple, dans l'article de Josse *et al.* (2013), les auteurs calculent l'efficacité de décontamination (E) selon la formule suivante :

$$E (\%) = \frac{(SF+RF)_{\text{contrôle}} - (SF+RF)_{\text{décontaminé}}}{(SF+RF)_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Avec :

SF = la fraction de toxique présente dans la peau

RF = la fraction de toxique présente dans le compartiment récepteur

Ainsi, plus E augmente et plus le décontaminant est efficace.

De la même manière, Chilcott *et al.* (2001) évalue la différence de flux de toxique à travers la peau humaine sans et avec décontamination.

Un dispositif de décontamination vise à améliorer le pronostic fonctionnel (FP) (Norme AFNOR NF X 52-122, janvier 2016). Les FP peuvent être comparés et calculés de la manière suivante :

$$FP = \frac{Q_{2T} + Q_{3T} + Q_{4T}}{Q_2 + Q_3 + Q_4}$$

Avec:

Q_2 = la quantité de toxique présente à la surface de la peau immédiatement après le processus de décontamination, Q_{2T} pour le témoin,

Q_3 = la quantité de toxique dans la peau (c.-à-d. la somme des quantités dosées dans le *stratum corneum*, l'épiderme viable et le derme) à la fin de l'expérimentation, Q_{3T} pour le témoin,

Q_4 = la quantité de toxique résorbée (c.-à-d. dans le compartiment récepteur) à la fin de l'expérimentation, Q_{4T} pour le témoin.

4.2. Les dispositifs et les protocoles de décontamination

Après exposition aux agents chimiques, la décontamination de la surface corporelle est la première intervention nécessaire et implique une suppression immédiate du contaminant de la peau. Le premier acte réflexe après exposition à un composé OP est de retirer la couche externe des vêtements et de doucher la victime avec une grande quantité d'eau (douche ou rinçage intense) ou d'eau savonneuse afin de solubiliser et éliminer le toxique de la surface de la peau. En complément ou alternative, des systèmes de décontaminations agissant selon un ou plusieurs mécanismes (Chan *et al.*, 2012) peuvent être utilisés :

- des poudres ou des tissus pour l'adsorption,
- des actifs pour la dégradation/neutralisation des agents chimiques,
- un absorbant essuyant la peau afin d'en déloger les matières toxiques.

Un exemple de protocole de décontamination pour les victimes valides et invalides est donné en annexe de la circulaire 700 du SGDN du 7 novembre 2008 (annexe 3).

4.2.1. La solubilisation dans une grande quantité d'eau (douche ou rinçage intense), ou l'eau savonneuse

L'eau et l'eau savonneuse sont les systèmes efficaces de décontamination les plus facilement disponibles sur le terrain. Mis à part le sarin, les NOP sont relativement peu solubles dans l'eau (voir chapitre 1 § 1.2.3.4.3). Le rinçage avec de grandes quantités d'eau (douche, Figure 20) permet leur solubilisation, la diminution de la durée de contact de l'agent toxique avec la peau, et dans le cas de produits corrosifs, aide à restaurer le tissu à son pH normal réduisant ainsi les brûlures (Levitin et al, 2003 ; Hall & Maibach, 2006). Les victimes et intervenants sortant des zones contaminées sont douchés, si nécessaire avec les douches de la localité, les moyens d'arrosage des secours (circulaire 700 du SGDN du 7 novembre 2008). La plupart des études expérimentales ont montré l'avantage de rincer la peau dans les 10 premières minutes de contact. Lorsque la peau d'animaux contaminés par le sarin a été rincée avec de l'eau 2 min après exposition, il faut 10,6 fois plus de sarin pour produire les taux même de mortalité en l'absence de décontamination (Hurst, 1997).



Figure 20 : Photo d'un système de douche pour la décontamination massive après exposition à un agent chimique (Chilcott, 2014).

Néanmoins, l'utilisation d'eau a plusieurs désavantages (Chilcott, 2014):

- solubilisé dans l'eau, le toxique peut diffuser plus facilement dans l'environnement,
- les matières visqueuses sont difficiles à éliminer,

- les substances lipophiles peuvent avoir des taux de dissolution limités et l'emploi de détergents est nécessaire,
- la douche peut potentiellement conduire à l'hypothermie dans le cas où l'eau chaude/des abris sont indisponibles,
- l'eau peut augmenter l'absorption cutanée du toxique: on parle de wash-in-effect (Moody & Maibach, 2006).

Plusieurs mécanismes accélèrent la pénétration cutanée et expliquent le wash-in-effect : l'hydratation du *stratum corneum* par l'eau (voir partie I), les tensioactifs sont aussi des promoteurs d'absorption (délipidation, irritation de la membrane ou une irritation de la peau); le frottement, les réactions acide/base et les effets secondaires (altération de la barrière). Aussi, lors d'une douche, le jet peut venir retirer les couches supérieures du *stratum corneum* et rendre la peau plus perméable aux agents toxiques. D'un autre point de vue, les couches retirées sont théoriquement contaminées, ce qui permet une décontamination de la peau, même partielle (Reifenrath *et al.*, 1984).

Les tensioactifs ont la capacité de dissoudre ou émulsionner les contaminants de la peau (Boeniger, 2005). Parmi les tensioactifs anioniques, on peut citer les savons, qui sont des sels d'acides gras, produit par saponification. Les tensioactifs produits à partir du pétrole sont appelés des détergents. Misik et al (2013) ont étudié l'efficacité de différents détergents commerciaux (FloraFree™, Dermogel™, Argos™ et Neodekont™) sur la décontamination du soman (5 à 30 mg/kg), du VX (0,079 à 0,159 mg/kg) ou du Paraoxon (2 à 20 mg/kg). L'étude se fait *in vivo* sur des rats contaminés par un des 3 toxiques puis décontaminés 2 min après à l'aide d'un coton imbibé par l'un des 4 détergents commerciaux. Les résultats montrent que les détergents ne sont pas plus efficaces que l'eau pour la décontamination du soman et du paraoxon (pas de différence significative) (Tableau 9). L'Argos™ présente tout de même un « protective ratio » plus important que les autres détergents.

Tableau 9 : Protective Ration (PR) des détergents face aux différents COP, * Différence significative (p<0,05) (Misik *et al.*, 2013)

	Argos™	Dermogel™	FloraFree™	Neodekont™	eau
Soman	3,6	3,1	3,1	2,6	2,7
paraoxon	2,6	2,4	2,3	1,6	1,0
VX	64,8*	46,1	10,0	40,6*	43,2*

Loke (1999) a mené une étude *in vitro* sur la décontamination par de l'eau contenant des tensioactifs anioniques, des tensioactifs cationiques, des tensioactifs non ioniques, de l'eau déminéralisée ou de l'eau saline (concentrée de 0,9 à 9% en NaCl) 1 h après exposition au simulant malonate de diéthyle (simulant du soman). Les résultats ont montré que, par rapport à la peau non décontaminée, toutes les solutions accélèrent la pénétration du malonate de diéthyle dans les 2 h qui suivent la décontamination. Les solutions les plus efficaces pour la décontamination suivent cet ordre : tensioactif anionique> tensioactif cationique> tensioactif non ionique> eau déminéralisée> sérum physiologique> solution saline à 9%.

4.2.2. L'adsorption/absorption de l'agent toxique.

Le terme adsorption désigne l'adhésion en surface d'un solide, sans pénétration (Boeniger, 2005) contrairement à l'absorption qui désigne le phénomène où les atomes/molécules pénètrent dans un liquide/solide. La cellulose, les serviettes ou le coton sont des matériaux absorbants. Les poudres sèches telles que le talc ou la farine sont des adsorbants. On parle alors d'une décontamination sèche c'est-à-dire sans eau.

4.2.2.1. Les poudres adsorbantes

Des produits adsorbants facilement accessibles, tels que le talc et la farine peuvent être efficaces lors d'une décontamination d'urgence. Le talc appartient à la famille des argiles et possède alors une structure lamellaire qui lui permet d'adsorber facilement. La farine est composée à 70% d'amidon qui lui confère aussi de grandes propriétés d'adsorption. Van Hooidonk *et al.* (1983) a étudié l'efficacité de décontamination cutanée de la farine et du talc après 4 ou 30 min d'exposition au VX, soman et à l'ypérite, *in vivo* sur l'abdomen d'un cochon d'Inde. Dix mg d'adsorbant ont été appliqués 4 ou 30 min après exposition au toxique. La poudre est ensuite retirée à l'aide d'un mouchoir humide afin de retirer le toxique adsorbé dessus. Les résultats montrent que la farine et le talc sont plus efficaces que l'eau ou l'eau savonneuse. La farine permet de retirer 93% de VX et 98% d'ypérite.

La poudre adsorbante la plus connue est la Terre de Foulon (TAF), utilisée par l'armée française, qui est disponible en flacon poudreux ou en gant poudreux (Figure 21) (une face est constituée d'un réservoir de TAF entouré d'un film semi perméable et l'autre face comporte une éponge). La TAF fait partie des argiles. Elle est aussi appelée aussi montmorillonite. Son

mécanisme d'action consiste à venir absorber le toxique à la surface de la peau de par son affinité pour les molécules lipophiles. La composition moyenne de la terre à foulon est la suivante : 71,27 % SiO₂, 12,56% Al₂O₃, 5,40% Fe₂O₃, 2,13% MgO, 1,94% TiO₂, 1,22% K₂O, 0,69% CaO (Bajpai & Vishwakarma, 2003). Les propriétés physico chimiques sont résumées dans le tableau 10.

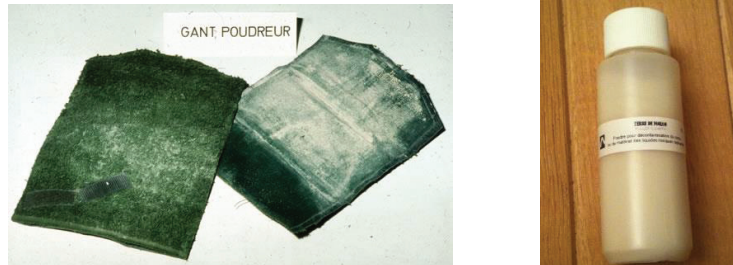


Figure 21 : Photos d'un gant et flacon poudreux contenant la Terre à Foulon

Tableau 10 : Propriétés physico chimiques de la terre à foulon (Bajpai & Vishwakarma, 2003)

Propriétés physico-chimiques	Valeurs numériques
Surface spécifique	120-140 m ² /g
Porosité	60-70% (volume de pore par rapport au volume total)
Diamètre des pores	190-200 Å
Taille moyenne des particules	10 µm

Du fait de sa grande surface spécifique et de son affinité pour les substances hydrophobes, la TAF est un adsorbant efficace pour la décontamination. Des études ont montré l'efficacité de décontamination de la TAF. Ces résultats sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Récapitulatif des études menées sur l'évaluation de l'efficacité de décontamination de la Terre à Foulon

Référence	<i>In vitro/in vivo</i> Modèle	Agent toxique et dose	Décontamination	Surface exposée	Résultats sur la peau non décontaminée	Résultats sur la peau décontaminée par la terre à foulon
Taysse <i>et al.</i> , 2007	<i>In vivo</i> porc	8 µL d'ypérite	5 min après exposition, tapotement avec une éponge contenant de la TAF	25 cm ²	Augmentation de l'érythème -67% d'activité de l'AchE après 6h d'exposition	Diminution significative de l'érythème (même par rapport à une éponge seule -16-19% d'activité de l'AchE après 6h d'exposition
		1,5 mg/kg de VX				
Josse <i>et al.</i> , 2015	cheveux	10 µL de VX	Application de 10g de TAF, 30 min après exposition au VX, douche 60 min après	10 g de cheveux	27% de VX reste sur les cheveux avec la douche	2% de VX reste sur les cheveux
Rolland <i>et al.</i> , 2013	<i>In vitro</i> Peau d'oreille de porc	5,7 µL de VX	70 mg de TAF, 45 min après exposition, frottement avec l'éponge du gant poudreux	9,42 cm ² (=7,43 mg de TAF/cm ² de peau)	10,8% de VX à surface de la peau 2,5% dans le stratum corneum 46,6% dans l'épiderme viable 11,3% dans le compartiment récepteur	0,7% de VX à surface de la peau 0,6% dans le stratum corneum 7,7% dans l'épiderme viable 2,8% dans le compartiment récepteur
Chilcott <i>et al.</i> , 2001	<i>In vitro</i> Peau humaine abdominale	20 µL d'ypérite	150 mg de TAF après 2 min d'exposition	2,54 cm ² (=59 mg de TAF/cm ² de peau)	Flux = 245 ± 154 µg/cm ² /h	Flux = 20 ± 8 µg/cm ² /h
Bjarnason <i>et al.</i> , 2008	<i>In vivo</i> Porc (semi-occlusif)	2, 3 ou 5 fois la DL ₅₀ du VX	1 g de TAF 45 min après exposition	0,25 cm ² (=4000 mg de TAF/cm ²)	2*DL ₅₀ : mort après 204 min 3*DL ₅₀ : mort après 202 min 5*DL ₅₀ : mort après 123 min	100% de survie mais symptômes tels que myosis et détresse respiratoire

Mircioiu *et al.* (2013) ont étudié l'efficacité de décontamination de deux poudres absorbantes : la TAF (ou bentonite) et le trisilicate de magnésium. L'étude se fait *in vitro* en cellule de Franz sur membrane synthétique. Les membranes sont exposées au dichlorvos ou chlorpyrifos 2 min avant le processus de décontamination par les poudres adsorbantes qui ne sont pas éliminées de la peau. La bentonite permet de réduire significativement la quantité de dichlorvos dans le compartiment récepteur (15% de dichlorvos absorbée vs 27% pour une peau non décontaminée). Dans le cas du magnésium trisilicate, celui-ci augmente la quantité de chlorpyrifos absorbée par la membrane synthétique. Cet effet est dépendant de la lipophilie du toxique : plus le toxique est hydrophobe et plus la décontamination par les poudres est efficace.

Des tests *in vivo* ont été menés sur souris exposées à l'ypérite (Vücemilovic *et al.*, 2008) ou au sarin (Vücemilovic *et al.*, 2009). La peau a été décontaminée une minute après l'exposition à l'agent toxique avec 2 g de poudre minérale cationique (MCC). Les DL₅₀ de l'ypérite et du sarin ont été augmentées de 8 et 3 fois respectivement avec la MCC.

4.2.2.2. Les tissus absorbants

Les tissus seuls peuvent permettre, dans un premier temps, d'absorber le toxique présent sur la peau. Ils doivent être le plus absorbant possible pour permettre une décontamination plus efficace. Ils peuvent être utilisés avec une poudre absorbante/actif ou seuls. Josse *et al.* (2013) a étudié l'influence de la nature du papier absorbant sur l'efficacité de décontamination. La peau de porc est exposée *in vitro* à du VX, la décontamination est effectuée 15 min après contamination en déposant et tapotant la surface de la peau avec soit : un mouchoir en papier (A), du papier absorbant non tissé (B), une serviette en coton (C), un absorbant multi-usage TL100 (D), un T-shirt standard (80% polyamide, 20% élastane) (E) ou un tissu en coton contenant de la TAF (F).

La serviette en coton et l'absorbant multi-usage permettent de réduire significativement la quantité de VX dans tous les compartiments. Par rapport au contrôle, ils permettent de réduire de 10% la fraction de VX absorbée, de 5% la fraction absorbée dans la peau et de 40-45% la fraction de VX dans le CR. Le papier absorbant, le mouchoir et le T-shirt sont moins efficaces (Figure 22). Le système le plus efficace est le tissu en coton contenant la TAF grâce à la grande surface spécifique permettant l'adsorption du VX.

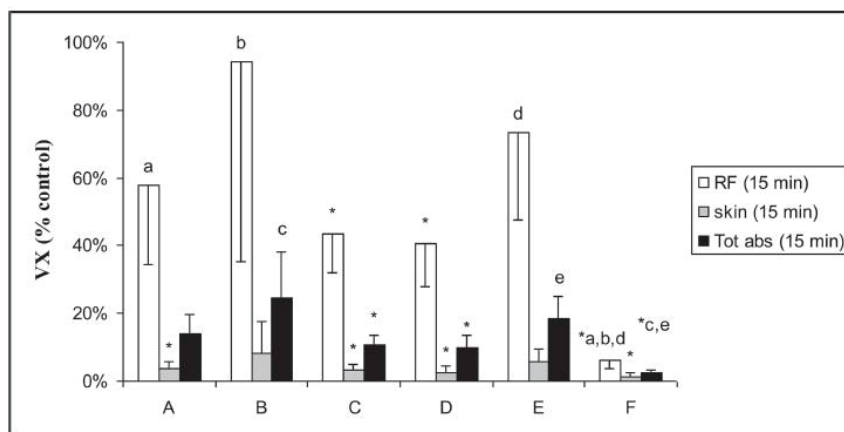


Figure 22 : Pourcentage de VX retrouvé dans le compartiment récepteur (« RF »), dans la peau (« skin ») et la quantité totale absorbée (« Tot abs ») après 6h d'exposition (5 mg/cm²). La décontamination a été effectuée 15 min après exposition. Les lettres et symboles indiquent une différence significative avec le contrôle et entre les différents absorbants (Josse *et al.*, 2013)

Certains absorbants ont plus d'affinité pour les substances hydrophobes ou les substances hydrophiles (Chilcott *et al.*, 2001) (Figure 23). La laine de coton a aussi bien de l'affinité pour les substances hydrophobes qu'hydrophiles. En revanche, l'éponge domestique n'a d'affinité pour aucune substance.

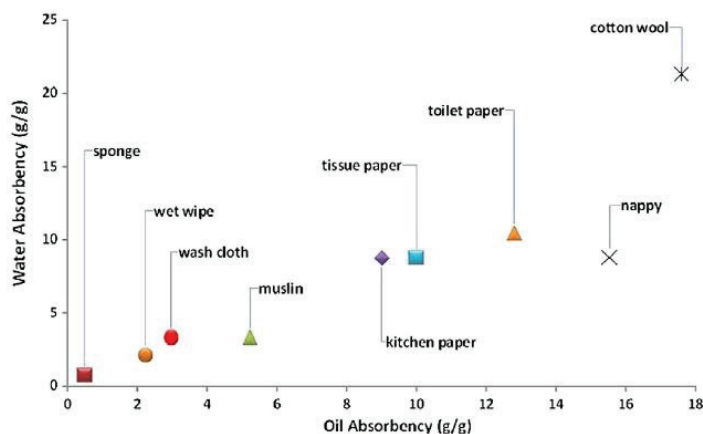


Figure 23 : Capacité d'absorption (gramme d'eau ou d'huile absorbée par gramme de support testé) (Chilcott *et al.*, 2001).

Taysse *et al.* (2007) ont démontré que le tapotement avec une éponge augmentait la surface de l'érythème d'une peau de porc exposée 5 min *in vivo* à 8 µL d'ypérite.

Le frottement/massage de la peau avec un tissu ou une éponge peut altérer la barrière de la peau et promouvoir le passage des COP à travers la peau (Moody & Maibach, 2006). Ainsi, il est recommandé de tapoter la surface de la peau avec l'absorbant pour éviter cet effet.

4.2.3. La dégradation/neutralisation des agents chimiques par un actif

Certains dispositifs permettent la dégradation en plus de l'absorption des agents toxiques. La dégradation du toxique en molécule peu ou pas toxique permet de diminuer la toxicité de l'agent chimique aussi bien sur la victime que dans l'environnement. Lors d'une intoxication par voie percutanée, la peau saine d'une victime entièrement déshabillée peut être décontaminée par une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 8 g de chlore actif par litre (correspondant à une dilution à 1/10^{ème} d'une solution d'eau de javel commerciale) (Ramirez-Martinez *et al.*, 1992). La javel est un produit alcalin. L'hydrolyse des produits chimiques est possible en milieu alcalin (voir chapitre 3). L'ion hydroxyle produit une attaque nucléophile au niveau de l'atome de phosphore produisant l'hydrolyse des OP et du VX. Utilisées depuis 1917, des solutions d'hypochlorites permettent une dégradation chimique efficace des agents chimiques de guerre. Cependant, cette solution est irritante et n'est pas adaptée pour une utilisation sur de nombreux endroits de l'anatomie tels que les yeux ou la peau lésée (Gold *et al.*, 1994).

Le kit M291 est un kit de décontamination développé aux Etats Unis et utilisé par l'armée en cas d'exposition aux armes chimiques. Ce kit à usage unique comporte six packs individuels suffisants pour une décontamination cutanée complète (Figure 24). Chaque paquet contient :

- une lingette en coton permettant de préserver l'intégrité des doigts,
- du charbon actif adsorbant les matières organiques telles que les NOP et l'ypérite,
- une résine réactive (Ambergard XE-555) (Hurst, 1997) qui capture et détoxifie très lentement.

Le kit permet ainsi l'adsorption du toxique présent à la surface de la peau, empêchant leur pénétration à travers le *stratum corneum*, et la dégradation chimique de l'agent.



Figure 24 : photos du kit M291

L'efficacité du kit M291 a été testée sur des modèles animaux. Clarkson *et al.* (2012) expose des cochons d'Inde une minute au soman et VX. La DL₅₀ du soman passe de 11,6 mg/kg pour une peau non décontaminée à 76,9 mg/kg pour une peau décontaminée avec le kit M291. La DL₅₀ du VX passe quant à elle de 0,13 à 0,14 mg/kg.

Dans l'étude *in vitro* de Chilcott *et al.* (2001) sur des peaux abdominales humaines, l'Ambergard a été testé en décontamination de l'ypérite. 150 mg de la résine ont été appliquées sur la peau 2 min après exposition. La comparaison a été effectuée avec la TAF et des granulés absorbants multi-usages « BDH ». L'efficacité d'adsorption des particules suit l'ordre suivant : TAF (91% d'ypérite absorbé par la peau en moins par rapport au contrôle non décontaminé) > Ambergard (35%)> granules BDH (9%).

La RSDL (Reactive Skin Decontamination Lotion) est le système de décontamination le plus connu (Figure 25). Le dispositif est composé d'une éponge en polyuréthane imbibée d'une lotion composée de :

- 10% d'eau,
- 60-100% de methoxypoly(ethylene glycol) (MPEG 550 Daltons), il confère des propriétés hydrophobes au produit et permet de déplacer, retenir et enlever les toxiques hydrophobes de la peau
- 10-30 % de Dekon 139 (10-30%) qui neutralise rapidement l'agent chimique
- 0.58% de 2,3-butanedione monoxime (DAM) qui permet de réactiver l'AchE.



Figure 25 : photos du kit RSDL

Des études ont montré l'efficacité de décontamination de la RSDL (tableau 12).

Tableau 12 : Récapitulatif des études menées sur l'évaluation de l'efficacité de décontamination du RSDL

Référence	<i>In vitro/in vivo</i> Modèle	Agent toxique et dose	Décontamination	Surface exposée	Résultats sur la peau non décontaminée	Résultats sur la peau décontaminée par la TAF
Taysse <i>et al.</i> , 2007	<i>In vivo</i> porc	8 µL d'ypérite	5 min après exposition, tapotement avec une éponge	25 cm ²	Augmentation de l'érythème	Diminution significative de l'érythème (même par rapport à une éponge seule)
		1,5 mg/kg de VX				
Josse <i>et al.</i> , 2015	cheveux	10 µL de VX	Application de 20 g RSDL 30 min après exposition, douche 60 min après	10 g de cheveux	27% de VX reste sur les cheveux avec la douche	9% de VX reste sur les cheveux
Rolland <i>et al.</i> , 2013	<i>In vitro</i> Peau d'oreille de porc	5,7 µL de VX	0,5 mL de lotion, 45 min après exposition, frottement avec l'éponge du kit RSDL	9,42 cm ² (=53µL de RSDL / cm ² de peau)	10,8% de VX à surface de la peau 2,5% dans le <i>stratum corneum</i> 46,6% dans l'épiderme viable 11,3% dans le RF	0,2% de VX à surface de la peau 0,05% dans le <i>stratum corneum</i> 2,3% dans l'épiderme viable 0,8% dans le RF
Bjarnason <i>et al.</i> , 2008	<i>In vivo</i> Porc (semi-occlusif)	2, 3 ou 5 fois la DL ₅₀ du VX	Eponge contenant 10,5 mL de RSDL 30 ou 45 min après exposition, frottement pendant 10 s	0,25 cm ² (=42mL de RSDL / cm ² de peau)	2*DL ₅₀ : mort après 204 min 3*DL ₅₀ : mort après 202 min 5*DL ₅₀ : mort après 123 min	100% de survie Myosis pour la décontamination à 30 et 45 min
Sawyer <i>et al.</i> , 2011	<i>In vivo</i> Porc	5 fois la DL ₅₀ du VX	éponge RSDL, 30 min après exposition, frottement pendant 10 s	0,25 cm ²	- 90% de l'activité de l'AchE après 45 min	-60% de l'activité de l'AchE après 45 min
Hamilton <i>et al.</i> , 2004	<i>In vivo</i> Oreille de porc	150 mg/kg de VX	éponge RSDL, 15 min après exposition, frottement pendant 30 s	0,25 cm ²	- 90% de l'activité de l'AchE après 45 min	-45% de l'activité de l'AchE après 45 min

L'inconvénient lié à RSDL est qu'il laisse un résidu huileux sur la peau inconfortable. D'autre part, si RSDL laisse un résidu, Dekon 139 doit certainement rester à la surface de la peau et exercer son effet dans le temps de l'exposition. Le DAM possède potentiellement une toxicité (Jager & Stagg, 1958).

Les oximes telles que l'obidoxime, le TMB-4, l'HI-6 ou le Pralidoxime (Figure 26) principalement utilisées pour réactiver l'acétylcholinestérase, peuvent également dégrader les OP. En effet, les ions oximates sont des « supernucléophiles » de par leur groupement C=NOH et peuvent dégrader les COP.

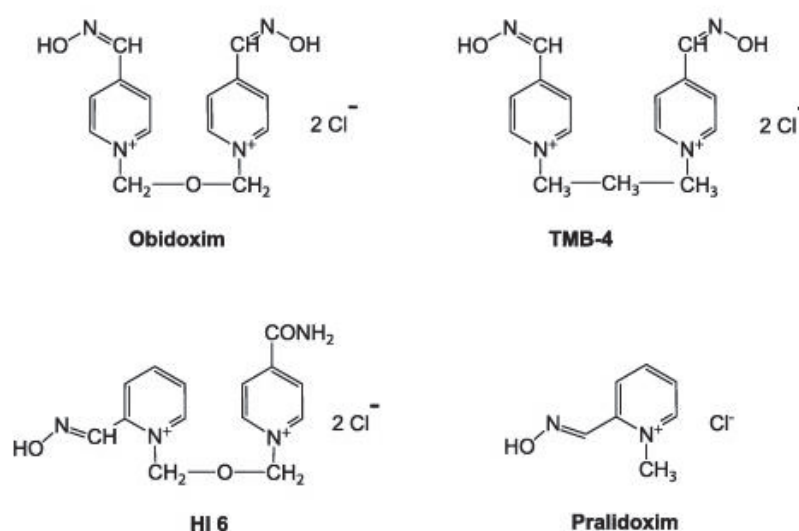


Figure 26 : structure chimiques de différentes oximes

Les enzymes telles que phosphotriestérases ou les hydrolases d'organophosphorés (OPases) sont capables de dégrader certains COP. Ces enzymes doivent avoir un large spectre d'action et une sélectivité pour les formes toxiques. Les inconvénients majeurs de ce type d'actif sont la difficulté de mise en œuvre, le coût, la fragilité de leur structure (ils doivent pouvoir être conservés un certain temps sans perdre leur activité). Leur incorporation dans des formules est délicate puisqu'une agitation mécanique trop puissante peut altérer leur structure.

Les estérases de type A, telles que la paraoxonase ou le diisopropylfluorophosphatases (DFPase), catalysent l'hydrolyse des COP par une rupture des liaisons P-F et P-O (Figure 27), tandis que les estérases B, telles que l'AChE ou la ButylCholinestérase (BuChE), forment des liaisons covalentes avec les COP et annulent leur toxicité (Jokanovic, 2011) (Figure 27).

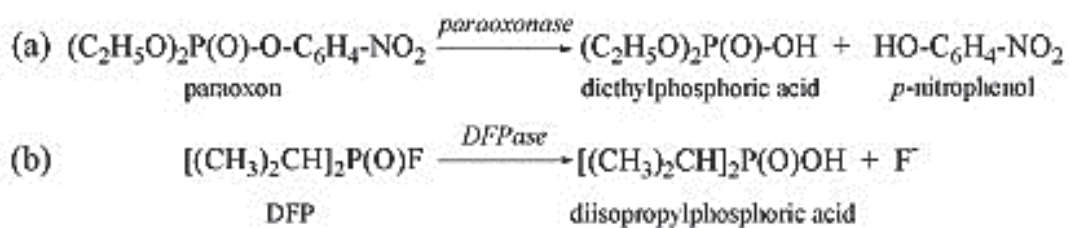


Figure 27 : (a) Hydrolyse du paraoxon par l'aryldialkylphosphatase (paraoxonase), (b) hydrolyse du diisopropylfluorophosphate (DFP) par la DFPase (Jokanovic, 2011)

Stehle *et al.* (2013) a incorporé la DFPase dans une microémulsion. L'activité de l'enzyme est maintenue (95% de sarin dégradé en 50 min) mais celle-ci est fortement dépendante de l'huile utilisée pour la formulation de la microémulsion. L'activité est plus importante en utilisant du biodiesel qu'en utilisant du Lanol 99 (ou isononanoate d'isononyle (C₁₆), une huile d'origine synthétique).

Biglet *et al.* (2013) développe une phosphotriestérase mutée au niveau de la boucle 7 de l'enzyme (zone responsable de la liaison au substrat) dans le but de pouvoir interagir aussi bien avec le VX qu'avec le Paraoxon. Cette mutation permet d'augmenter de 78 fois le taux d'hydrolyse du DEVX (analogue du VX) et de 152 fois le turn-over (nombre de conversion par seconde pour un seul site catalytique) comparé à la phosphotriestérase non mutée.

Kalakuntla *et al.* (2013) développe une enzyme dite « artificielle ». Il s'agit d'une β -cyclodextrine, agissant tel un catalyseur chimique. Les groupements hydroxyles ont été méthylés (ce qui évite les liaisons faibles avec le substrat) et les groupements réactifs ont été repositionnés (permettant l'attaque nucléophile du phosphate). L'activité résiduelle de l'AChE en présence de l'enzyme et de cyclosarin, soman, tabun ou de VX a été mesurée. Sauf dans le cas du VX, le catalyseur chimique permet d'augmenter sa réactivité avec les COP.

Une mousse de polyuréthane liée de manière covalente avec des enzymes telles que les cholinestérases peut être un bon dispositif de décontamination. Ces éponges ont été combinées avec des oximes (ré activateur d'acétylcholinestérase) HI-6 afin de restaurer l'activité catalytique du complexe COP-AChE inhibée avant que le vieillissement irréversible du complexe COP-AChE ait lieu. Cette éponge peut être conservée 5 ans et peut être réutilisée de nombreuses fois en rinçant l'éponge avec du HI-6. Des études sur cochon d'inde ont montré que l'éponge permet d'éliminer les COP de la surface de la peau mais permet aussi leur dégradation complète (Gordon & Clarkson, 2009).

Les NPs d'oxydes métalliques permettent aussi l'adsorption et la dégradation des OP. Elles seront plus particulièrement décrites dans la partie 3.

4.3. Les facteurs influençant l'efficacité de décontamination

Les facteurs qui peuvent influencer l'efficacité de décontamination sont (Chan *et al.*, 2012):

- les propriétés physico-chimiques du décontaminant,
- la durée entre l'exposition à l'agent toxique et la décontamination,
- le protocole de décontamination.

4.3.1. Les propriétés physico-chimiques du décontaminant

Nous avons vu dans la partie I que les NOP ont des propriétés hydrophobes ou hydrophiles. Le décontaminant qui permettra la solubilisation de l'agent toxique pourra l'éliminer plus efficacement de la surface de la peau (meilleur « lavage »). Un décontaminant aqueux permettra d'éliminer les neurotoxiques hydrophiles, un décontaminant huileux permettra l'élimination des toxiques hydrophobes. Ce principe a été illustré dans Wester *et al.* (1999) *in vivo* sur des singes exposés à 2 μ L d'un irritant cutané (MDI ou méthylène diphénylisocyanate marqué au 14 C). La peau est nettoyée 5 fois à différents temps (5 min, 1, 4 ou 8 h) avec un coton imbibé soit : d'eau, d'eau et 5% de savon, d'eau et 50% de savon, de polypropylène glycol (550 Daltons), d'un nettoyant à base de polyglycol ou d'huile de maïs. Directement après le lavage, le MDI est dosé dans un stripping (adhésif apposé sur la peau permettant de retirer la première couche cellulaire) (Figure 28).

Washing methods	Percent dose recovered [Mean (\pm SD)]			
	5 min	1 h	4 h	8 h
Water	60.0 (11.1)	56.7 (10.1)	40.2 (8.9)	29.2 (9.7)
5% Soap	71.2 (5.2)	51.1 (14.1)	46.1 (8.2)	36.6 (12.8)
50% Soap	67.3 (9.6)	68.6 (16.0)	54.4 (5.2)	45.7 (6.6)
Polypropylene glycol	88.9 (13.5)	86.0 (14.1)	78.9 (16.4)	71.6 (19.7)
PG-C	85.3 (9.5)	67.7 (24.6)	73.7 (3.0)	77.9 (20.6)
Corn oil	95.1 (9.0)	77.2 (24.2)	73.2 (17.4)	86.2 (10.0)

Figure 28 : Pourcentage de ^{14}C -MDI récupéré dans le stripping après lavage de la peau (Wester *et al.*, 1999). Les tirets rouges permettent de séparer les nettoyants hydrophobes et les nettoyants hydrophiles.

Le pourcentage de ^{14}C -MDI récupéré est le plus élevé pour l'huile de maïs (>73,2%). Le nettoyant qui retire le moins efficacement le MDI est l'eau (>29,2%). Le MDI étant hydrophobe, il a été retiré de manière plus efficace par le propylène glycol, le nettoyant à base de polyglycol ou l'huile de maïs par rapport aux autres solutions.

L'importance de la polarité du produit de décontamination a été démontrée avec Hui *et al.* (2012). Leur étude a aussi démontré que l'huile de maïs et un nettoyant à base de polyglycol sont plus efficaces que l'eau ou une solution de savon dans l'eau en limitant le transfert dans la peau de 3,5-dichloro-2,4,6-trifluoropyridine, un composé très lipophile.

4.3.2. La durée entre l'exposition à l'agent toxique et la décontamination

Les effets dus à la contamination par un OP sont rapides et il existe deux types de décontamination:

- la décontamination d'urgence (moins de 5 min après la contamination) par un primo-intervenant militaire ou civil pré-équipé,
- la décontamination approfondie des intervenants et des victimes (environ 45 min après la contamination).

Plus la durée entre l'exposition au toxique et la décontamination est grande, plus le toxique va être absorbé par la peau et plus la décontamination sera difficile et peu bénéfique pour la victime.

Rolland *et al.* (2013) ont mesuré le taux de pénétration du VX à travers une peau d'oreille de porc à 5, 15, 45 min, 2 et 24 h après exposition (Figure 29). Le dosage du VX a été effectué dans différents compartiments : à la surface de la peau, dans le *stratum corneum*, dans l'épiderme viable et dans le CR.

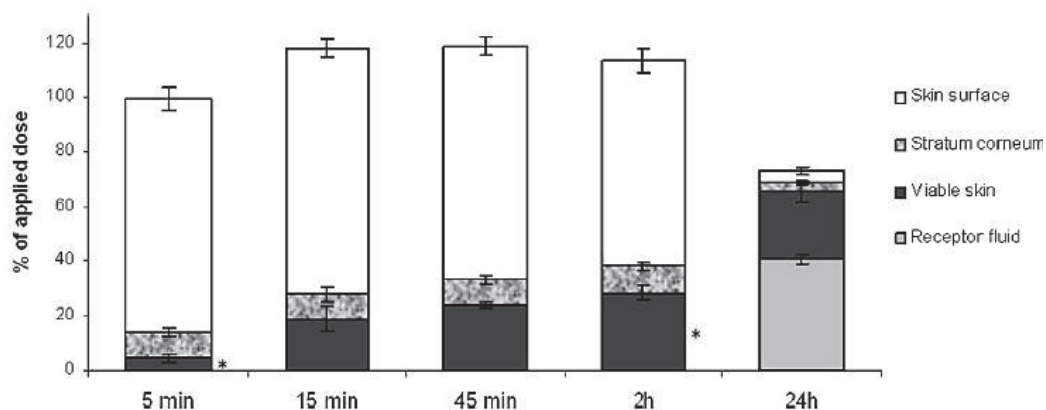


Figure 29 : Pourcentage de VX à la surface de la peau, dans le *stratum corneum*, dans l'épiderme viable et dans le compartiment récepteur après 5, 15, 45 min, 2 ou 4 h d'exposition au VX (5 mg/cm²) *in vitro* sur peau d'oreille de porc (Rolland *et al.*, 2013).

Près de 75 % de la quantité appliquée de VX reste encore à la surface de la peau 2 h après une exposition au VX, le *stratum corneum* permettant de stocker le toxique dans la peau. Cette durée est bien supérieure à la durée nécessaire pour la décontamination approfondie. Cette étude démontre que la peau doit être décontaminée même après 1h d'exposition au VX.

Si on reprend l'étude de Wester *et al.* (1999) et la Figure 28, le tableau montre le pourcentage de dose de ¹⁴C-MDI récupéré après 5 min, 1 h, 4 h et 8 h. La quantité de MDI dosée est réduite significativement (de moitié) si le lavage par l'eau est effectuée 5 min après exposition ou 8 h après : l'eau permet de laver 60,2% du MDI après 5 min d'exposition ; ce lavage passe à 56,7% après 1h ; 40,2% après 4 h et seulement 29,2% après 8h. Pour l'huile de maïs, cette diminution est moins importante : 95% de MDI sont lavés après 5 min d'exposition ; 86,2% après 8h.

4.3.3. Le protocole de décontamination

Le temps de frottement/massage de la peau par le décontaminant influence l'efficacité de décontamination (Boeniger, 2005, Merrick *et al.*, 1982). Merrick *et al.*, (1982) étudie l'influence de ce temps de décontamination (30, 60, 90, 120, 150 s) sur des mains exposées au ^{99}Tc , ^{123}I et ^{51}Cr . Quatre décontaminants sont utilisés : de l'eau savonnée, un détergent liquide (Radiacwash), un détergent mousse (Count-Off) et un produit dermabrasif (« Dome Acne Skin Cleanser »). Dans tous les cas, l'efficacité de décontamination est plus importante quand le temps de lavage augmente (tableau 13).

Tableau 13 : Pourcentage résiduel de ^{99}Tc (a), ^{123}I (b) et ^{51}Cr (c) après la décontamination (Merrick *et al.*, 1982) (Chan *et al.*, 2012)

a

Washing solutions	Washing time (seconds) (mean \pm SD)				
	30	60	90	120	150
Dermabrasive cleanser	4.8 \pm 2.2	1.7 \pm 0.9	1.1 \pm 0.6		
Detergent foam	11.0 \pm 4.8	8.0 \pm 3.26	6.7 \pm 2.7	5.4 \pm 1.7	4.7 \pm 1.7
Liquid detergent	13.5 \pm 4.7	5.8 \pm 3.0	3.4 \pm 2.3	3.1 \pm 1.6	2.4 \pm 1.4
Soap and water	6.8 \pm 2.6	2.7 \pm 1.6	1.7 \pm 1.4		

b

Washing solutions	Washing time (seconds) (mean \pm SD)			
	30	60	90	120
Dermabrasive cleanser	2.1 \pm 1.2	1.0 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1
Detergent foam	2.7 \pm 1.8	1.3 \pm 0.7	0.5 \pm 0.5	0.7 \pm 0.5
Liquid detergent	7.2 \pm 5.1	3.8 \pm 2.7	2.87 \pm 2.0	2.4 \pm 1.8
Soap and water	21.7 \pm 12.6	17.0 \pm 11.9	14.0 \pm 9.2	12.1 \pm 8.4

c

Washing solutions	Washing time (minutes)			
	1	2	3	4
Dermabrasive cleanser	9.4 \pm 4.3	5.9 \pm 2.7	4.6 \pm 2.0	4.0 \pm 1.7
Detergent foam	10.4 \pm 10.1	7.0 \pm 3.1	5.6 \pm 2.6	4.8 \pm 2.2
Liquid detergent	19.6 \pm 10.1	12.9 \pm 7.0	10.4 \pm 5.9	8.5 \pm 4.9
Soap and water	21.7 \pm 12.6	17.0 \pm 11.9	14.0 \pm 9.2	12.1 \pm 8.4

Chapitre 3 : Les nanoparticules d'oxydes métalliques et la dégradation des agents toxiques

1. Présentation de la structure du dioxyde de cérium

Un nanomatériau (NP) est définie comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules (ce seuil peut être abaissé à 1% dans des cas spécifiques), dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». Cette définition des nanomatériaux a été publiée par la Commission Européenne le 18 octobre 2011 dans le cadre d'une recommandation (Recommandation n°2011/696/UE du 18/10/2011). Le texte de la Commission prévoyait une révision de la définition d'ici décembre 2014, mais la procédure est toujours en cours. Les oxydes métalliques sont des matériaux composés d'anions oxyde et de cations métalliques.

Le dioxyde de cérium (CeO_2), ou cérine fait partie des NPs d'oxydes métalliques. Il est utilisé sous forme cristallisée. Avant de décrire les procédés de synthèse et sa structure cristalline, l'organisation et la description d'un cristal seront développées.

1.1. Définition d'un cristal et structure

Un cristal est constitué par la répétition périodique, dans les différentes directions de l'espace, d'un même motif chimique, le motif élémentaire (Millot & Nièpce, 2014) (Figure 30):

- le motif élémentaire (ou maille élémentaire) est le plus petit ensemble d'atomes qui, répété uniquement par des translations dans les 3 directions, suffit à engendrer tout le cristal.
- le réseau cristallin est défini par un ensemble de points régulièrement disposés, les nœuds.

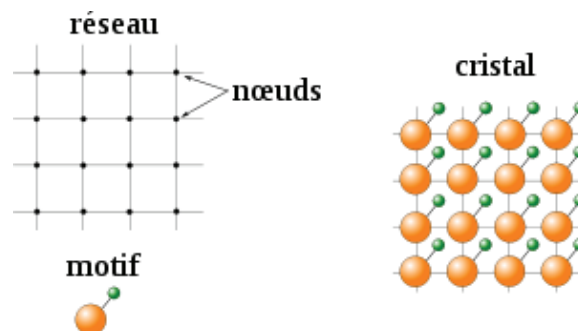


Figure 30 : représentation d'un motif élémentaire et des nœuds dans un cristal

La maille est le parallélépipède construit selon trois vecteurs de base \vec{a} , \vec{b} et \vec{c} . Ces vecteurs sont également appelés paramètres de maille. Les angles entre ces arêtes sont définis par α (\vec{b} , \vec{c}), β (\vec{c} , \vec{a}), γ (\vec{a} , \vec{b}) (Figure 31).

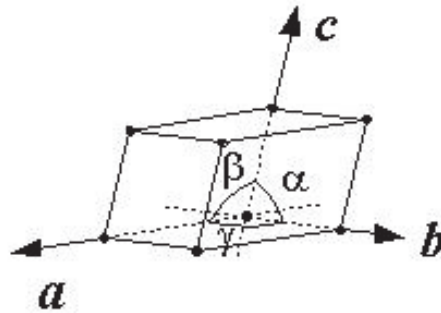


Figure 31 : représentation d'une maille selon les vecteurs de base et les angles entre ces vecteurs

En fonction de la valeur des paramètres de maille et des angles :

- 7 géométries de mailles sont possibles et conduisent aux sept systèmes cristallins (tableau 14, Figure 32),
- 14 réseaux cristallins, nommés réseaux de Bravais, existent (Figure 32).

Tableau 14 : Caractéristiques géométriques des sept systèmes cristallins (Millot & Nièpce, 2014)

Système	Angles	Paramètres de maille
triclinique	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$	$a \neq b \neq c$
Monoclinique	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	$a \neq b \neq c$
Orthorhombique	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a \neq b \neq c$
Tétraгонаl	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a = b \neq c$
Trigonal	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	$a = b = c$
Hexagonal	$\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	$a = b \neq c$
Cubique	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a = b = c$

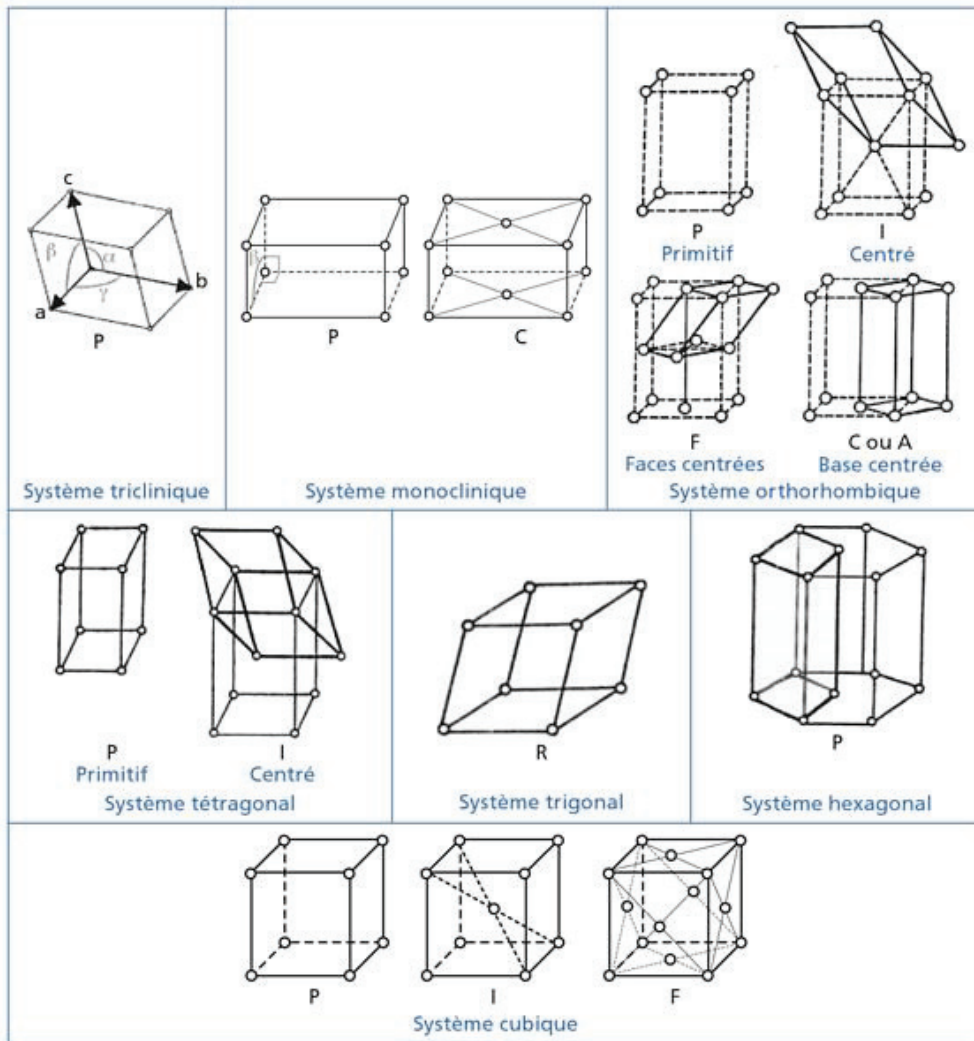
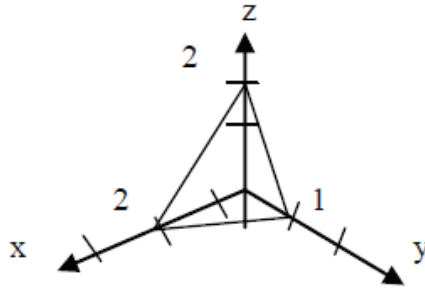


Figure 32 : les 7 systèmes cristallins et les 14 réseaux de Bravais (Millot & Nièpce, 2014)

Trois nœuds non situés sur une même rangée définissent un plan cristallin (ou plan réticulaire). Tous les autres nœuds du réseau peuvent être disposés parallèlement au précédent. En raison de la périodicité du réseau cristallin, dans une direction donnée, tous les plans parallèles sont équidistants. Cet ensemble de plans cristallins parallèles est appelé famille de plans cristallins (ou réticulaires).

Les indices de Miller (h k l) permettent de définir le plan réticulaire. Les indices h, k et l sont trois nombres entiers, positifs, négatifs ou nuls (Dupeux, 2004).

Les indices h, k et l sont calculés selon l'exemple suivant:



L'intersection du plan cristallin sur les axes x, y et z est 2, 1 et 2 respectivement.

On prend les inverses de ces intersections et on convertit en valeur unitaire donnant ainsi le plan (hkl) de (121).

Les fiches ICDD (International Centre for Diffraction Data) permettent de déterminer la nature du cristal en fonction des angles, des distances inter réticulaires et des plans cristallins.

1.2. La structure du CeO₂

Le CeO₂ a une structure cubique de type fluorine (CaF₂) lorsqu'il est cristallisé (Mogensen *et al.*, 2000). Cette structure est constituée de quatre motifs CeO₂, chaque cation de cérium Ce⁴⁺ est entouré de huit anions d'oxygène O²⁻ selon un arrangement cubique à faces centrées, et chaque anion de l'oxygène est entouré de quatre cations de cérium selon un arrangement tétraédrique (Figure 33). La distance entre deux atomes d'oxygène est de 270,5 Å, ce qui est la moitié du paramètre de maille a (541 Å). La cérine présente deux degrés d'oxydation : +III et +IV. Par conséquent, deux oxydes peuvent être formés : le CeO₂ (Ce IV) et le Ce₂O₃ (Ce III). Les ions O²⁻ sont mobiles à l'intérieur de sa structure. Le départ d'ions O²⁻ se traduit par la formation de lacunes ou de sites vacants, et d'une réduction partielle du cérium de valence +IV en valence +III.

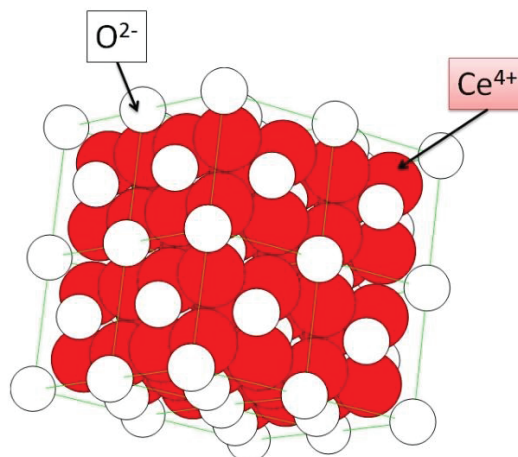


Figure 33 : structure 3D du CeO₂

La cérine pure, présente une couleur jaune pâle, due au transfert de charge entre le Ce (IV) et l'O (-II). En revanche, la cérine avec un grand nombre de lacune d'oxygène (apparition d'ion Ce^{3+}) prend une couleur bleue et devient noire.

La Diffraction aux Rayons X (DRX) permet de déterminer les plans cristallins. L'octaèdre CeO_2 est composé majoritairement de facettes (001) et (111) (Tan *et al.*, 2011). Dans le cas d'octaèdre tronqué, les faces (100) viennent tronquer les faces (111) (Figure 34) (Wang & Feng, 2003).

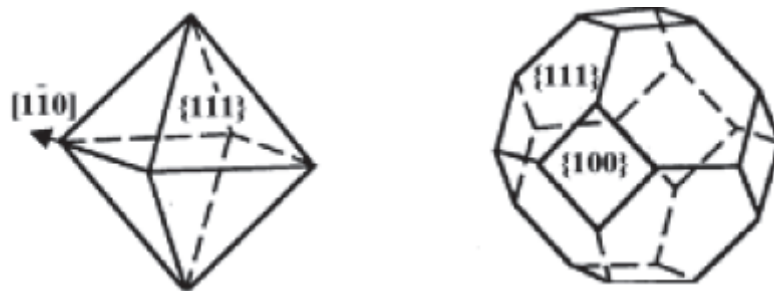


Figure 34 : structure de l'octaèdre et de l'octaèdre tronqué du CeO_2 (Wang & Feng, 2003).

2. Voies de synthèse des nanoparticules de CeO_2

Les principales méthodes pour la synthèse du CeO_2 sont:

- la précipitation : procédé rapide qui consiste à ajouter dans la solution un agent rendant le produit insoluble ou en modifiant le pH,
- la méthode « sol-gel » qui implique trois états de matières : la solution (dispersion d'un précurseur organométallique ou d'un sel dans un solvant organique type méthanol ou éthanol), les colloïdes (formés grâce à une série de réactions d'hydrolyse et de polymérisation inorganique) et le solide (formé suite au processus de vieillissement et après calcination).
- la microémulsion : un tensioactif (molécule amphiphile) est dissout dans un solvant organique pour former des agrégats sphériques appelés micelles inverses. Ces micelles jouent le rôle de microréacteurs en dispersant un milieu réactionnel polaire au sein d'une phase apolaire.

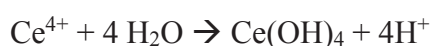
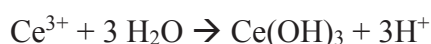
Une étape de cristallisation (passage de l'état amorphe à l'état cristallin) peut compléter la synthèse du CeO_2 . La cristallisation est possible par apport d'énergie : chauffage sur de longues

durées, synthèse hydrothermales*, calcination haute température ou même sonication pendant la synthèse (Bisio *et al.*, 2016). Néanmoins, le traitement thermique peut mener à l'agglomération des NPs (Djuriclic & Pickering, 1999; Tok *et al.*, 2007).

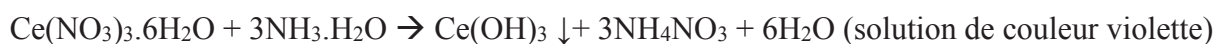
*Le terme « **hydrothermale** » est utilisé pour caractériser les technologies pour lesquelles une réaction chimique a lieu dans des conditions de pression supérieure à 1 atm et de température supérieure à la température ambiante, quel que soit le solvant utilisé (aqueux ou non) (Byrappa & Yoshimura, 2001).

2.1. La précipitation

Le principe de cette méthode d'élaboration repose sur la formation d'une phase solide au sein d'une solution liquide. La synthèse des NPs de CeO₂ est souvent effectuée selon le même protocole (Renuka, 2012 ; Chen & Chang, 2004 ; Wang & Feng, 2003 ; Chang & Chen, 2005). Le nitrate de cérium (Ce(NO₃)₃.6H₂O, 0,01-0,5 mol/L) est dissous dans l'eau distillée. Une solution ammonium dilué (1-15 mol/L) y est ajoutée goutte par goutte et permet la précipitation d'hydroxyde de cérium. L'urée (NH₂)₂CO peut aussi être utilisée pour la précipitation des sels de cérium, en présence d'eau, l'urée est transformée en NH⁴⁺ (Danek *et al.*, 2007). Sachant que les ions Ce³⁺ ou Ce⁴⁺ venant du précurseur (Ce(NO₃)₃.6H₂O) peuvent donner lieu à :



Les réactions suivantes ont lieu (He *et al.*, 2012):

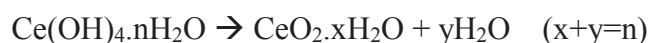


Les ions Ce³⁺ sont oxydés en Ce⁴⁺ grâce à l'oxygène de l'air et la solution devient jaune pâle :



Le précipité Ce(OH)₄ ou Ce(OH)₃ est lavé à l'eau déminéralisée pour éliminer toutes les espèces hydrosolubles et à l'éthanol pour éliminer l'eau et rompre les liaisons hydrogènes entre l'eau et

le précurseur. Ces liaisons peuvent conduire à l'agrégation du CeO_2 pendant le chauffage (Renuka, 2012). Le traitement thermique permet de fournir l'énergie nécessaire pour la déshydratation et la conversion complète du $\text{Ce}(\text{OH})_4$ en CeO_2 :



De nombreux paramètres expérimentaux peuvent influencer la morphologie et la taille des particules comme: le solvant de réaction, la concentration en sels métalliques, le pH, la température, etc. Chang & Chen (2005) synthétisent du CeO_2 à partir de 0,5M de nitrate de cérium (III) et 3M d'ammonium. Le temps (de 0,5 min à 20 h) et la température de réaction (de 0 à 90°C) varient. Les auteurs obtiennent des NPs de formes et de tailles très variées. Par exemple, si la précipitation est effectuée à 90°C, pour une courte durée de réaction (5 min), le CeO_2 est sous forme de bâtonnet (10-15 nm de largeur sur 200 nm de longueur). En augmentant ce temps de réaction à 10 min, les images en Microscopie électronique à Transmission (MET) montrent de petites particules sphériques de 3–5 nm de diamètre qui adhèrent aux bâtonnets. A 60 min de réaction, les NPs sont toutes sphériques et font 23 nm de diamètre (Figure 35). En changeant de précurseur et en utilisant du nitrate de cerium (IV), le CeO_2 n'adopte pas de forme en bâtonnets quelque soient la température et le temps de réaction. La nature du précurseur de cérium (nitrate de cérium (III) ou (IV) donnant les ions Ce^{3+} ou Ce^{4+} respectivement), détermine l'intermédiaire de la première étape de précipitation, à savoir, $\text{Ce}(\text{OH})_3$ ou $\text{Ce}(\text{OH})_4$, et influence la morphologie des NPs.

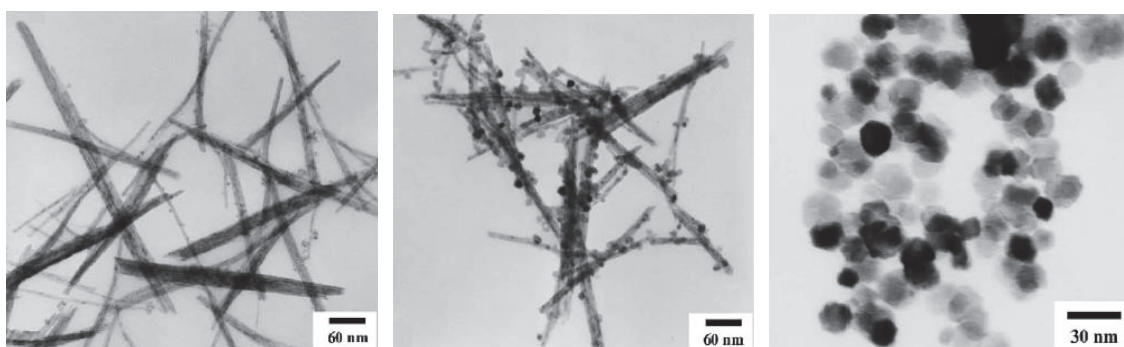


Figure 35 : images en MET de nanoparticules de CeO_2 à différents temps de réaction : 5 min (gauche), 10 min (milieu) et 60 min (droite). La précipitation est effectuée à 90°C (Chang et Chen, 2005).

2.2. La méthode sol-gel

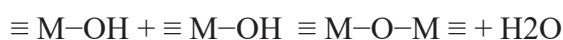
Le procédé «sol-gel» permet de transformer des précurseurs métalliques en oxydes métalliques en condition douce c'est-à-dire à température ambiante (Corriu & Anh Nguyễn). Il consiste à élaborer un solide à partir du passage d'une solution appelée « sol » à un état solide appelé « gel ».

L'état « sol » initial est défini comme étant une dispersion d'espèces (de type $Ce(OR)_n$ où R est un radical organique, souvent une chaîne alkyle ; comme l'oxalate ou l'acétate de cérium) dans un solvant. La transition sol-gel peut être assimilée à une polymérisation inorganique que l'on décompose en plusieurs réactions chimiques. Premièrement, les précurseurs réagissent avec l'eau : c'est la phase d'initiation de la réaction ou réaction d'hydrolyse (Aelion *et al.*, 1950) : le groupe alcoxyde est remplacé par un groupe hydroxyle, et dans le cas où R est un alkyle, de l'alcool est formé.



Réaction d'hydrolyse

Deuxièmement, immédiatement après la phase d'initiation suit la phase de propagation, ou réaction de condensation. Deux types de condensation sont alors en compétition (Brinker & Scherer, 1990) : l'homocondensation où deux précurseurs hydrolysés $\equiv M-OH$ réagissent pour former une liaison métaloxane (M-O-M) et de l'eau, et l'hétéro-condensation où le précurseur hydrolysé réagit avec un précurseur de départ pour former une liaison métaloxane et de l'alcool (dans le cas où R est un alkyle).



Réaction d'homo-condensation (alcoxolation)



Réaction d'hétéro-condensation (oxolation)

Le sol passe alors progressivement à un état visqueux (« sol visqueux ») puis à un réseau solide avec la formation de chaînes métaloxanes -M-O-M-O-M- contenant le solvant dans sa maille (« gel »). Une hydrolyse lente et contrôlée conduit généralement à des tailles de particules plus petites. Cette étape du vieillissement du solide est appelé murissement d'Ostwald. L'élimination des solvants par séchage permet la formation d'une réseau de poudre ultrafine d'hydroxyde métallique. Le solide est amorphe, sa granulométrie et porosité dépendent des conditions expérimentales.

Le tableau 15 récapitule quelques articles où la synthèse de CeO₂ est effectuée par voie sol-gel. Les tailles des NPs obtenues sont indiquées. L'introduction d'acide citrique lors de la synthèse permet la formation du citrate de métal amorphe. La décomposition thermique de ces précurseurs conduit à des solutions solides homogènes (Alifanti *et al.*, 2003).

Tableau 15 : Synthèse des nanoparticules de CeO₂ par la voie sol-gel

Référence	composition initiale du sol qui devient un gel	ajout de réactif	séchage	Calcination	taille des nanoparticules (nm)
Daroudi <i>et al.</i> , 2014	amidon solubilisé dans l'eau à 60°C puis ajout de Ce(NO ₃) ₃ , formation d'un gel	ajout d'NH ₃ jusqu'à ce que le pH soit à 10	séchage du précipité lavé à l'acétone et à l'eau distillée à 80°C pendant 12h	400°C pendant 2 h	5,8
He <i>et al.</i> , 2012	PVP, Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O et tampon CO(NH ₂) ₂ dans l'eau, formation du gel	ajout d'NH ₃	séchage à température ambiante	X	plus de 10
Janos <i>et al.</i> , 2016	Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O et acide citrique à 40°C jusqu'à formation du gel	X	1 nuit à 80°C	500°C pendant 2 h	19,4

2.3. La synthèse par micro émulsion

Une microémulsion est définie comme « un système d'eau, d'huile et de tensioactif formant une solution fluide transparente optiquement isotrope et thermodynamiquement stable » (Danielsson & Lindman, 1981). Contrairement aux émulsions dont la taille des gouttelettes excède 500 nm, les microémulsions sont translucides car la taille des gouttelettes varie de 10 à 100 nm. Elle est composée de deux liquides non miscibles et d'un tensio-actif ou surfactant. Les surfactants sont dissous dans la phase lipophile et forment les micelles inverses (agrégat de molécules possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers l'intérieur et une chaîne hydrophobe dirigée vers la phase lipophile). Les solutions aqueuses de sels métalliques sont dispersées sous forme de gouttelettes et peuvent être solubles dans les micelles inverses. Ces gouttelettes aqueuses encapsulées avec des molécules tensioactives peuvent échanger leurs contenus de façon continue les uns aux autres quand ils entrent en collision (Masui *et al.*, 1997). Dans cette technique, le tensioactif introduit ne joue pas seulement le rôle de stabilisant, mais il est surtout employé pour son rôle d'agent de transfert d'une phase à une autre. Dans le cas où

deux microémulsions eau dans l'huile (on dissout les réactifs A dans une gouttelette et un réactif B dans d'autres) sont mélangées, une réaction peut avoir lieu lors des collisions des gouttelettes d'eau (Figure 36).

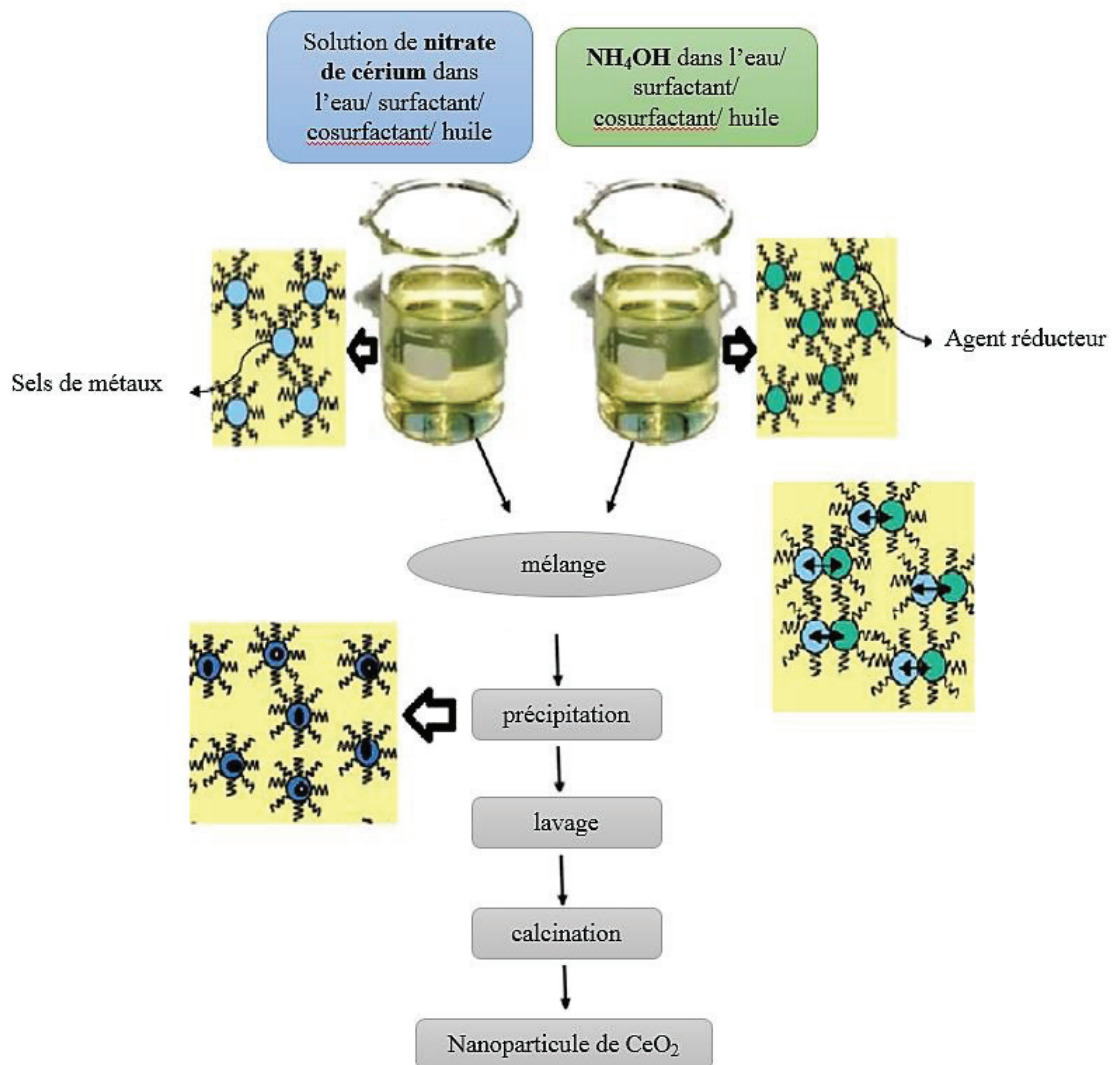


Figure 36 : Schéma de la formation de nanoparticule de cérium par la méthode microémulsion (adapté de Pournajaf *et al.*, 2014)

La croissance des particules peut être limitée par la gouttelette. Quand la surface des NPs en cours de croissance atteint le film de tensioactifs à l'interface huile/eau, l'hydratation des réactifs libres diminue en raison de la diminution de la quantité d'eau libre dans le milieu. Ceci favorise plutôt la formation d'un autre nucleus que la poursuite de la croissance des particules déjà formées (Niemann *et al.*, 2008). Cependant, même si ce processus favorise la nucléation et limite la croissance des particules, la formation de grosses particules peut quand même avoir

lieu. En effet ce processus peut ne pas être capable de stabiliser à lui seul la taille des particules finales parce qu'il dépend fortement de la flexibilité du film de surfactants. L'adsorption des molécules de surfactants à la surface des particules en cours de croissance peut aussi permettre de limiter la taille des particules finales (Bagwe & Khilar, 1997).

La taille et la forme des NPs dépendent principalement des proportions de la phase dispersée et du surfactant au sein de la phase continue. Masui *et al.* (1997) démontre qu'en changeant le ratio eau/surfactant, la taille des NPs est différente. En effet, si le rapport de ces concentrations est de 15 (la concentration en eau est 15 fois plus importante que la concentration en surfactant), la taille des NPs est de 4,1 nm. Dans les mêmes conditions de synthèse mais en faisant varier ce ratio à 1,5, la taille des NPs est de 2,7 nm. En effet, plus on diminue ce rapport, plus la concentration en surfactant augmente et plus la taille des gouttelettes d'eau sont petites. Celles-ci réduisent alors la taille des NPs.

Le tableau 16 récapitule les articles où la synthèse de CeO₂ est effectuée par la méthode microémulsion. Les tailles et surfaces spécifiques des NPs obtenues sont indiquées.

Tableau 16 : Synthèse des nanoparticules de CeO₂ par la méthode micro-émulsions

Référence	Composition des microémulsions					mélange A+ B	séchage/ calcination	propriété physico-chimique	
	phase aqueuse émulsion A	phase aqueuse micro- émulsion B	phase apolaire	surfactant	co- surfactant			taille nanoparticules	surface spécifique
Masui <i>et al.</i> , 1997	0,93-0,093 mol/L Ce(NO ₃) ₃ 6H ₂ O	15 mol/L NH ₄ OH	Cyclohexane	Polyoxy-ethylene octylphenyl ether	n-hexyl alcool	agitation puis lavage à l'alcool, eau distillée et acétone du précipité	lyophilisation	3,4 nm (0,093 mol/L de Ce(NO ₃) ₃ 6H ₂ O ou 4,1 (0,93 mol/L)	153-185 m ² /g
Pournajaf <i>et al.</i> , 2014	NH ₄ Ce(O ₃) ₆	NH ₄ OH	Cyclohexane	polyéthylène lauryl ether	n-butyl alcool	agitation 1h jusqu'à formation d'un précipité puis lavage à l'éthanol	80°C pendant 3h puis calcination de 300 à 700°C	de 5 nm (calcination à 300°C) à 35 nm (calcination à 700°C)	de 5 m ² /g (calcination à 300°C) à 65 m ² /g (calcination à 400°C)
Hadi & Yaacob 2007	Ce(NO ₃) ₃ 6H ₂ O	NaOH	n-octane	hexadecyl trimethyl ammonium bromide	butanol	agitation puis lavage du précipité à l'éthanol et à l'eau distillée	séchage à température ambiante et calcination de 100 à 800°C	de 5 nm (non calciné) à 50 nm (calciné à 800°C)	127 m ² /g (non calciné)
Tiseanu <i>et al.</i> , 2011	Cerium(III) 2-ethylhexanoate	X	hexane	Synperonic®	X	ajout d'ammonium pour augmenter le pH à 11h, lavage du précipité à l'éthanol	séchage à 70°C ou calcination à 500 ou 1000°C	X	de 252 m ² /g (non calciné mais séché) à 121 m ² /g (calciné à 1000°C)
Huang <i>et al.</i> , 2011	Ce(NO ₃) ₃ 6H ₂ O dans l'eau	X	n-octane	PVP	butanol	ajout de NH ₄ OH jusqu'à pH 5, 8 ou 11 pour la précipitation. lavage du précipité à l'alcool et eau distillée	80°C pendant 4h	5-10 nm si pH est de 5; 60-70 nm si le pH est de 8; 40-300 nm de largeur sur 7-10 µm de longueur si le pH est de 11	102 m ² /g si pH est de 5; 53 m ² /g si le pH est de 8; 48 m ² /g si le pH est de 11

2.4. La voie hydrothermale/solvothermale

Le but est de chauffer les réactifs en présence du solvant dans un récipient clos appelé autoclave. La synthèse hydrothermale (solvothermale) présente l'avantage de :

- permettre des réactions rapides grâce à l'augmentation de la mobilité des particules et donc d'abaisser les temps de synthèse,
- conduire à une faible dispersion en taille des particules,
- pouvoir cristalliser les particules,
- permettre une transposition à grande échelle facile.

Ce procédé permet d'obtenir une large gamme de tailles et morphologies telles que des particules cubiques (Mai *et al.*, 2005), octaédriques (Kaneko *et al.*, 2007 ; Tok *et al.*, 2007), bâtonnets (Pan *et al.*, 2008 ; Mai *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2007) ou des nanotubes de CeO₂ (Pan *et al.*, 2008 ; Mai *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2007). Mai *et al.* (2005) utilise la voie hydrothermale pour la synthèse de NPs de CeO₂. Du nitrate de cérium est mélangé à différentes concentrations de soude (0,01, 1, 3, 6 ou 9 mol/L) dans de l'eau distillée. La bouteille en téflon contenant le mélange est placée dans un autoclave scellé hermétiquement. L'autoclave est mis au four à 100, 140 ou 180 °C pendant 24h. En modifiant la température de synthèse et la concentration en NaOH, plusieurs tailles et formes de NPs sont observées : polyèdres, bâtonnets, cubes (tableau 17) (Figure 37).

Tableau 17 : Formes et tailles des échantillons de CeO₂ obtenus par voie hydrothermale (Mai *et al.*, 2005)

Concentration en NaOH (mol/L)	T (°C)	Forme	taille (nm)
0,01	100	Polyèdre	11,5
0,01	180	Polyèdre	9-25
1	100	polyèdre, bâtonnets	
3	100	polyèdre, bâtonnets	9.6 x (50-200)
6	100	Bâtonnets	
6	140	bâtonnets, cubes	36.1
6	180	Cubes	
9	100	Bâtonnets	13.3 x (100-400)

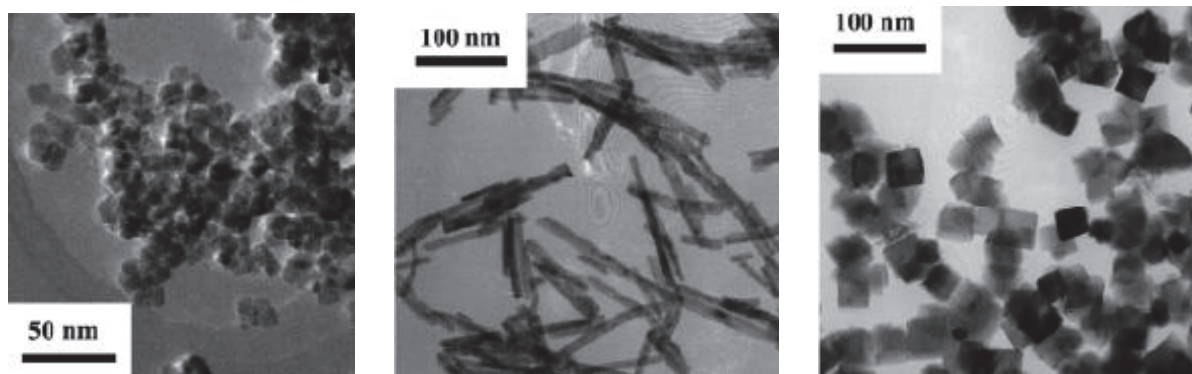


Figure 37: Images en MET de nanoparticules de CeO₂ obtenus après synthèse hydrothermale de forme polyédrique, bâtonnet et cubes (Mai *et al.*, 2005)

Pan *et al.* (2008) synthétise des nanofeuillets de CeO₂ par voie hydrothermale en mélangeant de l'hexadecyltriméthylammonium bromide (CTAB) à du nitrate de cérium à 100–160 °C. La taille des nanofeuillets obtenus est de 40 nm. La conversion de ces nanofeuillets en nanotubes puis en nanobâtonnets est possible en changeant le temps de réaction, la température et le ratio CTAB/Ce³⁺.

2.5. Influence du solvant de réaction

Lors de la méthode par précipitation, l'ajout d'un solvant avec une faible constante diélectrique dans la solution aqueuse peut jouer sur les cinétiques de réaction et la nucléation et donc sur la taille et forme des NPs. Le solvant doit présenter une constante diélectrique relativement élevée afin de dissoudre les sels métalliques. Le rayon de la particule est relié à la constance diélectrique du solvant (Chen & Chang, 2004). La plupart des alcools sont dipolaires, avec une constante diélectrique qui dépend de la longueur de la chaîne. Le tableau 18 montre les constantes diélectriques des alcools et de l'eau.

Tableau 18 : Constantes diélectriques des alcools et de l'eau (Hu *et al.*, 2000)

Alcool	Formule chimique	Constante diélectrique à 20°C
méthanol	CH ₃ OH	32,35
éthanol	CH ₃ CH ₂ OH	25,00
1-propanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	20,81
2-propanol	CH ₃ CH(OH)CH ₃	18,62
1-butanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	17,80
2-butanol	CH ₃ CH ₂ CH(OH)CH ₃	15,80
2-méthoxyéthanol	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ OH	16,80
Ethylène glycol	OHCH ₂ CH ₂ OH	40,60
eau	H ₂ O	78,40

La formation des particules est dépendante de la sursaturation du nitrate de cérium (rapport entre la concentration du nitrate de cérium et la concentration de saturation). Plus la sursaturation est élevée et plus la quantité de nucléi augmente. La sursaturation peut être modulée en diminuant la température, en évaporant le solvant, par changement de pH, en modifiant la composition du solvant (Manoli *et al.*, 2002). Chen & Chang (2004) a étudié l'influence de la nature du solvant lors de la précipitation sur la taille et structure de la cériine. Six alcools (méthanol, éthanol, n-propanol, isopropanol, tert-butanol et éthylène glycol), ont été mélangés un par un avec de l'eau. Les résultats montrent que si le solvant est de l'eau, la taille des particules de CeO₂ est d'environ 15 nm, tandis qu'elle se réduit à environ 7 nm dans un mélange éthanol/eau. Le mélange éthylène glycol/eau donne les tailles de NPs les plus petites (l'éthylène glycol ayant la constante électrique la plus élevée). Aussi, plus le pourcentage d'alcool augmente par rapport à l'eau, plus la taille des particules diminue et la surface spécifique augmente (Figure 38).

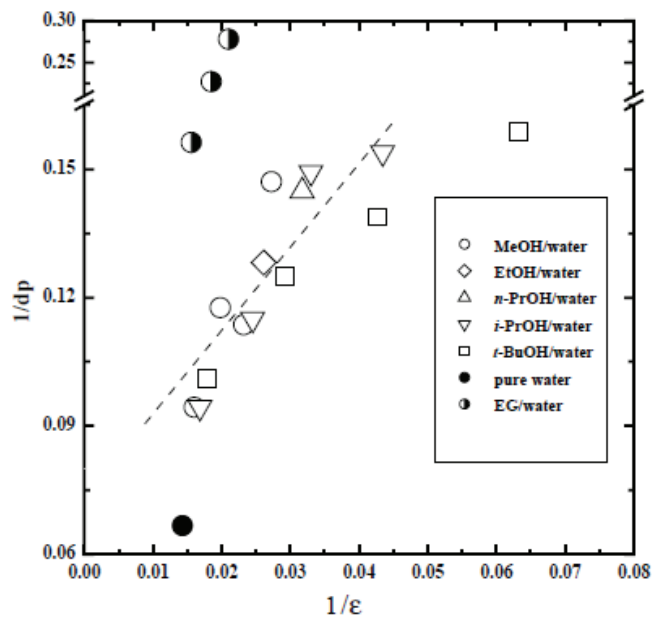


Figure 38 : Influence de la constante diélectrique (ϵ) sur le diamètre des particules (d_p) observé en MET (Chen & Chang, 2004).

3. Réactivité des nanoparticules

3.1. Propriété de surface

En raison de leur grande surface spécifique, de leurs sites très réactifs (catalyseurs*), des lacunes d'oxygènes, les oxydes métalliques possèdent des propriétés intéressantes pour la dégradation des COP (Sharma & Kakkar, 2013) (Figure 39).

Un **catalyseur** est une substance qui, en faible quantité, provoque de grandes transformations, sans apparaître lui-même dans les produits finaux : il ne subit pas de transformation durable. Les catalyseurs agissent en tant qu'activateurs de réactions, ils abaissent l'énergie d'activation nécessaire à la réaction (Nultsch, 1998).

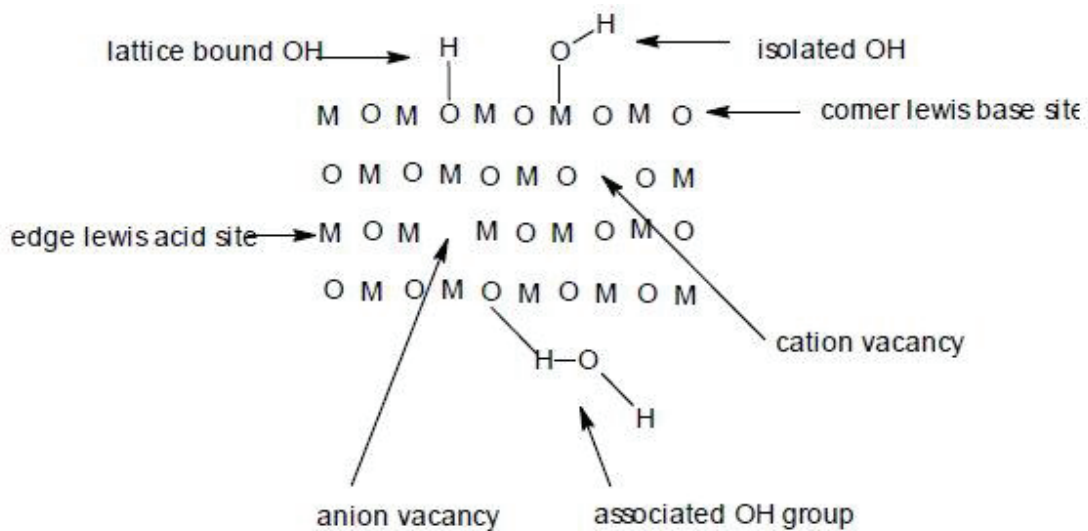


Figure 39 : sites réactifs à la surface des nanoparticules (Sharma & Kakkar, 2013)

L'oxyde de cérium possède des propriétés acido-basiques. Un acide de Lewis est une entité chimique dont un des atomes la constituant possède une lacune électronique tel que le Ce^{4+} , ce qui la rend susceptible d'accepter un doublet d'électrons (d'une base de Lewis comme O^{2-}), et donc de créer une liaison covalente avec une base de Lewis. Les réactions acide-base de Lewis peuvent avoir lieu entre le toxique et les NPs. Ces propriétés sont dépendantes des conditions et de la température du traitement thermique (Vivier & Duprez, 2010).

Les réactions acido-basiques peuvent aussi avoir lieu avec les sites acides/bases de Bronsted via les groupements hydroxyles en surface. La présence de groupes hydroxyles à la surface d'un oxyde métallique joue un rôle important dans les processus d'adsorption et

d'hydrolyse se produisant à sa surface. On peut distinguer trois types de groupes hydroxyles adsorbés à la surface :

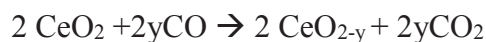
- l'eau libre, qui peut être éliminée autour de 100°C.
- l'eau physisorbée à la surface par des liaisons hydrogènes, qui peut être éliminée entre 100°C et 200°C.
- l'eau chimisorbée, qui est liée à la surface de la NP par des liaisons fortes, et qui peut être éliminée autour de 200°C.

La présence de ces groupements hydroxyles à la surface d'oxydes peut être déterminée par spectrométrie infrarouge. La concentration d'eau adsorbée à la surface est très variable et dépend fortement de la méthode de synthèse et du traitement thermique.

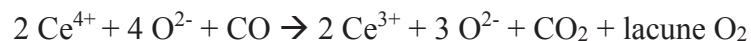
Les lacunes d'oxygène du CeO₂ peuvent être créées à des températures élevées (au-dessus de 350°C) sous vide ou dans un gaz inerte selon l'équation suivante :



Ou à des températures modérées en présence d'un réducteur (H₂, CO, hydrocarbures) (Trovarelli, 2013 ; Yao, 1984):



Comme déjà évoqué précédemment, la compensation principale des lacunes d'oxygène dans CeO_{2-y} se manifeste par création du Ce³⁺. Un oxygène sur quatre est impliqué dans la réduction du Ce⁴⁺ en Ce³⁺ :



Le CeO₂ est capable de stocker l'oxygène lorsque l'environnement est riche en oxygène et de le redonner lorsque l'environnement est pauvre en oxygène (Vivier & Duprez, 2010). Sa capacité à stocker l'oxygène (OSC) permet au catalyseur d'oxyder les agents toxiques quand la teneur en O₂ devient quasiment nulle.

3.2. Domaines d'application du CeO₂

3.2.1. Traitement des eaux usées

L'oxydation catalytique est un traitement catalytique hétérogène qui permet la destruction de certains composés toxiques et/ou polluants organiques contenant les groupements –CHO présents dans les eaux usées. Cette catalyse permet la minéralisation c.-à-d. la conversion totale en CO₂, des polluants (Hamoudi *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001). La destruction par oxydation des polluants se fait par mélange d'oxygène moléculaire, du catalyseur hétérogène et du

polluant. Chen *et al.* (2001) ont utilisé le CeO₂ comme catalyseur hétérogène de plusieurs polluants typiques des eaux usées, tels que : l'ammoniaque, l'acide acétique, la pyridine, le polyéthylène glycol (PEG). La sélectivité de minéralisation atteinte par ce système est de 95 %.

L'oxyde de soufre est l'un des composés polluants dans l'atmosphère. Il provient principalement de procédés industriels et de la combustion de carburants fossiles contenant du soufre. Le SO₂ est un gaz irritant qui agit en synergie avec d'autres polluants, notamment avec les particules. On lui attribue des symptômes comme la toux, la diminution de la capacité pulmonaire et l'aggravation des maladies pulmonaires et cardio-vasculaires. Le SO₂ intervient aussi dans la formation des pluies acides (Trovarelli *et al.*, 1999). Des recherches sont donc effectuées pour réduire l'oxyde de soufre en soufre élémentaire. La cérine serait un bon réducteur du SO₂ (Zhang *et al.*, 1995).

3.2.2. Absorption des UV

Le CeO₂ absorbe la lumière dans le proche UV et légèrement dans la région visible (Li *et al.*, 2002 ; Tsunekawa *et al.*, 2000). Par conséquent, la cérine est capable d'absorber les rayonnements UV du soleil et possède une activité photocatalytique inférieure à celle du ZnO et du TiO₂. Elle pourrait être utilisée en tant que filtre solaire en cosmétique (Herrling *et al.*, 2013) mais sa réactivité avec les matériaux organiques la rend non commercialisable telle quelle (Adachi *et al.*, 2004; Horita *et al.*, 1997). Elle est aussi utilisée pour les verres de lunettes de soleil mais également pour ses propriétés oxydoréductrices permettant de supprimer la coloration bleu-vert du verre (oxydation des ions Fe²⁺).

3.2.3. Application biomédicales

La cérine a démontré un rôle d'antioxydant et de protection des cellules. Toutes les cellules humaines produisent des radicaux libres lors des métabolismes impliqués dans la communication cellulaires. Les espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés sont appelés « dérivés réactifs de l'oxygène » (DRO). Les DRO peuvent être très réactifs et potentiellement très dangereux pour les cellules lorsqu'ils sont non éliminés par des antioxydants. Lorsque la production de DRO est excessive et la quantité d'antioxydant insuffisante, la cellule est en stress oxydatif ce qui peut causer ou contribuer à de nombreuses maladies (tumeurs, maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson, les

immunodéficiences) (Celardo *et al.*, 2011). Grâce à ses propriétés réductrices, la cérine peut induire une protection de la cellule en régénérant l'état d'oxydation initiale dans les cycles (Figure 40). Ainsi, l'effet antioxydant de la cérine jouerait un rôle dans la protection des cellules nerveuses (Das *et al.*, 2007) et cardiaques (Niu *et al.*, 2007) et lui conférerait des propriétés anti-inflammatoires (Hirst *et al.*, 2009).

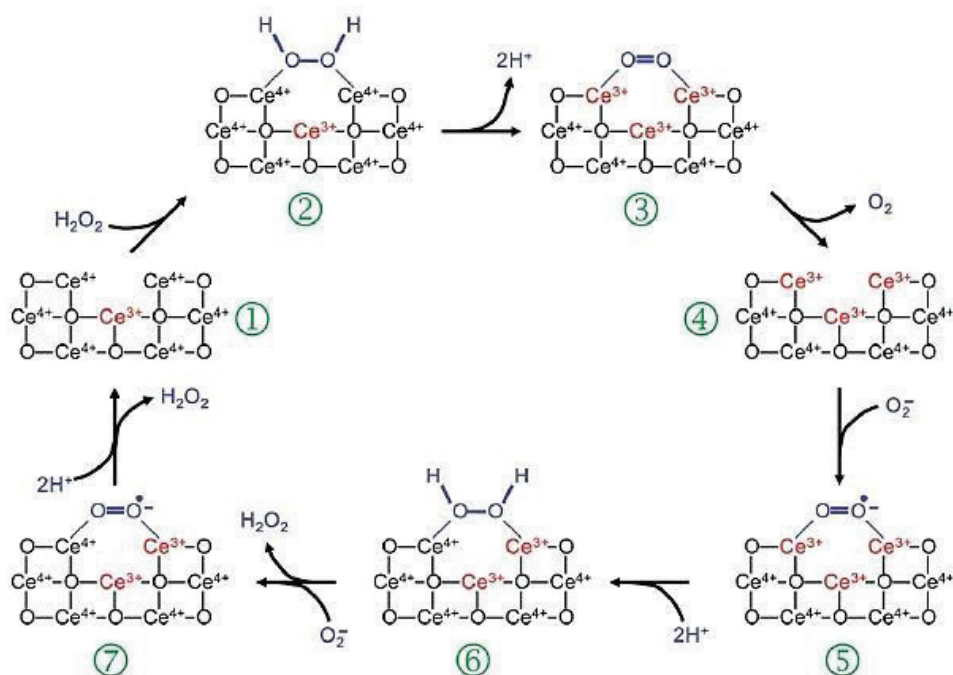


Figure 40 : Oxydation du peroxyde d'hydrogène par la cérine et la régénération par réduction de superoxyde (Celardo *et al.*, 2011)

3.2.4. La cytotoxicité du CeO₂

La cytotoxicité est la propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire (Lombard, 2014). En raison du grand nombre d'applications émergentes du CeO₂, le nombre de publications sur ses effets sur des cultures cellulaires augmente considérablement.

Les NPs sont très mobiles et peuvent diffuser rapidement dans l'environnement ou à l'intérieur du corps par l'eau ou l'air. Aucune corrélation directe ne peut être faite entre la cytotoxicité du CeO₂ et le type de lignée cellulaire testée ou la taille des NPs. Néanmoins, les résultats (positifs ou négatifs) observés semblent être fonction de l'état d'oxydation du cérium au sein des NPs (Celardo *et al.*, 2011).

Concernant les kératinocytes, il a été montré que les NPs pouvaient être internalisées dans le cytoplasme de cellules épithéliales par phagocytose (Pierscionek *et al.*, 2010) ou par diffusion. L'étude d'internalisation de la cérine dans les kératinocytes humaines a montré que les NPs pénétraient par endocytose et se distribuaient dans toute la cellule (Singh *et al.*, 2010). Thill *et al.* (2006) a étudié l'interaction du CeO₂ avec la bactérie Escherichia Coli. Le CeO₂ s'adsorbe à la surface de la membrane par interaction électrostatique ce qui peut altérer le fonctionnement des pompes ioniques, modifier les échanges cellulaires, imiter l'interaction ligand-récepteur et provoquer une cascade de signalisation cellulaire. En effet, lorsque le CeO₂ provoque la production de radicaux dérivés de l'oxygène, phénomène physiologique normalement très contrôlé, il induit un stress oxydatif et la cellule déclenche l'apoptose (mort cellulaire programmée).

Le tableau 19 récapitule les études de cytotoxicité de la cérine. Les NPs de CeO₂ ayant pour but d'être déposées sur la peau dans notre projet, la recherche bibliographique a été limitée à l'étude de sa cytotoxicité sur les kératinocytes.

Toutes les études ont la même conclusion : la cérine n'a pas d'effet cytotoxique sur les kératinocytes à des doses inférieures à 1 mg/mL. Les NPs de CeO₂ entrent à l'intérieur des cellules, ont leur rôle anti-oxydant, protègent les cellules même sous irradiation UV (Caputo *et al.*, 2005) et inhibent l'apoptose. Néanmoins, à des doses plus importantes (100 mg/mL), Horie *et al.* (2009) a démontré que les NPs absorbent les ions Ca²⁺ et les protéines contenues dans le milieu de culture et empêchent la croissance cellulaire.

Tableau 19 : Etude de la cytotoxicité des NPs de CeO₂ sur kératinocytes (DKM: Defined keratinocyte Medium, DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, RPMI : Roswell Park Memorial Institute)

Référence	Lignée cellulaire	Taille des NPs de CeO ₂ (nm)	Concentration en NPs	Milieu de culture	Temps d'incubation avec les cellules	Résultats
Singh <i>et al.</i> , 2010	HaCat	3-5	0,01 à 1 mg/mL	DKM contenant : 1 mL supplément de croissance, 10 mg/mL, streptomycine, 10 unités/mL pénicilline	3h	les NPs sont retrouvés dans les mitochondries, réticulum endoplasmique, noyau, cytoplasme. Effet antioxydant et protection des cellules
Horie <i>et al.</i> , 2009	HaCat	14	1 et 100 mg/mL	DMEM contenant : 10 % sérum de veau fœtal, 100 unités/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 250 ng/mL amphotéricine B RPMI contenant : 10 % sérum de veau fœtal, 1% glutamine, 1% pénicilline-streptomycine	24 h	1 mg/mL : 100% de viabilité cellulaire 100 mg/mL : 50% de viabilité à cause de la cérine qui se lie au calcium nécessaire pour la croissance cellulaire
Boutard, 2013	NCTC 2544	10	80 µg/mL	RPMI contenant : 10 % sérum de veau fœtal, 1% glutamine, 1% pénicilline-streptomycine	72 h	pas d'effet sur la croissance cellulaire, pas d'apoptose
Caputo <i>et al.</i> , 2015	HaCat	10	200 µg/mL	DMEM contenant : 10 % sérum de veau fœtal, 100 000 unités/mL pénicilline, 50 mg/mL streptomycine, 200 mM glutamine	24h avec exposition aux UV	protection contre les lésions de l'ADN dues aux UV, propriété anti-inflammatoire, inhibe la mutagenèse et de l'apoptose
Pesic <i>et al.</i> , 2015	HaCat	4	100 et 200 µmol/L (correspond à 17 et 34 µg/mL)	DMEM contenant : 10 % sérum de veau fœtal, 4g/L glucose, 5000 unités/mL pénicilline, 5 mg/mL streptomycine, 2 mM glutamine	72 h	pas de cytotoxicité du CeO ₂ , anti-oxydant
Chigurupati <i>et al.</i> , 2013	kératinocyte	3-5	500 nM, 1µM et 10 µM (correspond à 0,09 ; 0,17 et 1,7 µg/mL)	DMEM contenant : 20 % sérum de veau fœtal, 100 unités/mL pénicilline, 100 mg/mL, streptomycine,	72h	500 nm : pas de migration des cellules, pas de croissance cellulaire 1 et 10 µM : migration et prolifération cellulaire

4. Dégradation des composés organophosphorés par les nanoparticules d'oxydes métalliques

Les articles traitant de la dégradation des agents toxiques par les NPs d'oxydes métalliques sont nombreux. En revanche, la dégradation des agents toxiques par la cérine est seulement décrite dans les articles de Janos *et al.* (2014, 2016). La cérine est utilisée pour son action catalytique et pour la dégradation d'autres composés. L'étude des réactions de dégradation des COP et de l'ypérite sera donc étendue à toutes les NPs d'oxydes métalliques.

4.1. Les réactions mises en jeu

Yang *et al.* (1992) identifie deux réactions permettant la dégradation des agents toxiques : l'hydrolyse et l'oxydation. Ces deux réactions peuvent être accélérées par la présence d'un catalyseur tel que les NPs d'oxydes métalliques.

4.1.1. L'hydrolyse

L'hydrolyse implique l'interaction entre l'agent toxique et un groupement OH⁻. En absence de catalyseur, l'OH⁻ provient de l'eau. En présence des NPs, l'agent se lie à la surface des NPs par les sites acides de Lewis et les sites basiques (Sharma & Kakkar, 2013). Ces réactions sont lentes à pH neutre mais peuvent être accélérées à pH basique (Gomaa H.M. & Faust S.D., 1972). Les agents toxiques hydrophiles sont hydrolysés plus rapidement que les agents hydrophobes (Marrs *et al.*, 2007).

4.1.2. L'oxydation

Les agents toxiques peuvent subir des réactions d'oxydation. La réaction est provoquée par l'oxygène des NPs. Les réactions d'oxydation peuvent être illustrées par l'eau de javel utilisée en décontamination qui a un pouvoir oxydant (Marrs *et al.*, 2007).

4.1.3. Photocatalyse

La photocatalyse est l'activation d'une réaction chimique par des photons qui jouent le rôle d'un catalyseur. La photocatalyse repose sur l'absorption, par un photocatalyseur généralement

semi-conducteur (Sc), d'une radiation lumineuse d'énergie supérieure ou égale à l'énergie (E_g) de sa bande interdite (différence d'énergie entre la bande de valence (BV ou dernière bande totalement ou partiellement occupée par des électrons dans la théorie des bandes) et la bande de conduction (BC ou première bande non occupée par des électrons)). Cette absorption d'énergie entraîne le passage d'électrons de la bande de valence dans la bande de conduction créant des lacunes électroniques, communément appelées « trous » (ou « holes », h^+) dans la bande de valence (Guillard *et al.*, 2011). Les paires électrons-trous (e^-/h^+) ainsi générées donnent au solide ses propriétés oxydo-réductrices aux NPs.

4.2. La dégradation d'un agent vésicant : l'ypérite

Dans l'environnement, l'ypérite est hydrolysé en ion sulfonium, puis en hémimoutarde (HM) et thiodiglycol (TDG) (Munro *et al.*, 1999). Suffisamment dilué dans l'eau, le temps de demi réaction ou $t_{1/2}$ (la durée au bout de laquelle l'avancement x de la réaction est égale à la moitié sa valeur maximale de l'ypérite dilué dans l'eau est de 158 min à 0,6°C, 4-8 min à 25°C et 1,5 min à 40°C (Small, 1984 ; Munro *et al.*, 1999). Les produits de dégradation peuvent former des agrégats et se placer à l'interface entre l'ypérite et l'eau, ce qui explique la persistance de l'ypérite dans l'environnement.

En présence de NPs d'oxydes métalliques et en absence de solvant, Bandosz *et al.* (2012) et Wagner *et al.* (1999) observent aussi la production d'ion sulfonium, d'HM et de TDG par les NPs de $Zr(OH)_4$ ou MgO. La déchlorination (élimination des groupements HCl) de l'ypérite et des produits de dégradation cités précédemment conduisent au 1,4-oxathiane (Ox), divinyl sulfide (DVS), chloro ethyl vinyl sulfide (CEVS), hydroxy ethyl vinyl sulfide (HEVS).

Praveen Kumar *et al.* (2013) explique la production d'HM par l'interaction de l'ypérite avec les sites acide de Lewis, acide de Bronsted du CuO:ZnO et l'attaque nucléophile. Les groupements hydroxyles ou les molécules d'eau transforment l'HM en TDG. La production de DVS, CEVS et HEVS avec les NPs CuO:ZnO est due aux bases de Lewis produites lors de la calcination (Praveen Kumar *et al.*, 2013). Le schéma réactionnel est le suivant :

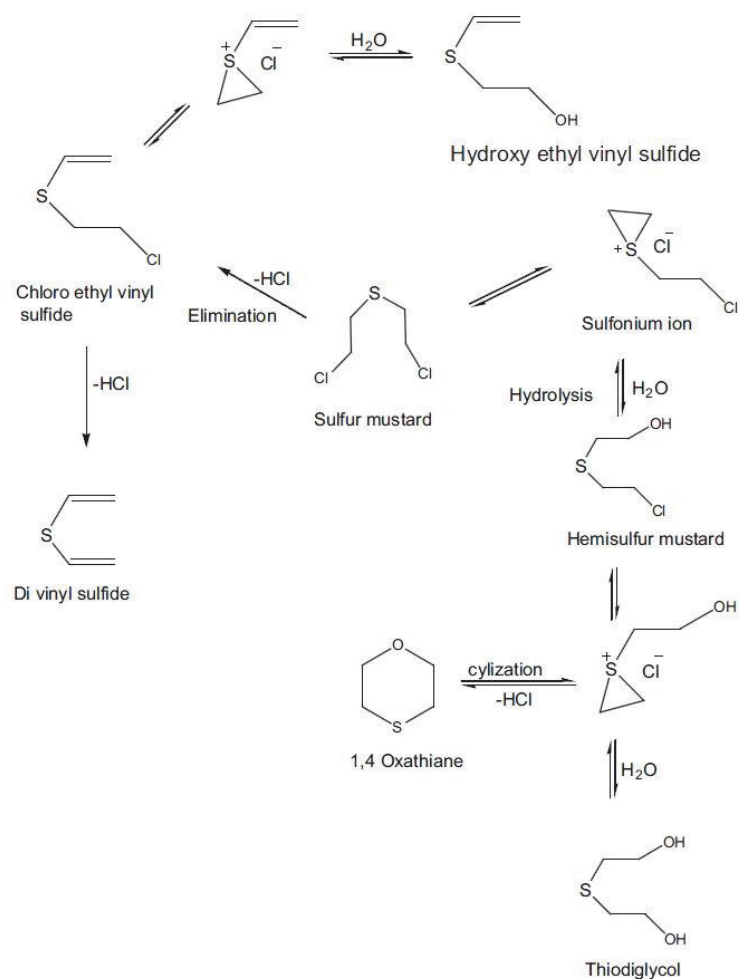


Figure 41 : Dégradation de l'ypérite par le CuO:ZnO (Praveen Kumar *et al.*, 2013)

Le tableau 20 résume les articles sur la dégradation de l'ypérite par des NPs.

Tableau 19 : Articles sur la dégradation de l'HD par les nanoparticules d'oxydes métalliques

Référence	NPs	Tailles (nm)	Surface spécifique (m ² /g)	Protocole de dégradation HD	Température de réaction (°C)	Efficacité de dégradation
Wagner <i>et al.</i> , 1999	MgO	4.2 (DRX)	344	5 µL d'HD + 100 mg NPs	Non indiquée (supposée ambiante)	t _{1/2} =17,8 min
Bandosz <i>et al.</i> , 2012	Zr(OH) ₄	5 (MET)	530	50 µL d'HD + 250 mg NPs	Non indiquée (supposée ambiante)	t _{1/2} = 2-3h
Praveen Kumar <i>et al.</i> , 2013	CuO-ZnO (1:1)	2-80 (MET)	84	5 µL d'HD dilué dans 100 µL de dichlorométhane + 500 mg NPs	30 ± 2	t _{1/2} = 3,4h

En condition sèche, c'est-à-dire quand l'ypérite n'est pas dilué dans un solvant (cas de Wagner *et al.*, 1999 et Bandosz *et al.*, 2012), l'absence d'eau rend la réaction plus lente et le $t_{1/2}$ plus élevé qu'en condition environnementale (eau en quantité suffisante). La diffusion est aussi un paramètre limitant dans ces conditions. L'ypérite est hydrophobe et diffuse difficilement dans les NPs hydrophobes tels que le $Zr(OH)_4$. Ceci mène à une dégradation moins efficace du $Zr(OH)_4$ (Bandosz *et al.*, 2012) comparé au MgO.

Les produits de dégradation par oxydation de l'ypérite sont plus retrouvés lors des expériences de photocatalyses. Ramacharyulu *et al.* (2014) observe la dégradation de 2 μ L d'ypérite dilué dans 100 μ L de dichlorométhane avec 100 mg de TiO_2 dopé Vanadium. Le dichlorométhane est laissé évaporer et le mélange est éclairé sous $95mW/cm^2$ (température $\approx 30^\circ C$). Ils observent la production en GC-MS du (2-chloroethyl) ethylsulfoxide (ou HD sulfoxide, oxydation de l'ypérite), lui-même oxydé en (2-chloroethyl) ethylsulfone (ou HD sulfone).

Le CEES, simulant de l'HD, est dégradé de la même manière par les NPs de ZrO_2 et mène à l'hydroxy ethyl ethyl sulfide (hydrolyse) et au vinyl ethyl sulfide (Figure 42) (déchlorination) (Verma *et al.*, 2016 ; Verma *et al.*, 2014). L'oxydation du CEES peut conduire également au (2-chloroethyl) ethylsulfoxide et (2-chloroethyl) ethylsulfone (Bisio *et al.* 2016).

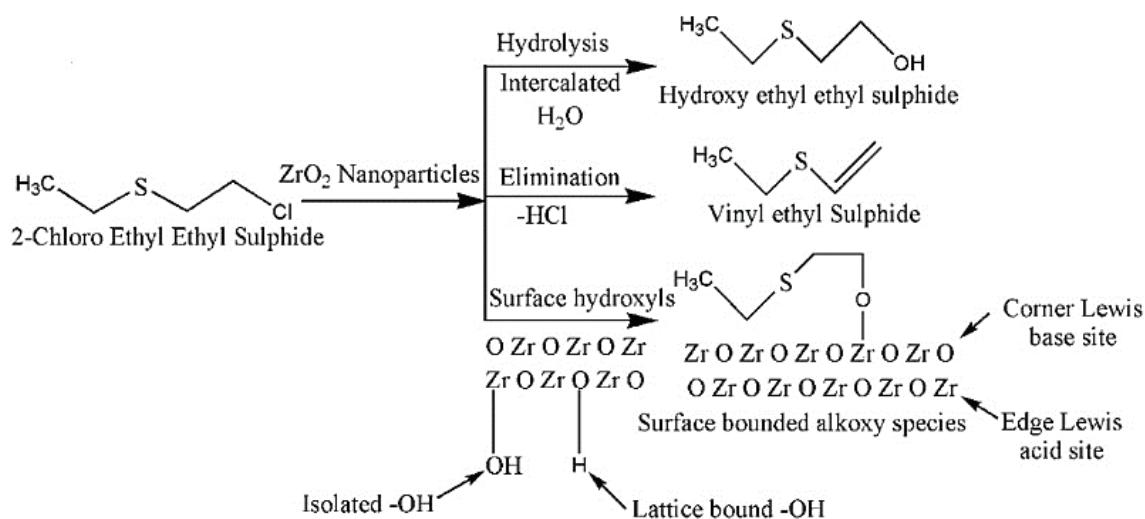


Figure 42: Réaction du CEES à la surface du ZrO_2 (Verma *et al.*, 2014)

4.3. La dégradation des neurotoxiques organophosphorés

Le VX est assez résistant à l'hydrolyse. L'hydrolyse est lente avec une demi-vie de 60 h (Yang, 1999). La dégradation du VX est sensible au pH et peut mener au produit toxique S-2-(diisopropylamino)ethylmethylphosphonothioate (EA-2192) dans des solutions aqueuses alcalines (Kim *et al.*, 2011). En effet, dans des conditions neutres ou faiblement basiques (pH entre 7 et 10), la réaction est catalysée intramoléculairement par le groupement amine du VX qui attaque soit le groupe S alkyl soit le groupe O-éthyle (Figure 43). Pour des pH inférieurs à 6 et supérieurs 10, le clivage de la liaison P-S est le procédé prédominant (Figure 43). Cette réaction mène à la formation de l'acide méthylphosphonique éthyle (EMPA) et au diisopropyl éthyl amine mercapto (DESH). Dans une solution aqueuse de 0,1 M de NaOH, une solution de 0,01 M VX a été hydrolysée en 87% d'EMPA et 13% d'EA-2192, la demi-vie étant de 31 min (Munro *et al.*, 1999). La formation de (EA-2192) est augmentée à 27% si la concentration en base augmente à 4 mol/L.

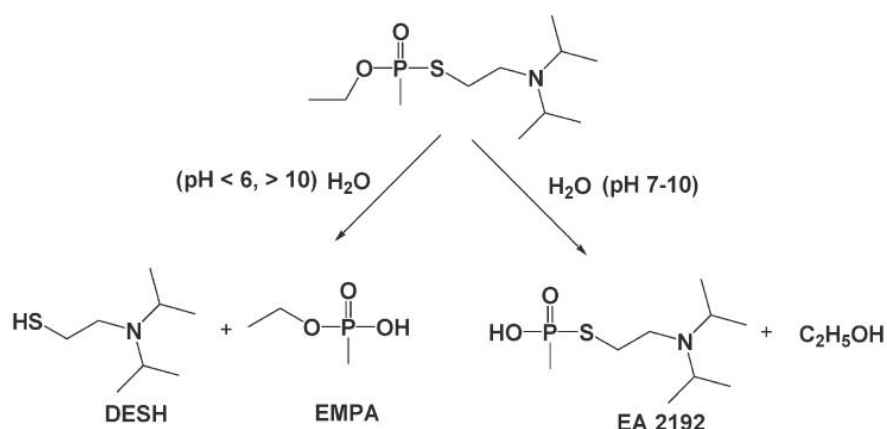


Figure 43 : voies de dégradation du VX en fonction du pH (Kim *et al.*, 2011, Munro *et al.*, 1999)

En présence de NPs et en absence de solvant, le VX est hydrolysé en acide ethyl methylphosphonic (EMPA), en diisopropyl éthyl amine mercapto (DESH) puis au methylphosphonate (MPA) par les groupements hydroxyles présents en surface et/ou par l'eau physisorbée (Wagner *et al.*, 1999 ; Bandosz *et al.*, 2012) (Figure 44).

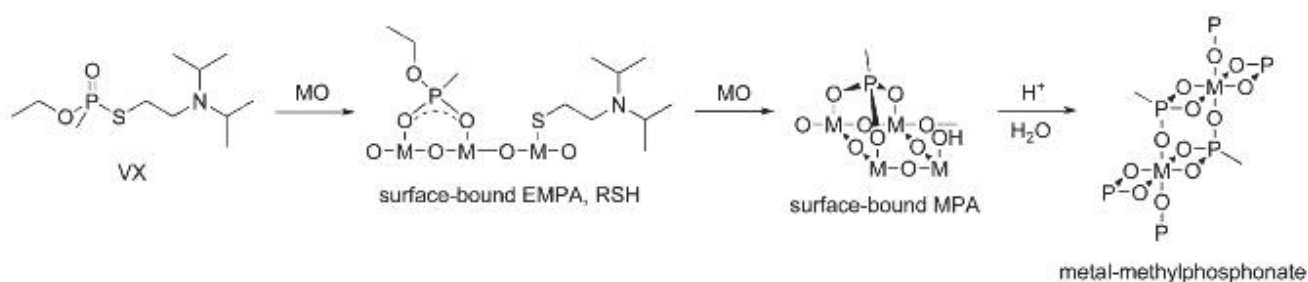


Figure 44 : Dégradation du VX par un oxyde de métal (MO) (Bandosz *et al.*, 2012)

La protonation du VX par l'oxyde métallique (possible si le point isoélectrique, c.-à-d. le pH pour lequel la charge globale de cette molécule est nulle, est inférieur au pKa du VX qui est de 8,6), facilite sa diffusion dans les pores et sa dégradation (Bandosz *et al.*, 2012). La catalyse de la réaction avec le VX à la surface d'un oxyde métallique est due aux groupements hydroxyles acide (protonation puis hydrolyse).

Janos *et al.* (2016) a synthétisé du CeO₂ selon différents modes opératoires. Les propriétés physico-chimiques sont résumées dans le tableau 21. Le VX est dilué dans le nonane et mélangé au CeO₂ (la dose résultante est 50 mg de CeO₂ pour 1 mg de VX).

Tableau 20: Dégradation du VX par le CeO₂ obtenu par plusieurs voies de synthèses puis calciné 2 à 500°C (Janos *et al.*, 2016)

Méthodes de synthèse	Surface spécifique (m ² /g)	Surface des micropores (m ² /g)	volume des pores (mL/g)	tailles des nanoparticules (nm)	Pourcentage de dégradation du VX
Ce-1 par hydrolyse homogène (Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O dans eau acidifiée chaude + urée), mélange à 90°C jusqu'à pH 7, précipitation, séchage 105°C	96,5	26	0,014	10,7	90% en 5 min
Ce-2 en mélangeant du cerium(III) nitrate et l'acide citrique à 60°C 4h. Séchage 80°C 1 nuit	19,4	0	0	19,4	± 50% en 128 min
Ce-3 en mélangeant du cerium(III) nitrate et de l'acide oxalique. Filtration, lavage du précipité. Séchage à 110°C	138	14,8	0,0052	5,6	80% en 10 min
Ce-4 en mélangeant du Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O et du NH ₄ HCO ₃ . Lavage du précipité. Séchage une nuit à 110°C	57,4	6,4	0,0023	9,8	90% en 20 min

Ce-2 est le moins efficace : le spectre Infra-rouge a révélé moins de groupements OH en surface et donc moins d'hydrolyse grâce à ces groupements. De plus, l'échantillon ne possède pas de structure microporeuse.

Les échantillons Ce-1, Ce-3 et Ce-4 ont de grande surface spécifique et sont les plus efficaces pour la dégradation du VX. La DRX et les spectres FTIR ont révélé que Ce-1 avait une structure cristalline plus ordonnée (moins amorphe) et plus de groupements OH à la surface expliquant son efficacité de dégradation supérieure par rapport aux autres échantillons.

La dégradation du soman et du sarin est similaire à l'hydrolyse du VX et mène à des produits intermédiaires non toxiques comme l'isopropyl methylphosphonic acid (IMPA) pour le sarin, l'acide pinacolyl methylphosphonic (PMPA) pour le soman. Tous deux conduisent à la formation de MPA par la suite (Figure 45).

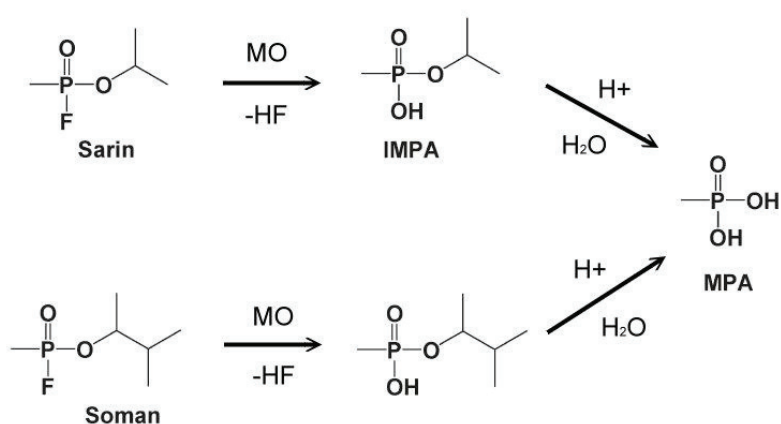


Figure 45 : Dégradation du sarin et du soman par un oxyde de métal (MO) (adapté de Kim *et al.*, 2011, Wagner *et al.*, 1999)

Lors d'une étude de dégradation en forme sèche (agent toxique mis en contact directement sur les poudres sèches), la tension de vapeur des agents toxiques est un facteur important (Wagner *et al.*, 1999). La tension de vapeur du GD étant plus faible, celui-ci diffuse plus facilement dans les pores des NPs: la dégradation est donc plus rapide que pour le VX et l'HD.

La dégradation du tabun par les oxydes métalliques est moins reportée dans la littérature. Les produits de dégradations seraient formés par hydrolyse du tabun. En milieu basique ou neutre, l'hydrolyse du tabun conduit rapidement à la formation de l'acide O ethyl N,N-dimethylamido phosphorique et au cyanide d'hydrogene. La seconde étape est plus lente et mène au dimethylphosphoramidate puis à l'acide phosphorique. En milieu acide, la dégradation du tabun produit de l'ethylphosphoryl cyanidate et du dimethylamine menant aussi l'acide phosphorique (Figure 46) (Munro *et al.*, 1999). Le tabun peut être lié aux NPs par des

liaisons covalentes entre le phosphate du tabun et l'oxygène des NPs ou entre l'atome d'azote ou de l'atome de Zinc d'une NP ZnO par exemple (Paukku *et al.*, 2009).

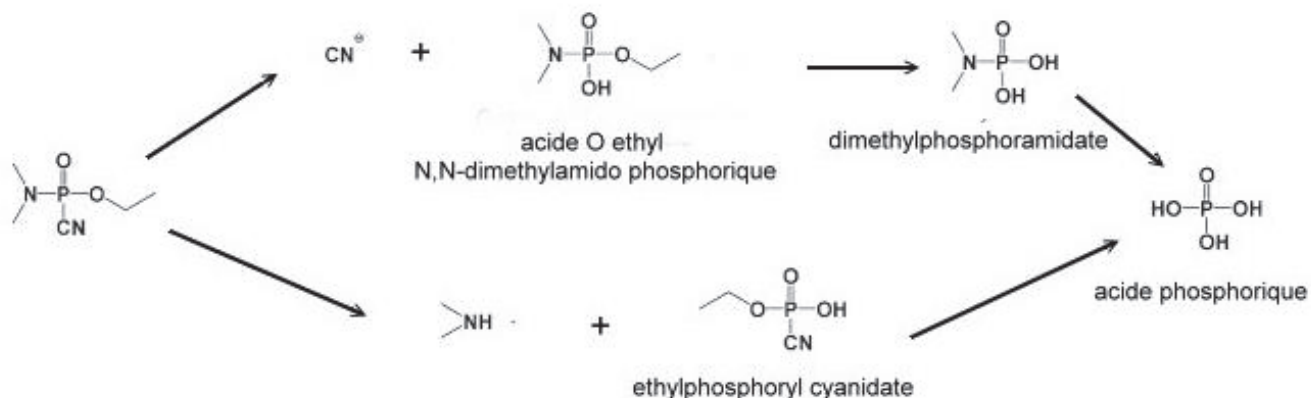


Figure 46 : dégradation du tabun par hydrolyse (adapté de Kim *et al.*, 2011 et Munro *et al.*, 1999)

4.4. La dégradation d'un pesticide organophosphoré : le Paraoxon

Dans la plupart des articles, le produit de dégradation du POX ou du parathion par des NPs d'oxydes métalliques est le p-nitrophénol (Janos *et al.*, 2014 ; Janos *et al.*, 2016, Henych *et al.*, 2015 ; Savio *et al.*, 2016). Une substitution nucléophile (SN2) par les groupements OH présents à la surface de la NP peut être responsable de la coupure de la liaison P-O-aryle dans la molécule de pesticide. Aucune interprétation n'est effectuée mais la dégradation des pesticides par SN2 est favorisée dans les solvants aprotiques (heptane), alors que les solvants protiques (polaires comme le méthanol) ne favorisent pas ce processus de dégradation (Janos *et al.*, 2014). Les NPs cationiques métalliques servent d'acide de Lewis qui peut interagir avec l'atome S (ou O) du pesticide (Henych *et al.*, 2015).

Le clivage de la liaison P-O-C a toujours lieu en premier. Certains articles discutent sur des réactions d'oxydo-réduction qui auraient lieu ensuite. Toute d'abord, le p-nitrophénol peut être dégradé en p-benzoquinone puis en hydroquinone par des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions sont surtout observées lorsque la dégradation du POX est étudié en présence de bactéries (possédant les enzymes responsable de ces réaction) (Kim *et al.*, 2011) ou sous irradiation UV (photocatalyse) (Savio *et al.*, 2016 ; Senthilnathan & Philips, 2010).

Lors de la photocatalyse, les radicaux OH formés par interaction de l'eau adsorbée sur les oxydes photo excités sont très électrophiles et dégradent plus efficacement le POX (Prasad *et al.*, 2012). L'oxydation de l'acide diéthyl phosphorique peut mener jusqu'à l'acide phosphorique (Figure 47).

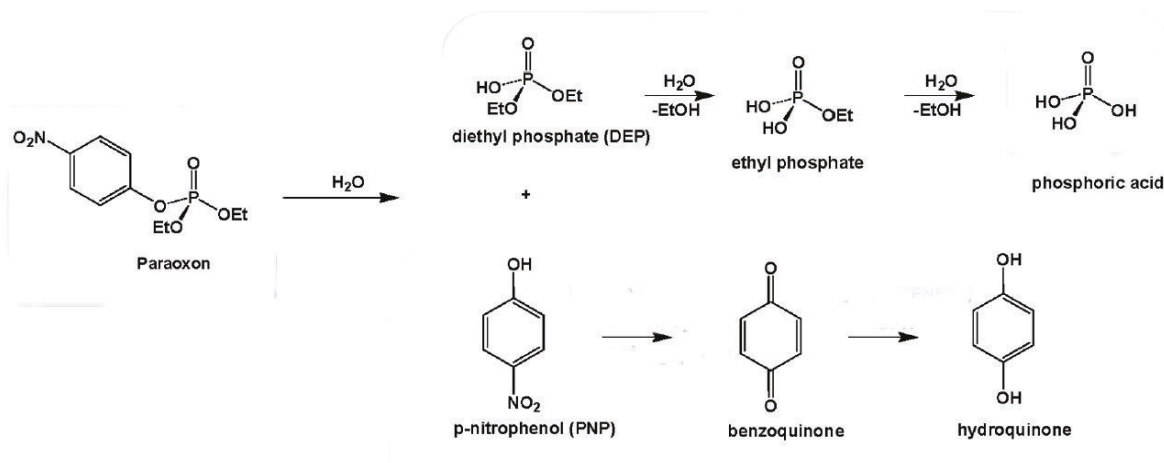


Figure 47 : Dégradation du Paraoxon en solution aqueuse

4.5. Impact de la surface spécifique et des pores des NPs sur la dégradation des agents toxiques

Du fait de à leur nanodimension, les NPs présentent des surfaces spécifiques importantes et peuvent donc absorber et dégrader efficacement les NOP. En effet, plus la surface spécifique est grande, plus le nombre de sites réactifs à la surface sera important. Janos a synthétisé du CeO₂ par précipitation. En fonction de la température de calcination (entre 200 et 1000°C pendant 2h), il obtient des NPs entre 0 et 165 m²/g. Les NPs ayant les surfaces spécifiques les plus élevées dégradent plus efficacement le Parathion.

La taille et volume des pores est aussi un paramètre important. Les NPs sont classifiées en fonction de la taille des pores (notation IUPAC):

- moins de 2 nm : ce sont les matériaux microporeux,
- plus de 50 nm : ce sont les matériaux macroporeux,
- entre 2 et 50 nm, les NPs ont une structure mésoporeuse.

Ces tailles de pores vont influencer l'efficacité de décontamination des NPs. Par exemple, les NPs avec une taille de pore de 3-4 nm vont permettre au VX (de taille 0,5-1nm) d'entrer dans cette structure facilement et d'être dégradé à la surface. Au contraire, si les NPs présentent une taille de pore plus petite, le transport d'un substrat dans la structure est limité, ce qui peut conduire à des vitesses de réaction plus faibles. La présence de mésopore conduit à des valeurs

plus faibles de surface spécifique et donc à une diminution de la vitesse de réaction. Stengl *et al.* (2012) a comparé l'efficacité de dégradation du TiO₂ non dopé et dopé au Zirconium (TiO₂-Zr) ou Germanium (TiO₂-Ge) en fonction de la taille des pores et des surfaces spécifiques. 50 mg de catalyseur sont mélangés à 1 mg d'ypérite dilué dans le nonane. Les résultats sont présentés dans les figures 48 et 49. Le volume de pore idéal pour la dégradation du soman et du VX est de 0,4 cm³/g.

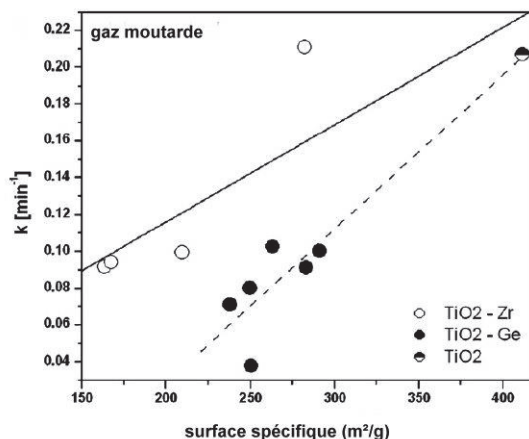


Figure 48 : vitesse de dégradation de l'ypérite en fonction des surfaces spécifiques du TiO₂ non dopé, TiO₂-Zr, TiO₂-Ge (Stengl *et al.*, 2012)

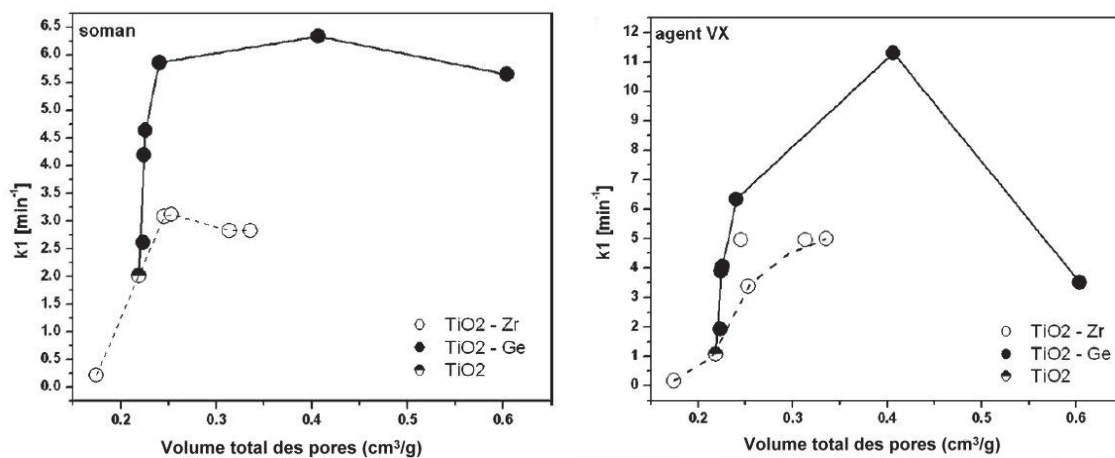


Figure 49 : vitesse de dégradation de l'ypérite en fonction du volume des pores du TiO₂ non dopé, TiO₂-Zr, TiO₂-Ge (Stengl *et al.*, 2012)

Les NPs d'oxydes métalliques sont des catalyseurs efficaces pour la dégradation des agents toxiques. Elles possèdent des propriétés physiques (diamètre de la particule, surface spécifique, volume et diamètre des pores) et des propriétés de surfaces (essentiellement les groupements OH de surface et les lacunes d'oxygènes) différentes en fonction de la nature, du dopage et de la méthode de synthèse. Ces propriétés permettent d'hydrolyser et d'oxyder plus ou moins efficacement les agents toxiques.

Conclusion de la partie bibliographique

Les risques NRBC sont les risques encourus après une exposition à des agents nucléaires, radiologiques, biologiques ou chimiques. Les agents chimiques dont les agents vésicants (ypérite) et les composés organophosphorés (VX) restent encore actuellement une menace pour les militaires et les civils. La plupart des composés organophosphorés (COP) de type V sont non volatils et pénètrent par voie cutanée. Une fois la circulation sanguine atteinte, ceux-ci agissent au niveau des synapses cholinergiques, provoquent une intoxication et la mort de la personne exposée. Le VX est le COP le plus toxique car une simple goutte en contact avec la peau peut entraîner la mort de la personne. L'occlusion de la peau par un vêtement, la température, la sueur sont des paramètres qui peuvent augmenter la pénétration de l'agent.

Pour éviter ou limiter l'intoxication, la décontamination de la peau, par adsorption et déplacement à l'aide d'un tissu/poudre adsorbants, lavage à l'eau ou par neutralisation à l'aide d'un actif, est un moyen efficace pour réduire l'absorption cutanée des agents toxiques. Les systèmes *in vitro* en cellule de Franz, même s'ils sous évaluent la pénétration de l'agent par rapport aux conditions *in vivo* (la circulation sanguine accélère l'absorption cutanée), sont des modèles reconnus pour l'évaluation de la pénétration cutanée des agents.

Pour les études *in vitro*, L'explant de peau d'oreille de porc est un bon modèle pour la peau humaine car la structure, composition et épaisseur sont similaires. L'usage de simulant ayant des propriétés physico-chimiques équivalentes à l'agent chimique est courant dans la littérature. Le pesticide organophosphoré Paraoxon est par exemple un bon simulant du VX.

L'efficacité de décontamination d'un produit se fait par comparaison entre une peau non décontaminée et une peau contaminée. Actuellement, la TAF et la RSDL sont les systèmes de décontamination les plus efficaces contre les COP. Ils sont utilisés dans les domaines civils et militaires et de nombreuses études rapportent leur efficacité (Chilcott *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2004 ; Bjarnason *et al.*, 2008 ; Taysse *et al.*, 2007 ; Sawyer *et al.*, 2011 ; Rolland *et al.*, 2013). Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité d'un décontaminant comme le temps entre l'exposition et le protocole d'application du produit (quantité, temps d'application, massage ou tapotement...). L'ensemble de ces conditions doit faire l'objet d'une évaluation précise avant une définition du protocole d'application. Néanmoins, le protocole de décontamination cutanée suivra en grande partie les recommandations de la norme AFNOR (Norme AFNOR NF X 52-122, janvier 2016) qui décrit des protocoles d'essai pour la décontamination de la peau saine des agents NRBC.

Dues à leur grande surface spécifique et réactivité, les nanoparticules (NPs) d'oxydes métalliques sont très utilisées pour l'adsorption et la dégradation rapide des agents chimiques en agents non ou moins toxiques. Ces NPs hydrolysent et oxydent les COP mais le mécanisme reste peu décrit. Les paramètres physicochimiques les plus souvent cités comme influençant la dégradation sont la taille et la surface spécifique. Le contrôle des conditions de synthèses des NPs permet de contrôler les propriétés physico-chimiques (état d'oxydation, surface spécifique, volume des pores) et donc leur efficacité à dégrader les COP. Cependant, aucune étude ne traite de l'efficacité de décontamination cutanée, *in vitro* ou *in vivo*, des NPs d'oxydes métalliques après exposition à un COP. Parmi les NPs, le dioxyde de cérium ou CeO₂ est un bon candidat pour la dégradation des agents chimiques. Le CeO₂ est déjà utilisé comme dépolluant et a également montré une bonne efficacité de protection de la peau avant une exposition au Paraoxon (Zenerino *et al.*, 2015 ; Bignon *et al.*, 2016). Si Janos *et al.* (2014) a évalué l'efficacité de dégradation du CeO₂ sur des COP en milieu solvant, aucune publication ne traite de l'efficacité de dégradation du CeO₂ en milieu aqueux et encore moins de décontamination cutanée.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Protocoles pour l'évaluation de l'efficacité de dégradation et de décontamination cutanée des nanoparticules

L'objectif de la thèse est de développer un système peu coûteux et efficace pour la décontamination cutanée c'est-à-dire qui puisse permettre la dégradation du toxique et la diminution de la quantité absorbée de POX à travers la peau. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, les nanoparticules (NPs) d'oxydes métalliques sont des catalyseurs lors des réactions d'oxydation et/ou d'hydrolyse de l'ypérite et des COP. La nature des NPs et leur méthode de synthèse influent sur leur structure (diamètre de la particule, surface spécifique, volume et diamètre des pores), sur leur propriété de surface (groupements OH de surface, lacunes d'oxygènes) et donc sur leur capacité à dégrader plus ou moins efficacement les agents létaux.

T. Boutard (2013) a développé un protocole permettant d'évaluer la dégradation du Paraoxon (POX), COP modèle, en présence de NPs. L'avantage de cette méthode est de pouvoir cibler rapidement *in vitro* les NPs les plus efficaces pour la dégradation du POX avant de les utiliser en décontamination cutanée. Le premier objectif a donc été d'adapter ce protocole en fonction du matériel disponible au laboratoire. La plupart des tests de dégradation des COP et de l'ypérite en présence de NPs d'oxydes métalliques sont réalisés dans des solvants apolaires car ils accélèrent la dégradation des toxiques. Janos *et al.* (2014) a mesuré le pourcentage de dégradation d'1 mg de Parathion dilué dans 75 μ L de solvant et mélangé à 25 mg de CeO₂ calciné à 500°C. La dégradation totale du Parathion dans des solvants non polaires (nonane, acétonitrile...) a lieu après 100 min environ alors qu'en milieu aqueux, elle a lieu après 100 h. Cependant, l'utilisation de solvants apolaires n'est pas représentative de la cinétique de dégradation sur peau. Nous avons fait le choix d'effectuer nos tests en milieu aqueux, conditions qui reflètent l'environnement lors de la décontamination des victimes. De plus, l'eau permet les réactions d'hydrolyse, indispensables dans certaines réactions de dégradation.

Dans un second temps, le but a été d'évaluer l'efficacité de décontamination cutanée *in vitro* des NPs d'oxydes métalliques. La méthode habituellement utilisée pour doser la quantité de NOP dans la peau ou dans le sang est la méthode enzymatique développée par d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961) qui est basée sur la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) résiduelle. L'échantillon contenant le NOP à doser est mélangé à la butylcholinestérase (BuChE). La BuChE réagit la butyrylthiocholine (BuSCh). L'hydrolyse de cette dernière conduit à la thiocholine (SCh) qui forme un dérivé coloré avec l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) : le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB). Le TNB, de couleur jaune, est

quantifiable par spectrophotométrie. Moins le COP est présent, plus la solution devient jaune foncée. Dans le cas contraire, la solution est jaune pâle:

Sans COP : $\text{BuChE} + \text{BSCh} \rightarrow \text{SCh} + \text{DTNB} \rightarrow \text{TNB}$ (jaune)

Avec COP : $\text{COP} + \text{BuChE}^* + \text{BSCh} \rightarrow \text{BSCh} + \text{DTNB} \rightarrow \text{DNTB}$ (jaune pâle)

Une gamme étalon permet de relier l'activité résiduelle enzymatique avec la concentration en NOP dans l'échantillon. Cette méthode est sensible, peu coûteuse et permet le dosage indirect de tous les COP. Cependant, la nécessité de diluer successivement l'échantillon multiplie les erreurs de mesures. De plus, elle est non spécifique et peut refléter le dosage de métabolites ayant une activité anticholinestérasique.

Notre étude se porte uniquement sur le POX. Avant de lancer les essais de décontamination en cellule de Franz de ce toxique, une méthode analytique alternative a été mise en place. Compte tenu des compétences du laboratoire, nous avons choisi de développer une méthode en chromatographie liquide (HPLC), même si la littérature concernant le dosage du POX par chromatographie est peu abondante. La méthode HPLC développée permet également le dosage du produit de dégradation, le p-nitrophénol (PNT), qui permettra de comparer l'efficacité de dégradation des différents systèmes de décontamination cutanée. En accord avec les protocoles déjà établis par P. Rolland en cellules de Franz en utilisant la peau d'oreille de porc comme modèle de peau humaine, les essais de décontamination cutanée du POX *in vitro* ont pu être mis en place. Les dosages du POX et du PNT dans le compartiment récepteur au cours de l'expérimentation et dans les différentes couches de la peau 24 h après exposition ont été effectués par la méthode HPLC développée.

1. Evaluation de l'efficacité de dégradation du CeO_2 vis-à-vis du Paraoxon

1.1. Protocole

Le PNT en milieu tampon donne une couleur jaune à la solution et absorbe à 360 nm. L'hydrolyse du POX en PNT, en présence d'eau et accélérée par un catalyseur, est donc une réaction quantifiable par spectrophotométrie (Figure 50) :

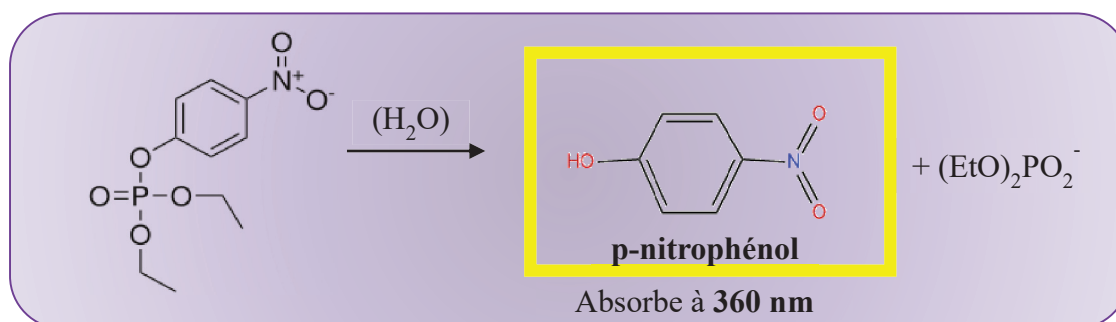


Figure 50 : Dégradation du Paraoxon en P-nitrophénol en présence d'un catalyseur

Un spectre d'absorption a permis de vérifier que le POX et le PNT n'absorbaient pas aux mêmes longueurs d'ondes du spectre (le POX absorbe à 230 nm).

Une solution de POX (O,O-diethyl p-nitrophenyl phosphate, pureté 90%, densité 1,27 g/mL, Sigma) diluée à 200 µmol/L dans l'HBSS (pH=7,4, Gibco) est mise en contact avec 200 mg de NPs. Ce ratio (nombre de mole de POX/g de NPs) a été choisi pour deux raisons : (i) il permet d'observer une dégradation significative du POX en 5 h et permet de comparer l'efficacité de dégradation de plusieurs catalyseurs; (ii) si le POX est dégradé à 100%, l'absorbance ne dépassera pas la limite de quantification du spectrophotomètre (1,5).

Les expériences sont réalisées en triplicat. Tous les tubes sont placés sur un agitateur à balancement afin de permettre à toutes les NPs d'être en contact avec le POX. Toutes les 30 min pendant 5 h, les échantillons sont centrifugés à 5000 RPM pendant 2 min. L'absorbance du surnageant est mesurée à 360 nm par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV-1601 Shimadzu) (Figure 51). Le surnageant est replacé dans le tube après la mesure.

Un tube contrôle est effectué en parallèle : il contient 2 mL d'une solution de POX dilué dans l'HBSS à 200 µmol/L sans NPs. Il permet de vérifier qu'il n'y a pas d'hydrolyse du POX en PNT sous l'effet du tampon et de servir de blanc lors des analyses en spectrophométrie.

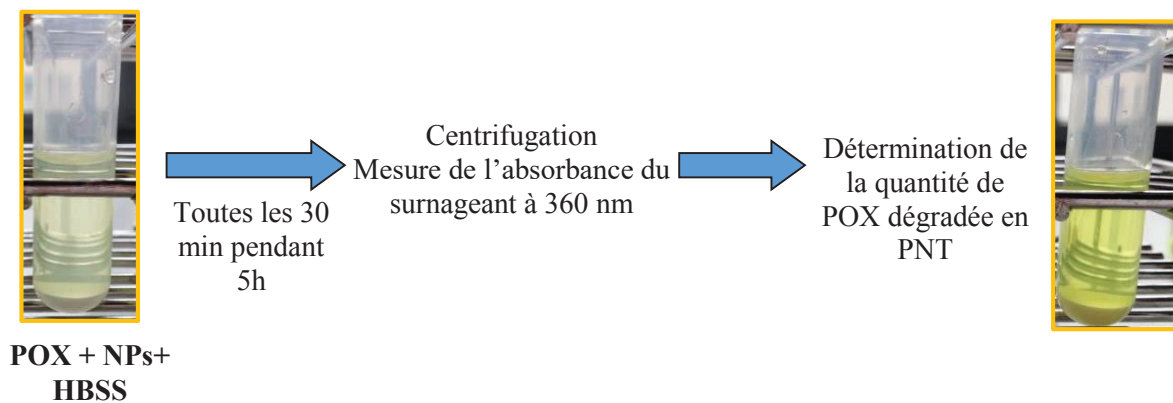


Figure 51 : Evaluation de l'efficacité de dégradation du CeO₂ vis-à-vis du Paraoxon

1.2. Traitement des résultats

L'absorbance du surnageant de chaque tube est relevée toutes les 30 min pendant 5h. Une courbe d'étalonnage permet de relier l'absorbance à la concentration de PNT (mol/L). Sachant qu'une mole de POX donne une mole de PNT (Figure 50), la concentration en POX dégradée

est déterminée à partir de la concentration en PNT présente et de la concentration de POX initiale :

$$\% \text{ dégradation of POX} = \frac{n_{\text{PNT}} \times 100}{n_{\text{POX}}}$$

Avec:

n_{PNT} : nombre de moles de PNT qui apparaissent pendant l'expérience

n_{POX} : quantité initiale de POX (0,4 μ moles)

2. Evaluation de l'efficacité de décontamination cutanée

2.1. Préparation des peaux d'oreille

Les oreilles de porcs sont prélevées sur cochon mort (porc de ferme de 3 mois) à l'Ecole de Chirurgie ou au laboratoire CarMeN de la Faculté de Pharmacie de Lyon. Elles sont d'abord lavées à l'eau claire puis essuyées délicatement avec du papier absorbant. La peau est séparée du cartilage au moyen d'un scalpel. Les explants de peau utilisés sont tondus, non dermatomés et d'une épaisseur moyenne de $1,05 \pm 0,15$ mm (épaisseur mesurée par un micromètre gradué Palmer®). Les explants sont coupés selon l'emporte-pièce de 24 mm de diamètre (surface totale de l'explant=4,52cm²). A l'aide d'un Tewamètre®, la perte insensible en eau (PIE) est mesurée. Pour cela, la sonde est positionnée et tenue immobile sur la peau pendant 30 s. Lorsque la peau est altérée, le flux d'eau transépidermique est augmenté et la PIE augmente. Les échantillons de peau dont la PIE est inférieure à 3g/h.m² ou supérieure à 10 g/h.m² sont exclus de l'étude. Les échantillons de peau sont ensuite emballés dans du papier aluminium puis congelés à - 20°C pour une période maximale d'un an.

2.2. Conditionnement des cellules

Les peaux sont laissées décongelées avant expérimentation à température ambiante puis placées entre le compartiment donneur (CD) et le compartiment récepteur (CR) de la cellule de Franz. Les cellules utilisées ont une surface utile de 2,54 cm². Le CR est rempli d'HBSS (pH 7,4, Gibco). La cellule de Franz est placée au bain-marie à 37°C pendant 30 min pour permettre la réhydratation de la peau et obtenir une température de surface de la peau de l'ordre de 32°C.

2.3. Exposition de la peau au Paraoxon

On dépose 25,4 μL (=10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, ou 46,6 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) de POX (O,O-diethyl p-nitrophenyl phosphate, pureté 90%, densité 1,27 g/mL, Sigma) au centre de la peau à l'aide d'une pipette à déplacement positif microman M25.

2.4. Décontamination cutanée

Les peaux sont décontaminées après exposition au POX. Pour cela, les cellules sont retirées du bain marie et le CR est ôté. Le protocole de décontamination cutanée avec les poudres suit le protocole utilisé avec la Terre à Foulon (TAF). La décontamination avec des systèmes liquides suit les recommandations d'utilisation de la RSDL. 36,4 mg de poudre (ex : TAF ou CeO_2) ou 260 μL de solution (ex : RSDL, suspension épaissie de cérine) sont déposés à la surface de la peau. Ces quantités ont été déterminées de la manière suivante :

$$\text{masse de poudre}/\text{cm}^2 \text{ de peau} = \frac{\text{masse gant poudreux TAF}}{\text{superficie corporelle moyenne d'un adulte}}$$

$$\text{volume de liquide}/\text{cm}^2 \text{ de peau} = \frac{\text{volume de RSDL utilisé pour un adulte}}{\text{superficie corporelle moyenne d'un adulte}}$$

Les systèmes de décontamination sont étalés sur la peau par frottement pendant 10 s avec une éponge sans lotion (1,5*1,5cm) du kit RSDL dans le cas des formes liquides, et du kit TAF dans le cas des poudres en mouvement circulaire (1 rotation/sec). Les systèmes liquides sont laissés sur la peau pendant 2 min. A l'aide d'une seconde éponge sans lotion, la surface de la peau est essuyée afin de retirer l'excès de décontaminant avec trois mouvements allant de la gauche vers la droite. La peau est séchée deux fois par tapotement avec du papier absorbant.

2.5. Cinétique de pénétration cutanée du Paraoxon et distribution dans les différents compartiments 24 h après exposition

Des prélèvements de 550 μL du milieu récepteur sont réalisés après différents temps d'exposition. Après chaque prélèvement, un volume identique d'HBSS est ajouté afin de maintenir la quantité du milieu récepteur constante tout au long de l'expérimentation.

Après 24 h d'exposition (figure 52), le milieu récepteur (fraction « **CR** ») est récupéré en totalité à l'aide d'une seringue. On prélève 550 µl de ce volume qui est ensuite mélangé à 550 µl d'éthanol afin de permettre une meilleure solubilisation du POX.

La surface de la peau est tamponnée à 3 reprises avec 3 papiers absorbants (Wypall, Kimberly Clark). Le papier absorbant est ensuite placé dans un flacon contenant 20 mL d'éthanol. C'est la fraction de POX à la **surface de la peau**.

Un premier strip (D-Squame tape, Monaderm) est maintenu par un poids de 200 g durant 10 s à la surface de la peau. Le strip est ensuite retiré rapidement à l'aide d'une pince à épiler et placé dans un tube contenant 10 mL d'éthanol. Le tube contient la fraction de POX sur le **premier strip**.

A l'aide d'une colle cyanoacrylate (Loctite SuperGlue-3, Henkel) et d'une lame de verre, le *stratum corneum* est séparé de l'épiderme viable et du derme puis placé dans 10 mL d'éthanol. La séparation permet le dosage du POX dans le *stratum corneum*.

Afin de séparer l'épiderme viable du derme, le reste de la peau est placé dans 5 mL d'HBSS préalablement chauffé au micro-onde (la température de l'eau doit atteindre 60°C environ) pendant 45 s. L'**épiderme viable** et le **derme** coupés en dés sont placés respectivement dans 2 et 4 mL d'éthanol afin de permettre l'extraction du POX dans ces deux couches de la peau.

Le POX et le PNT sont extraits dans l'éthanol durant la nuit (14 h). Les extraits du CR, à la surface de la peau et sur le premier strip sont dilués respectivement au 1/2, 1/100 et 1/10 dans l'éthanol puis filtrés par un filtre en nylon de 20 µm.

Récapitulatifs :

Tubes	Ce qu'il contient	Quantité HBSS	Quantité éthanol
surface de la peau	papier absorbant		20 mL
Premier strip	premier strip		10 mL
<i>Stratum corneum</i>	<i>stratum corneum</i>		10 mL
Epiderme viable	épiderme viable		2 mL
Derme	derme		4 mL
Echantillons du CR	550 µl de liquide récepteur correspondant au temps t=2, 4, 6, 8, 10, 12, 24h	550 µl	550 µl

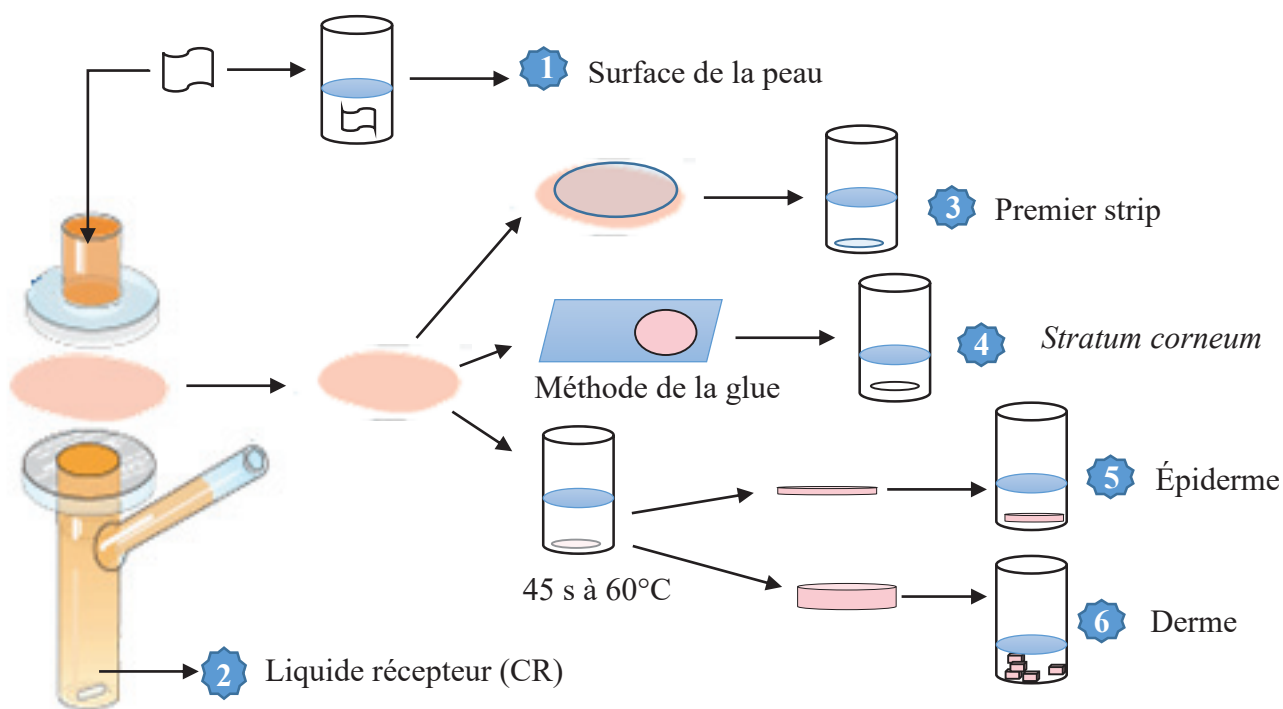


Figure 52 : Récupération des différentes fractions 24 h après exposition au Paraoxon.

2.6. La méthode HPLC

L'HPLC a pour but de séparer et identifier les composants d'une solution à étudier. 10 μ L de l'échantillon est prélevé et amené vers la colonne grâce à la phase mobile (débit : 0,7 mL/min) constituée à 65% de méthanol (ultrapure analytical grade, Fisher Scientific) et 35% d'eau contenant 5% d'acide acétique glacial (Fisher Scientific). La colonne, une XTerra MS C18 Cartridge (dimensions 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm), est chauffée à 40°C. En sortie de colonne, les composants sont séparés en fonction de leur polarité et passent dans un spectrophomètre UV. L'absorbance des composants et leur temps de rétention (temps nécessaire pour qu'une molécule de la phase mobile traverse la colonne) permettent d'identifier les composés. Le PNT a un temps de rétention de 5,5 min et une absorbance à 314 nm, le POX a un temps de rétention de 7,2 min et absorbe à 269 nm. Un échantillon est analysé en 10 min. La hauteur du pic permet de déterminer la concentration de PNT ou de POX dans les différents compartiments.

En accord avec les recommandations de « the International Conference on Harmonisation » ou ICH, la méthode HPLC a été validée en terme de répétabilité, reproductibilité, limite de quantification (LOQ), limite de détection (LOD), linéarité du signal (concentration proportionnelle à la hauteur du pic obtenue) et stabilité à -20°C (permettant de vérifier si les échantillons peuvent être congelés si nécessaires). Les détails concernant la validation de la méthode sont placés en annexe.

2.6.1. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lors que celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée « précision intra-analyse ». La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie), elle est aussi appelée « précision inter-analyse » (ICH Q2(R1)). Ces deux paramètres sont exprimés par le coefficient de variation d'un ensemble de mesures :

$$C_v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Avec:

s: écart type,

\bar{x} : moyenne.

La répétabilité de la méthode a été évaluée en calculant le C_v de la hauteur de pic de 5 injections successives provenant de 3 solutions ayant 3 concentrations différentes (1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ de POX dilué dans l'éthanol et 1, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$ de PNT dilué dans l'éthanol). La reproductibilité a été évaluée de la même manière mais avec des solutions mères préparées indépendamment.

La répétabilité de la méthode HPLC est inférieure à 5,1% et 2,2% pour la quantification du POX et du PNT respectivement. Les résultats montrent que la méthode est répétable (annexe 4).

Les C_v correspondant à la reproductibilité des mesures de la concentration en POX et PNT dans les échantillons sont inférieurs à 4,9% (annexe 5).

2.6.2. Limite de Quantification (LOQ) et Limite de Détection (LOD)

La Limite de Détection (LOD) d'une méthode correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte (MacDougall *et al.*, 1980). Elle est déterminée en préparant une solution qui doit produire une réponse (hauteur de pic) 3 fois supérieure au bruit de fond. La concentration de la solution est considérée comme une LOD si le rapport Signal / Bruit (S/B) est égal à 3.

La Limite de Quantification (LOQ) est la plus faible quantité de substance que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude (MacDougall *et al.*,

1980). La LOQ est déterminée de la même manière que la LOD mais avec un rapport S/N de 10.

Les résultats ont montré que la LOD et la LOQ du POX avec la méthode HPLC développée est respectivement de 420 pg et 1400 pg. Concernant le PNT, la LOD était de 750 pg et le LOQ de 2500 pg. Les faibles LOD et LOD permettent la quantification du POX et du PNT à de très faibles concentrations.

Millerioux *et al.* (2009a) et Zenerino *et al.* (2015) ont étudié la pénétration du POX à travers une membrane et ont été capable de détecter des quantités de POX supérieures à 2200 pg avec la méthode d'Ellman. Notre méthode est plus sensible et permet le dosage de plus faibles quantités de toxiques.

2.6.3. Linéarité du Signal

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon (ICH Q2(R1)). Ce point a été vérifié en réalisant des courbes d'étalonnage. Les courbes d'étalonnage ont été réalisées en triplicat à partir de solution avec des concentrations allant de 0,1 à 100 pg/ml de POX et de 0,05 à 50 pg/ml de PNT. Les solvants de dilution étaient soit l'éthanol ou 50% d'éthanol, 50% d'HBSS.

Le coefficient de corrélation (R^2) est déterminé à partir des droites d'étalonnage. Le R^2 ne doit pas être inférieur à 0,990 (ICH Q2 (R1)).

Les courbes d'étalonnage du POX et du PNT sont linéaires dans l'intervalle de concentration de 0,1-100 pg/ml pour le POX et 0,05 à 50 pg/ml pour le PNT avec un R^2 moyen de 0,999 (annexe 6).

2.6.4. Stabilité à -20°C

La stabilité à -20°C permet de regarder si le POX et le PNT sont stables au congélateur. Si la congélation n'induit pas la dégradation du POX et du PNT, les échantillons pourront être stockés au congélateur et analysés en HPLC plus tardivement. Dans le cas contraire, cela implique plus de contraintes, la quantification du POX et PNT doit se faire immédiatement après l'extraction et la filtration.

La stabilité à -20°C des analytes a été déterminée en injectant en HPLC trois échantillons de concentrations différentes de POX ou PNT qui ont été congelés à -20°C durant 24h puis décongelés à température ambiante. La hauteur des pics obtenus est comparée à celle des échantillons non congelés avec la même concentration en POX et PNT.

Les résultats ont montré que la congélation ne dégradait pas le POX (annexes 7 et 8).

2.6.5. Le facteur de symétrie des pics

Le facteur de symétrie (FS) (Figure 53) des pics est calculé de la même suivante :

$$FS = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Avec :

$W_{0,05}$: largeur à 5% de la hauteur du pic

f : la distance entre le sommet du pic et le point situé à 5% de la hauteur du pic.

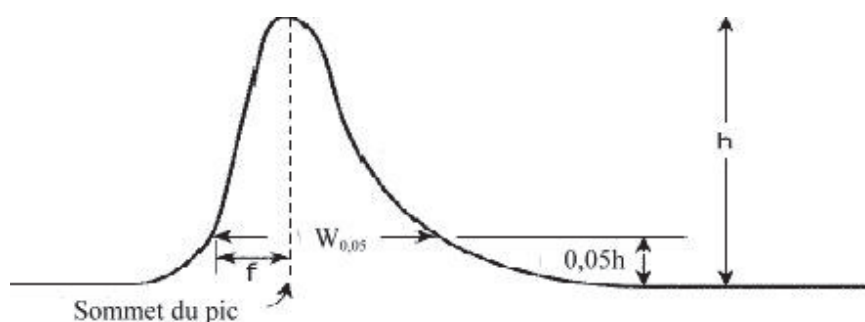


Figure 53 : Mesure du facteur de symétrie d'un pic de chromatographie

La valeur du FS doit être entre 0,9 et 1,5.

Le FS du POX est de 1,11 et celui du PNT de 1,13. Leurs pics sont considérés comme symétriques.

2.6.6. Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, des lipides de la peau, etc (ICH Q2 (R1)).

Le chromatogramme obtenu par la méthode HPLC a démontré une bonne séparation des pics du POX, du PNT et d'autres composés présents dans la peau avec une bonne résolution.

2.7. Evaluation de la pénétration cutanée du Paraoxon *in vitro*

A partir du protocole décrit ci-dessus et grâce à la méthode HPLC développée, des premiers essais ont permis d'évaluer la cinétique de pénétration cutanée du POX en cellule de Franz sur peau d'oreille de porc ainsi que sa distribution dans les différents compartiments (depuis la surface de la peau jusqu'au CR) (Figures 54 et 55).

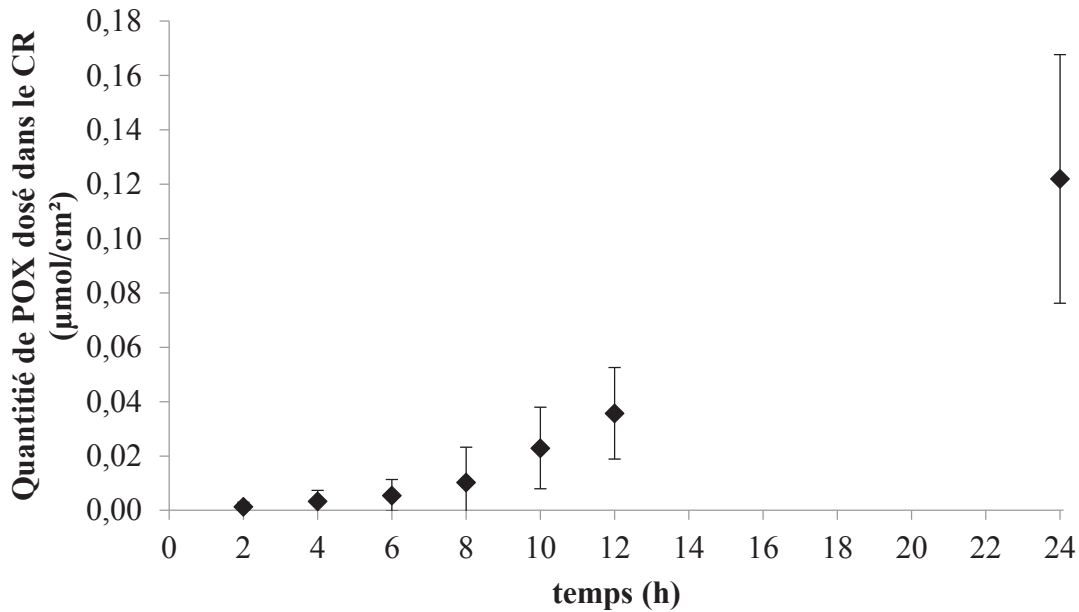


Figure 54 : Cinétique de pénétration du Paraoxon à travers une peau d'oreille de porc pendant 24 h Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM (n= 8).

Le temps de latence (t_{lag}), qui correspond au temps où la couche la plus externe de la peau est saturée et la diffusion de POX vers le derme est constante, se situe entre 4 h et 7 h post-exposition (6,7 h en moyenne). Le flux de POX dans le CR (J_{max}) déterminé entre 10 et 24 h est de $0,007 \pm 0,004 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$. Les coefficients de variation des paramètres cinétiques (J_{max} , T_{lag}) sont importants : ceci est lié à la variabilité biologique des échantillons de peau.

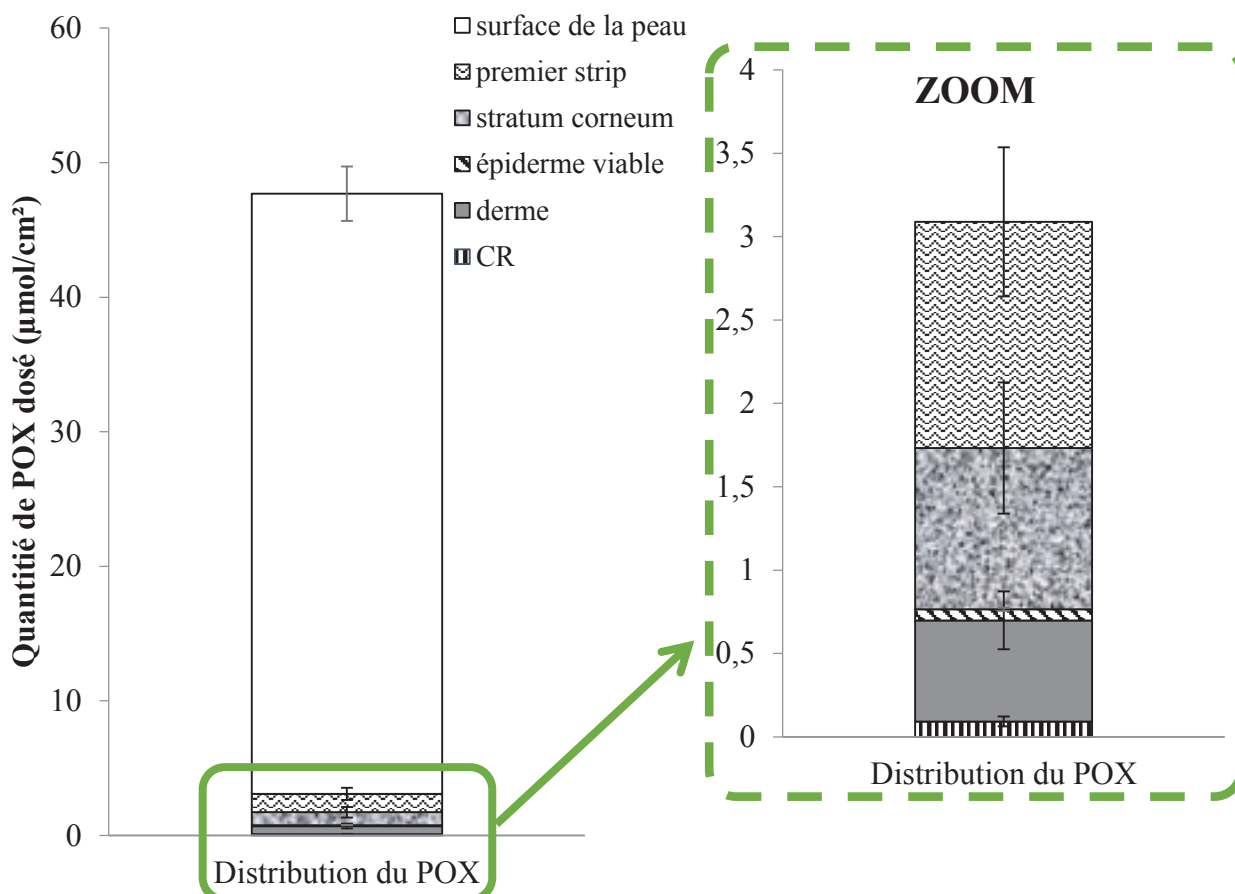


Figure 55 : Distribution du Paraoxon après 24 h d'exposition ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM (n = 8).

Si on somme la quantité de POX de la surface de la peau jusqu'au CR, on retrouve 101% de la quantité de POX déposée sur la peau initialement (Q_0). Cette donnée permet de valider que l'extraction du POX dans les différents compartiments est totale et valide le protocole d'extraction.

Après 24 h d'exposition, le POX reste majoritairement à la surface de la peau ($44,60 \pm 2,02 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ou 95,6% du Q_0). Moins de 0,2% du Q_0 ($0,09 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) atteint le CR. La fraction de toxique absorbée (du *stratum corneum* au CR) est de 0,8% ($1,73 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Le POX, étant hydrophobe, a tendance à être stocké dans le *stratum corneum* avant d'être libéré dans l'épiderme viable.

Les conditions expérimentales des études de pénétration du POX à travers la peau sont souvent variables (épaisseur de la peau, la surface de la peau, le temps d'exposition, ...) et il est difficile de comparer nos résultats avec la littérature. Une étude précédente (Millérioux *et al.*, 2009) a aussi étudié la pénétration cutanée du POX à travers une peau d'oreille de porc non dermatomée. Les conditions expérimentales sont différentes des nôtres : l'épaisseur des explants de peau était de $530 \pm 5 \mu\text{m}$, la quantité déposée de POX était de $4,3 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, et la

surface utile de la cellule de Franz est de 1,13 cm². L'auteur utilise la méthode d'Ellman pour la quantification du POX à la surface de la peau, dans la peau et dans le CR. Néanmoins, les résultats restent similaires aux nôtres : 95% du POX est quantifié à la surface de la peau, 0,15% atteint le CR et 0,26% est dosé dans la peau.

Du PNT a été détecté lors de l'analyse des différents échantillons en HPLC-UV. Cette quantité de PNT correspond à la quantité présente dans le produit initial de POX (pur à 90%). En moyenne, le POX vendu par Sigma contient environ 3% de PNT en poids. Le PNT possède un poids moléculaire (139 g/mol) et un log P (1,98) inférieurs au POX. De ce fait, il est attendu que le PNT pénètre légèrement plus rapidement que le POX à travers la peau : après 24 h, 91% de PNT est détecté à la surface de la peau, 2,9% dans la peau et 3,4% dans le compartiment récepteur. Cette quantité de PNT sera toujours soustraite des mesures lors de l'évaluation de l'efficacité de dégradation des NPs.

2.8. Efficacité d'un dispositif de décontamination

Afin de faire le lien entre le nombre de moles de POX restant dans la peau et le nombre de moles de produit de dégradation produit (p-nitrophénol), les résultats seront exprimés en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. La fraction **non absorbée** (somme des quantités dosées à la surface de la peau et dans le premier strip) est la fraction qui peut être retirée naturellement de la peau. Au contraire, la fraction **absorbée** (c.-à-d. du *stratum corneum* jusqu'au compartiment récepteur) est la quantité de toxique qui peut potentiellement atteindre la circulation sanguine. La quantité **totale** de toxique est somme de la fraction absorbée et non absorbée.

L'efficacité d'un dispositif de décontamination est son aptitude à : (i) diminuer la quantité de toxique absorbée par la peau et/ou (ii) peut dégrader le toxique présent sur et dans la peau (iii) améliorer le **pronostic fonctionnel (FP)** des individus contaminés (AFNOR NF X 52-122, janvier 2016).

Le pronostic fonctionnel pour chaque dispositif de décontamination a été comparé et calculé selon la manière suivante :

$$FP = \frac{Q_{2T} + Q_{3T} + Q_{4T}}{Q_2 + Q_3 + Q_4}$$

Avec:

Q_2 = la quantité de POX présente à la surface de la peau immédiatement après le processus de décontamination, Q_{2T} pour le témoin,

Q_3 = la quantité de POX dans la peau (c'est-à-dire la somme des quantités dosées dans le *stratum corneum*, l'épiderme viable et le derme) à la fin de l'expérimentation, Q_{3T} pour le témoin,

Q_4 = la quantité de POX résorbée (c'est-à-dire dans le CR) à la fin de l'expérimentation, Q_{4T} pour le témoin.

Ainsi, ces protocoles ont permis de comparer l'efficacité de dégradation du CeO_2 (en comparaison avec d'autres NPs ou avec de la cérine obtenu par d'autres voies de synthèse) puis, d'évaluer l'efficacité de décontamination cutanée du CeO_2 en comparaison avec la TAF et la RSDL.

Chapitre 2 : Evaluation de l'efficacité de décontamination cutanée du CeO₂ vis-à-vis du Paraoxon en comparaison avec Terre à Foulon et RSDL

1. Introduction

La TAF et la RSDL sont les systèmes de décontamination décrits comme les plus efficaces vis-à-vis des COP (Bjarnasson *et al.*, 2008 ; Taysse *et al.*, 2007 ; Rolland *et al.*, 2013). Néanmoins, ces deux dispositifs présentent des inconvénients. L'application de la TAF permet une adsorption efficace de tous les COP sur la peau mais ne les dégrade pas. La RSDL, quant à elle, est un système liquide permettant la neutralisation de l'agent mais celui-ci reste très coûteux et non dénué de toxicité (Jager & Stagg, 1958). L'objectif de la thèse est de développer un système avec un coût de fabrication peu élevé et efficace pour la décontamination cutanée c'est-à-dire qui permette la dégradation du toxique et la diminution de la quantité absorbée de POX à travers la peau (quantité sommée du *stratum corneum* au CR). A l'ICMN de Chartres, des NPs de CeO₂ sont synthétisées par voie hydrothermale puis calcinées à différentes températures dans l'air. La température de calcination influe sur la taille des NPs : plus la température dans le four augmente et plus la taille des NPs augmente et par conséquent, la surface spécifique diminue. La thèse de T. Boutard (2013) a démontré que les NPs de CeO₂ calcinées à 500 et 600°C étaient les plus efficaces pour la dégradation du Paraoxon. La cérine calcinée à 500°C a également montré une bonne protection *in vitro* sur membrane en silicone. Greffée à un polymère, la cérine permet de réduire deux fois la quantité de POX dans le CR comparé au polymère non gréffé (Zenerino *et al.*, 2015).

Dans cette partie, l'efficacité de dégradation de la cérine en suspension, synthétisée selon le même protocole qu'à l'ICMN et calcinées à 500 ou 600°C, vis-à-vis du Paraoxon a été réévaluée. Le CeO₂, ayant potentiellement une activité photocatalytique, l'expérience a été menée dans l'obscurité ou sous Ultra-Violet (UV).

Le second but a été d'évaluer l'efficacité de décontamination cutanée *in vitro* du CeO₂ et d'une suspension épaissie de cérine (CeO₂-W, qui serait plus facile à utiliser en cas de décontamination de masse) en cellule de Franz, sur peau d'oreille de porc dans des conditions de décontamination approfondie (1 h après exposition au POX). L'efficacité de décontamination a été comparée aux deux systèmes de références, la TAF et la RSDL.

2. Méthodes

2.1. Synthèse des nanoparticules de CeO₂

La synthèse des NPs de CeO₂ est effectuée par voie hydrothermale ce qui permet de réduire le temps de réaction et de précipitation des NPs. Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2 mol/L (NaOH, 98%, Alfa Aesar) est ajoutée à une solution aqueuse de nitrate de cérium 0,5 mol/L (Ce(NH₄)₂(NO₃)₆, 99,5%, Alfa Aesar). Le mélange est introduit dans des tubes puis placé au micro-onde (Multiwave-3000, Anton Paar) à 150°C pendant 15 min, et à une pression maximum de 10 bars (Figure 56). Après refroidissement à température ambiante, le précipité est récupéré par centrifugation et lavé trois fois à l'eau distillée puis laissé à l'air libre une nuit. L'échantillon est ensuite calciné à 500 ou 600°C à l'air pendant 2h pour augmenter sa cristallinité.

A titre indicatif, une synthèse avec 200 mL de milieu réactionnel permet d'obtenir 7 g de CeO₂ en moyenne. Après calcination, les échantillons sont broyés au mortier puis stockés dans des flacons en verre placés à l'obscurité et à température ambiante.

L'ensemble du procédé est illustré en figure 56.

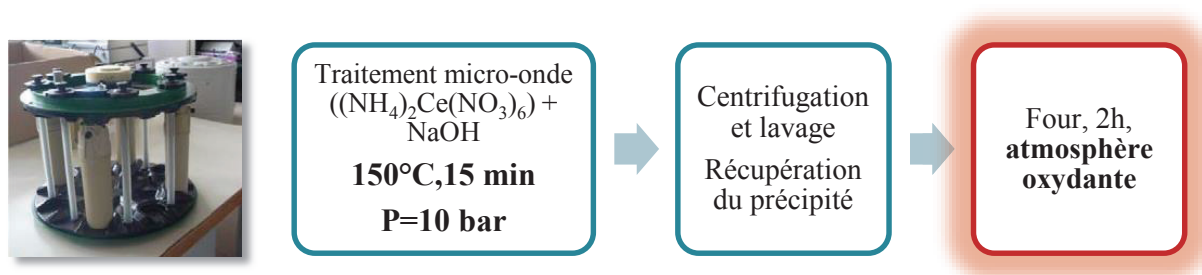


Figure 56 : synthèse des nanoparticules de CeO₂ par voie hydrothermale.

2.2. Formulation de la suspension épaissie en CeO₂

Le CeO₂ (10% p/p) est dispersé sous agitation magnétique dans l'eau distillée à 600 RPM pendant 24h. 1% de gomme de Guar (Copper) (1% p/p) est ajoutée au mélange, chauffé 30 min à 55°C sous agitation magnétique puis refroidi à température ambiante. La suspension aqueuse de CeO₂ est nommée CeO₂-W.

2.3. Caractérisation des NPs

Après chaque synthèse, les échantillons de CeO₂ sont analysés en diffraction des rayons X (DRX) (diffractomètre PANalytical X'Pert Pro) selon la configuration Bragg-Brentano. La raie

$K\alpha$ du Cu ($\lambda = 1,5418740 \text{ \AA}$) est utilisée, la raie $K\beta$ du cuivre est filtrée physiquement au moyen d'un filtre au nickel. Les analyses sont réalisées de 20 à 100° avec un pas de $0,004$ et une durée de 90 secondes par pas. La DRX permet de mesurer la taille des cristallites (selon la formule de Scherrer) et de confirmer leur structure cristallographique.

La Microscopie Electronique à Transmission (MET) (JEOL 2100 HT) permet d'observer la forme, la cristallinité et la taille des NPs. Avant les observations, le CeO_2 est dispersé dans l'eau puis déposé sur des grilles de carbone. Les grilles sont laissées à sécher une nuit. La distribution en taille des NPs est déterminée sur une moyenne de 100 particules.

Les surfaces spécifiques des échantillons ont été déterminées à l'aide d'un analyseur ASAP 2020, par adsorption d'azote. La méthode de Brunauer-Emmett-Teller (BET) est utilisée pour la mesure de la surface spécifique.

2.4. Evaluation de l'efficacité de dégradation du CeO_2 vis-à-vis du POX

Le protocole est détaillé dans le chapitre 1 (§ 1.1). Une solution de POX diluée à $200 \mu\text{mol/L}$ dans l'HBSS est mise en contact avec 200 mg de CeO_2 pendant 5 h ($n=3$). Le ratio est donc de $2 \mu\text{mole}$ de POX par gramme de CeO_2 . La réaction du CeO_2 avec le POX est réalisée à température ambiante à l'obscurité ou sous irradiation UV (Suntest CPS+ (Atlas), Filtre B, spectre solaire, 765 W/m^2).

2.5. Protocole de décontamination cutanée

Le protocole est également détaillé dans le chapitre 1 (§ 1.2). Une heure après exposition au POX ($46,6 \mu\text{mol/cm}^2$), les peaux sont décontaminées par $36,4 \text{ mg}$ de poudre (TAF ou CeO_2) ou $260 \mu\text{L}$ de solution (RSDL ou $\text{CeO}_2\text{-W}$) déposés à la surface de la peau. Les distributions de POX et de PNT dans les différents compartiments sont évaluées 24 h après exposition au POX.

3. Résultats sous forme d'article : *In Vitro* Skin Decontamination of the Organophosphorus Pesticide Paraoxon with Nanometric Cerium Oxide CeO_2

Les résultats de cette partie expérimentale sont présentés sous la forme d'article qui a été publié dans *Chemico-Biological Interactions* (annexe 9):

Salerno, A., Devers, T., Bolzinger, M.-A., Josse, D., Pelletier, J., Briançon, S., 2016. In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO₂. *Chemico-Biological Interactions*. 1-10.

Doi: [dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.035](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.035).

***In Vitro* Skin Decontamination of the Organophosphorus Pesticide Paraoxon with Nanometric Cerium Oxide CeO₂**

Alicia Salerno^{a,b}, Thierry Devers^c, Marie-Alexandrine Bolzinger^{a,b}, Jocelyne Pelletier^{a,b}, Denis Josse^d, Stéphanie Briançon^{a,b*}

^a CNRS UMR5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, Université Lyon 1, 69622, Villeurbanne, France.

^b Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologique, Université de Lyon, 69373, Lyon, France.

^c Interfaces Confinement Matériaux et Nanostructures, IUT de Chartres, Université d'Orléans, 28000, Chartres, France

^d Service de Santé et de Secours Médical, SDIS06, 06270, Villeneuve-Loubet, France

*Corresponding author. E-mail address: stephanie.briancon@univ-lyon1.fr. Postal address: LAGEP, 43 Bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France. Tel., Fax: +33 4 72 43 18 64 (S. Briançon).

Abstract

Organophosphorus compounds (OP), which mainly penetrate via the percutaneous pathway, represent a threat for both military and civilians. Body surface decontamination is vital to prevent victims poisoning. The development of a cost-effective formulation, which could be efficient and easy to handle in case of mass contamination, is therefore crucial. Metal oxides nanoparticles, due their large surface areas and the large amount of highly reactive sites, present high reactivity towards OP. First, this study aimed at evaluating the reaction of CeO₂ nanoparticles, synthesized by microwave path and calcined at 500 or 600°C, with Paraoxon (POX) in aqueous solution. Results showed that both nanoparticles degraded 60% to 70% of POX. CeO₂ calcined at 500°C, owing to its larger specific area, was the most effective. Moreover, the degradation was significantly increased under Ultra-Violet irradiation (initial degradation rate doubled). Then, skin decontamination was studied *in vitro* using the Franz cell method with pig-ear skin samples. CeO₂ powder and an aqueous suspension of CeO₂ (CeO₂-W) were applied 1 h after POX exposure. The efficiency of decontamination, including removal and/or degradation of POX, was compared to Fuller's earth (FE) and RSDL lotion which are, currently, the most efficient systems for skin decontamination. CeO₂-W and RSDL were the most efficient to remove POX from the skin surface and decrease skin absorption by 6.4 compared to the control not decontaminated. FE reduced significantly (twice) the absorbed fraction of POX, contrarily to CeO₂ powder. Considering only the degradation rate of POX, the products ranged in the order CeO₂ > RSDL > CeO₂-W > FE (no degradation). This study showed that CeO₂ nanoparticles are a promising material for skin decontamination of OP if formulated as a dispersion able to remove POX like CeO₂-W and to degrade it as CeO₂ powder.

Keywords: cerium oxide, paraoxon, skin decontamination, nanoparticle

- CeO₂ nanoparticles with photocatalytic activity were prepared by hydrothermal process.
- CeO₂ nanoparticles degrade POX in aqueous solution.
- CeO₂ powder is able to degrade POX on the skin surface.
- CeO₂ suspension removed efficiently POX from the skin.

1. Introduction

Despite the calls for complete destruction of Chemical Warfare Agent (CWA) stockpiles of signatory nations by 2007 (192 nations signatories), CWA still represent a threat for both military and civilians (Ghouta attack, Syria in 2013, Tokyo subway in 1995). Organophosphorus nerve agents (VX, sarin, tabun, soman) which are CWA and organophosphorus (OP) pesticides (as Paraoxon (POX) or demeton) mainly penetrate the body via the percutaneous pathway. All act in the same way by inhibiting an enzyme, the acetylcholinesterase, interfering with the normal process of neurotransmission. This leads to respiratory failure and death of the organism. For OP nerve agents, the first signs of intoxication appear 1–20 minutes after exposure [1] and the median lethal dose (LD_{50} *i.e.* the dose required to kill half the members of a tested population) vary from 0.01 mg/kg for VX to 0.27 mg/kg for tabun after dermal exposure in rats [2]. Toxicity of OP pesticides is lower than OP nerve agents ($LD_{50} = 4.3$ mg/kg in rats for POX [2]) and the clinical signs appear 12–24 h after exposure [1]. In order to limit the quantity of OP in the bloodstream and prevent victims poisoning, one possibility is to decontaminate the skin after the exposure to OP.

Most of the OP materials have low water-solubility. For example, VX and POX are soluble in water at 25°C for a concentration of 30 g/L and 2.4 g/L, respectively. This is why, high-volume water shower with or without surfactants is a standard decontamination procedure: OP compounds are solubilized, diluted and removed from the skin surface. However, the efficiency of this procedure may be limited by the ‘wash-in effect’ which could increase the systemic absorption [3, 4].

Different decontaminant systems are currently available for skin decontamination. Some systems act by adsorption and displacement of the toxic agent from the skin surface such as Fuller’s Earth (FE), zeolites [5][6]. Even household products such as flour and talc have been tested [7]. Other systems act by neutralization (chemical degradation) such as the Canadian Reactive Skin Decontaminant Lotion (RSDL), the kit IPB-80 ‘desprach’ and hypochlorite 0.5% [8, 9, 10, 11, 12].

In agreement with previous *in vitro* and *in vivo* studies, FE and RSDL are the most efficient systems for skin decontamination following a CWA exposure [9, 13, 14, 15]. However, both of these systems have some drawbacks. RSDL is a liquid composed of water, polyethylene glycol monomethyl ether (MPEG, 60–100%), Dekon 139 (10–30%) and a small amount of 2,3-butanedione monoxime (DAM, 0.58%) which has a potential systemic toxicity [16]. FE is a dusty agent of 10 μ m [17] with a large specific surface area that effectively adsorbs various CWA.

The development of another formulation, which could be efficient for the degradation of OP compounds and easy to use in case of mass contamination, is therefore crucial. Many studies talk about decontamination/degradation of CWA using metal oxide nanoparticles (NPs) as $Zr(OH)_4$ [18], Ge^{4+} doped TiO_2 [19], CuO and ZnO [20]. The first advantage of metal oxide nanoparticles is their high surface area, increasing the adsorption of CWA. This specific area is dependent of several parameters during the synthesis of the NPs: nature of the precursors, the presence of surfactant, the synthesis method (hydrothermal treatment, chemical coprecipitation...) and the temperature of the calcination [21, 22, 23]. The second advantage is the great amount of highly reactive sites available on the surface of metal oxides as their intrinsic vacancy defects, Lewis acid (metal cations), Lewis base (oxide anions) [24, 25, 26]. NPs act mostly by hydrolysis of CWA and lead to benign or less toxic compounds. To observe the reactivity of NPs towards CWA, most of experiments are conducted in liquid phase where the OP is diluted in a solvent and mixed with NPs. Thus, Wagner and co-workers [24] observed that MgO NPs convert VX into methylphosphonic acid (MPA) owing to hydroxyls groups and physi-sorbed water at the surface. In case of POX, which is a well-known surrogate for VX due to its similar physico-chemical properties ($\log P = 2.3$; MM = 275 g/mol), its catalysis with metal oxide NPs produced diethyl phosphate and p-nitrophenol (PNT) [27, 28] as shown in Fig. 2. In contrast to POX, PNT does not affect cholinesterase activity [29] and LD_{50} is significantly increased (1300 mg/kg in rats).

Cerium oxide (CeO_2) NPs are very promising NPs for skin decontamination. At first, they were used in biomedical applications [30] thanks to their ability to interact with phosphate ester bonds of biologically relevant molecules like ATP or DNA. Janos *et al.* [31] have demonstrated that CeO_2 is a reactive sorbent for the degradation of organophosphates such as parathion and chlorpyrifos in solvent media (heptane, acetonitrile) under ambient conditions. In their study, the authors prepared several cerium oxide NPs by calcination of cerium carbonate obtained by aqueous precipitation. They showed that the calcination temperature was the key parameter governing the degradation efficiency and a temperature of $500^\circ C$ was identified as optimum. Zenerino *et al.* [32] have shown that CeO_2 , synthesized using microwave pathway, grafted onto a fluorinated thickening polymer in a hydrophobically modified alkali-soluble emulsion (HASE-F) showed a high efficiency for skin protection against POX. Indeed, the permeation of POX through a silicon membrane, *in vitro*, was reduced twice with HASE-F/ CeO_2 compared to the non-grafted polymer. This difference is explained by the adsorption and degradation properties of CeO_2 in the polymer backbone.

The aim of the present study was to demonstrate that CeO_2 NPs, synthesized with the same protocol as Zenerino *et al.* [32] and which showed a good skin protection against penetration

of POX, had the capacity to degrade POX into PNT in aqueous media, which is the closest condition when it will be tested as a skin decontaminant. This new synthesis process, using microwaves during the aqueous precipitation, aimed at reducing the reaction time and enhancing the precipitation: the fast energy transfer directly to the reactants allows an instantaneous decomposition of nanocrystal precursors, creating highly supersaturated solutions.

In order to show that the temperature of calcination of powders has an impact on the efficacy of degradation, CeO₂ was calcined at two different temperatures: 500 and 600°C. Their physico-chemical properties were compared and linked to their abilities to degrade POX. First, the degradation was studied in liquid phase similar to other authors but we choose to use water as dispersing media. This type of aqueous environment is closer to the condition of skin application versus a classically used non-polar solvent. Furthermore, CeO₂ having a possible photocatalytic activity, we conducted the experimentation under ultra-violet irradiation or in the dark.

Then, we determined, *in vitro*, the efficacy of CeO₂ and a liquid form containing the NPs (thickening aqueous dispersions of CeO₂) for skin decontamination. We used the Franz cells diffusion method and a human skin model, pig-ear skins [33] after an exposure to POX. In accordance with previous studies [32, 34], the skin permeation of POX is relatively low. In order to observe significant differences between systems, the decontamination was realized 1 h after contamination. We preferred to proceed at a delayed-decontamination time rather than an emergency-decontamination time. FE and RSDL were the two systems of reference for skin decontamination using powders and liquid, respectively. Usually, the quantity of POX in skin samples are quantified using an enzymatic method already described by Millerioux *et al.* [34] and Loke *et al.* [35]. In this study, we used a HPLC-UV method for the quantification of POX and PNT through the skin. Thus, we were able to evaluate the capacity of decontaminants for the absorption and the degradation of POX.

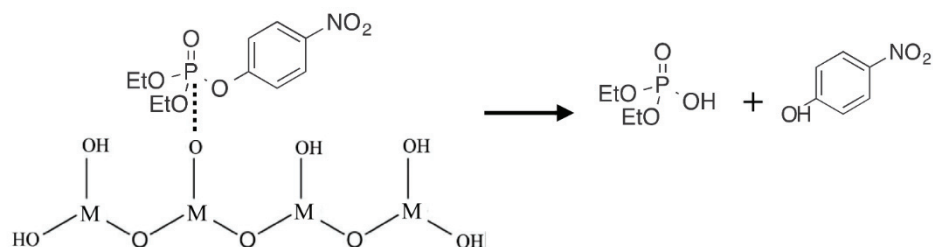


Fig. 1: Catalytic degradation of Paraoxon with a general metal oxide (MO) adapted from [27, 31]. Degradation products are: diethyl phosphate (left) and p-nitrophenol (PNT, right).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fuller's earth was supplied by NBC-Sys (St Chamond, France). POX (O,O-diethyl p-nitrophenyl phosphate), purity 90%, 1.27 g/mL density was purchased from Sigma Company (St Quentin Fallavier, France). Cerium ammonium nitrate ($\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, 99.5%) and sodium hydroxide NaOH (98%) were from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). P-nitrophenol (PNT), 99% purity was from Acros Organics Company (Geel, Belgium). Ethanol (96.3%) was obtained from Hexalab (Saint Fons, France). The receptor fluid was composed of Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS, pH=7.4, Gibco, Bleiswijk, Netherlands). Methanol and acetic acid glacial were obtained from Fisher Scientific (Leicestershire, United Kingdom). Guar gum was from Copper (Melun, France).

2.2. Synthesis of CeO_2 nanoparticles

The synthesis of CeO_2 nanoparticles assisted by hydrothermally treatment was described in a previous study [36]. Briefly, 0.5 mol/L cerium ammonium nitrate solution $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ was mixed with a 2 mol/L sodium hydroxide solution. The precipitation was carried out in a microwave digestion system (Multiwave-3000, Anton Paar) at 150°C for 15 min, and at the maximum pressure of 10 bars. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was recovered by centrifugation (4800 RPM for 5 min), washed three times with distilled water and dried at ambient temperature for overnight. The sample was then calcined at 500°C or 600°C in air for 2h. The powders were stored in glass bottles at room temperature and in the dark before use.

2.3. Formulation of the aqueous suspension of CeO_2 thickened

Aqueous suspension of CeO_2 was prepared at 10 wt% CeO_2 (CeO_2 -W). Therefore, the first step was the dispersion of 10% CeO_2 in deionized water using a magnetic stirrer (600 RPM) during 24h. In order to avoid nanoparticles sedimentation, 1 wt% of Guar gum was added in the aqueous suspension. The mixture was heated 30 minutes at 55°C under magnetic agitation and left to cool at ambient temperature. pH of CeO_2 -W is approximately 10.

2.4. Physicochemical characterization of FE and CeO₂ particles

Crystalline phase identification of the CeO₂ was performed by X-ray diffraction (X'Pert Pro, PAN alytical) with a Cu K α monochromatic radiation ($\lambda=0.1542$ nm). The average crystallite size was evaluated from the half-widths of diffraction peaks using Scherrer's formula.

Transmission Electron Microscopy (TEM) was performed with JEOL 2100 HT microscope operating at 200 kV acceleration at the 'Institut Lumière Matière' (ILM) at University of Lyon (Villeurbanne, France). Before observation, a droplet of CeO₂ dispersed in water was deposited on carbon grids. The carbon grids were then left dried for one day. Size distribution of CeO₂ was determined on 100 particles using TEM images.

The specific surface areas of CeO₂ were determined from nitrogen adsorption–desorption isotherms at liquid nitrogen temperature using an ASAP 2020 instrument (available at 'Laboratoire de Génie des Procédés Catalytiques' (LGPC), at University of Lyon (Villeurbanne, France)). The Brunauer–Emmett–Teller (BET) method was used for surface area calculation.

Size distribution of aggregates in CeO₂-W was measured by low-angle laser light scattering using a Malvern Mastersizer ® 2000 instrument. Particle size distributions were calculated according to Mie theory using the refractive index of water (1.33) and CeO₂ (1.55).

2.5. Degradation efficiency of nanoparticles

Reaction of CeO₂ with POX was first evaluated in aqueous suspension, in the dark or under a UV lamp (Suntest CPS+ (Atlas), Filter B, simulation of solar global radiation outdoors, 765 W/m²) at ambient temperature. For the experiment, 200 mg of CeO₂ was mixed with 2 mL of POX diluted in HBSS, resulting in 200 μ mol/L of POX. The degradation of POX was monitored during 5 h by measuring the concentration of the degradation product p-nitrophenol (PNT) by spectrophotometry (UV-1601 Shimadzu spectrophotometer), the main product of the POX degradation, which absorbs at 360 nm. Every 30 minutes for 5 h, the mixtures were centrifuged at 5000 RPM for 2 minutes. The absorbance of the supernatant was measured at 360 nm in order to quantify the PNT concentration. The calibration curve of PNT was linear in the concentration range of 10-500 μ mol/L. The supernatant was then replaced in its solution after each measure. The degradation of POX has been quantified by the appearance of PNT and was expressed as:

$$\% \text{ degradation of POX} = \frac{n_{\text{PNT}} \times 100}{n_{\text{POX}}}$$

Where:

n_{PNT} : number of moles of PNT which appear during the experiment

n_{POX} : initial number of moles of POX (0.4 μmoles)

A solution of 200 $\mu\text{mol/L}$ of POX diluted in HBSS was used as blank. Each experiment was conducted in triplicates.

2.6. *In vitro* skin decontamination efficacy

2.6.1. Preparation of skin membranes

Pig-ears were collected immediately after animals were killed. They were stored at -20°C for a maximum period of one year. On the day of the experiment, the pig-ears were thawed at room temperature and the skin samples were cut into 4.52 cm^2 circular pieces. Full-thickness unclipped skin was used. The thickness was measured with a micrometer (Mitutoyo). The thicknesses of pig-ear skin membranes were 1.1 ± 0.15 mm.

2.6.2. *In vitro* skin decontamination studies

The skin samples were mounted on Franz-type static glass diffusion cells. The cells were maintained at 36°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The skin samples were divided into groups of 8 biological replicates from 4 different donors. The membrane area available for diffusion was 2.54 cm^2 . After 30 minutes equilibration with the receptor fluid, the skin integrity was assessed by measuring the trans-epidermal water loss (Tewameter® TM210, Monaderm). In agreement with the OECD guidelines [37], only the skin samples with TEWL values ranging between 3 and 10 g/h/m were used in this work. This permeability is comparable to a fresh skin specimen [38]. The donor compartment remained open during the time of the experiment. Experiments were conducted under a fume hood (air extraction velocity: 0.5 m/s) at ambient temperature and with a relative humidity of $46 \pm 7\%$.

25.4 μL of POX were applied in the centre of the unclipped pig-ear skin surface. This resulted in an applied dose of $Q_0 = 46.6$ $\mu\text{mol/cm}^2$ (or 10 $\mu\text{L/cm}^2$). The decontamination was achieved after 1 h. 36 mg of powder (FE or CeO_2) or 260 μL of liquid solution (RSDL or $\text{CeO}_2\text{-W}$) were rubbed on the skin surface with a circular motion for 10 sec with a 1.5 $\text{cm} \times 1.5$ cm sponge (from the FE chemical decontamination glove in case of powders and from the RSDL package in case of liquid systems). For liquid systems, the product was allowed to stand on the skin for

2 min. Excess decontaminant was then removed with a second sponge and absorbent paper. The POX permeation study was then carried out for 24h, in order to determine the impact of the decontamination process. A skin sample without any decontamination was used as control.

2.6.3. Collection and treatment of samples

At the end of the experiment, the receptor fluid was collected (“receptor fluid RF”).

Then, skin samples were removed from the diffusion cells. The surface of skin samples was gently wiped 2 times with a piece of absorbent paper (Wypall, Kimberly Clark) in order to recover the fraction of POX remaining on the skin surface. The absorbent paper was then placed in 20 ml ethanol (“skin surface”).

The first strip was removed using D-Squame tape (Monaderm). The strip was placed in 10 mL ethanol (“first strip”).

In order to remove the stratum corneum, cyanoacrylate glue (Loctite SuperGlue-3, Henkel) were spread on a glass plate, according to the method of cyanoacrylate surface biopsies [39, 40]. After separation, the stratum corneum stuck on a glass plate was placed in 10 ml ethanol (“*stratum corneum*”).

The viable epidermis was separated from the dermis by heat treatment (45s in water at 60°C) [41]. The dermis was cut into small pieces and placed in 4 mL of ethanol (“dermis”). Viable epidermis was placed separately in 2 mL of ethanol (“viable epidermis”).

The extraction of POX and PNT were extracted overnight at room temperature.

After each extraction, aliquots of 1 mL were filtered on Nylon membrane disc filters (20 µm pore-size, 13 mm diameter) before HPLC quantification. Receptor fluid, skin surface and first strip fractions were previously diluted in 1/2, 1/100, 1/10 in ethanol, respectively.

2.6.4. Quantification of POX and PNT by HPLC-UV

Concentrations of POX and PNT were determined by liquid chromatography using the quaternary pump (Waters 600 Controller), auto sampler (model 717 plus Auto sampler), column heater (Waters temperature control module), and Photodiode array detector (Waters 2996). Operated at 40 °C, the column used was a XTerra MS C18 Cartridge column (5 µm, 4.6 mm x 250 mm). The composition of mobile phase was 65% of methanol (HPLC-grade, Fisher Scientific) and 35% of deionized water with 0.5% of acid acetic (acetic acid glacial and ultrapure analytical grade type 1 water, $r > 17 \text{ m}\Omega/\text{cm}$) (v/v). Total run time was 10 min at a flow rate of 0.7 mL/min. Injection volume was 10 µL. Compound identification was accomplished

by comparison of retention time (PNT has a retention time of 5.5 min and POX of 7.2 min) and UV absorption behavior (PNT was monitored at 314 nm and POX at 269 nm). Signal quantification was carried out in the peak height mode. Data collection and analysis were performed using Empower Pro software. Under the given conditions, the limits of detection were 420 and 750 pg for POX and PNT, respectively. The coefficients of variation of repeatability were 0.5 and 0.1 % for POX and PNT, respectively, at a concentration level 10 g/L.

For the quantification of PNT in skin samples, the initial POX product (90% purity) applied on the skin contains approximately 3% of PNT. The quantity of PNT coming from impurities was subtracted to the total quantity of PNT quantified by HPLC-UV for each skin.

2.6.5. Efficacy of a skin decontaminant

An effective skin decontamination product will be described as a decontaminant which: (i) decrease the quantity of contaminant absorbed into the skin (from the *stratum corneum* to receptor fluid), and/or (ii) has an ability to degrade the contaminant present on and into the skin. The non-absorbed fraction (sum of the quantities of POX present on the skin surface and in the first strip) is the fraction considered as removable from the skin. On the contrary, the absorbed fraction (*i.e.* sum of the quantities from the *stratum corneum* to receptor fluid) is the quantity of POX which potentially moves into the blood. This is why, for each decontamination experiment, the quantities of POX in the non-absorbed fraction and in the absorbed fraction have been compared.

The improvement factor of functional prognosis (FP) of each decontaminant system have been compared and calculated as follows:

$$FP = \frac{Q_{2T} + Q_{3T} + Q_{4T}}{Q_2 + Q_3 + Q_4}$$

Where:

Q_2 = the amount of POX present on the skin surface immediately after the decontamination process, Q_{2T} for control samples

Q_3 = the amount of POX in the skin (*i.e.* sum of the quantities in *stratum corneum*, viable epidermis and dermis) at the end of the experiment, Q_{3T} for control samples

Q_4 = the amount of POX resorbed (*i.e.* in RF) at the end of the experiment, Q_{4T} for control samples

The more FP increases, the more the functional prognosis is improved.

2.7. Data analysis

The amounts of POX and PNT were expressed as quantity per cm² piece of skin ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) recovered in the receptor fluid, skin surface, first strip, *stratum corneum*, viable epidermis, and dermis. The means of all data are indicated with their standard error of the mean (S.E.M., n=8 biological replicates).

Because the quantities of POX in each fraction (receptor fluid, skin surface, first strip, *stratum corneum*, viable epidermis, dermis, total, absorbed fraction and non-absorbed fraction) do not follow a normal distribution and variances were not equal, a non-parametric Mann-Whitney test ($p < 0.05$) was applied to check if decontaminant systems reduced significantly the POX fraction compared to the control.

3. Results

3.1. Characterization of the CeO₂ nanoparticles

In order to confirm that CeO₂ nanoparticles only contain the CeO₂ phase (no Ce₂O₃), NPs were characterized using XRD and TEM (Fig.2, Fig. 3). The specific area, indicating the absorption capacity, has also been determined.

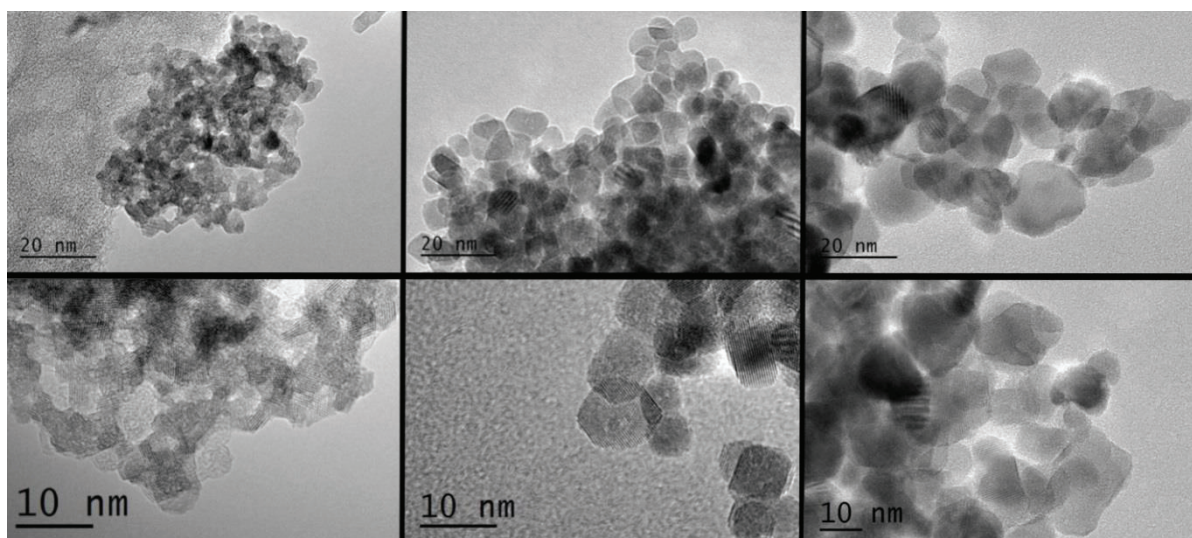


Fig. 2: TEM images for different calcined samples at two different resolutions: CeO₂ uncalcined (left); CeO₂ calcined 2h at 500°C (middle); (c) CeO₂ calcined 2h at 600°C (right).

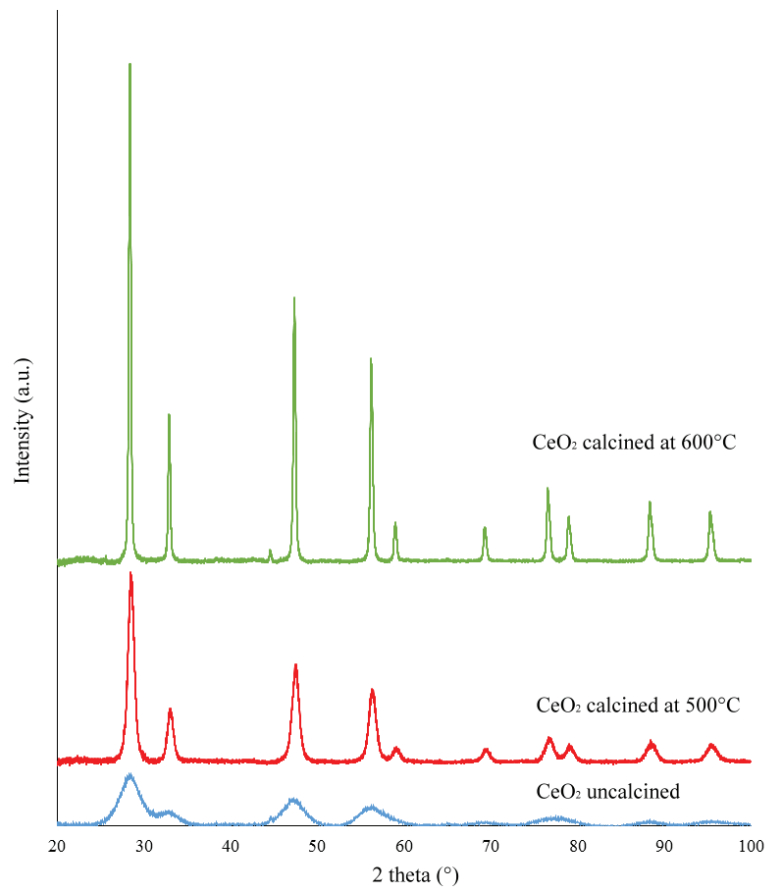


Fig. 3: XRD patterns of the CeO₂ uncalcined (blue), CeO₂ calcined at 500°C (red) and CeO₂ calcined at 600°C (green).

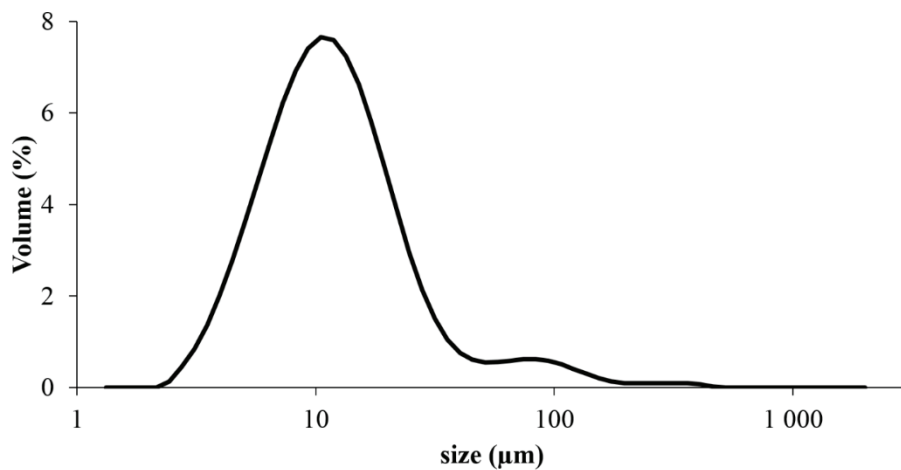


Fig. 4: Particle size distribution of CeO₂-W prepared with 10% CeO₂ calcined at 500°C and 1% of guar gum (93 vol% of particles smaller than 40 µm, D(50) = 10 µm)

Our hydrothermal method led to CeO₂ phase, identified by XRD spectra. CeO₂ uncalcined resulted in non-crystalline form: the peaks in the spectra of powders uncalcined were large and not well-defined (Fig. 3). The calcination allowed the crystallization of NPs with the apparition of narrow peaks and diffracting plane. CeO₂ calcined at 500°C has a low specific surface area (5.4 m²/g) even if the size of NPs is submicron, i.e. 9 nm. When the calcination temperature

increased, the crystallinity and size of the particles increased (19 nm for CeO₂ calcined at 600°C) which subsequently led to a decrease of the specific surface area (2.25 m²/g).

In order to disperse CeO₂, magnetic stirring of CeO₂ in water was performed during 24 h. A single population was observed for CeO₂-W with a mean size (D(50)) of approximately 10 μm (Fig.4) and showed the aggregation state of the NPs. These aggregates are made of nanoparticles. This phenomenon of agglomeration after calcination has already been described in several studies [22, 42]. As the authors, we observed that after calcination, there is a considerable grain coarsening and the formation of agglomerates, hard to redisperse.

3.2. Degradation efficiency of CeO₂ nanoparticles

Fig. 5 shows the degradation of POX using CeO₂ calcined at 500°C and 600°C for 5 h in the dark or under UV irradiation.

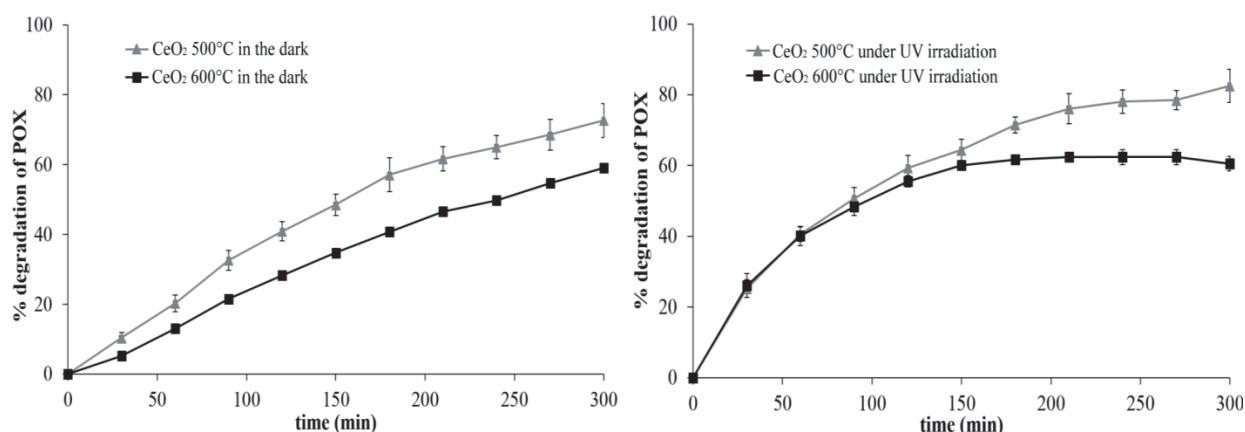


Fig. 5: Percentage of degradation of POX (0.02mmol/L diluted in HBSS) mixed with 200 mg of CeO₂ calcined at 500°C for 5 h in the dark (left), under UV irradiation (765 W/m²) (right).

This *in vitro* method allows testing quickly the degradation capacity of NPs against POX in aqueous phase at ambient temperature. In the dark, the degradation of POX, estimated by the appearance of the degradation product (PNT) was quite linear for both CeO₂ NPs. After 5 h of contact, the degradation of POX reached a maximum of 70% and 60% for CeO₂ calcined at 500°C and 600°C, respectively (Fig. 5 left).

The photocatalytic activity of CeO₂ has already been described in several studies [43, 44, 45]. This is the reason why the degradation of POX has also been studied under UV irradiation. The degradation of POX was improved and especially the rate of degradation was significantly increased the first hours. The degradation rates reached 40% after 1 h for both nanoparticles ((Fig. 5 right) whereas it was only 10 and 20% at the same time in the dark for CeO₂ calcined at 600°C and 500°C, respectively. These results confirmed the photocatalytic properties of

CeO₂ NPs. For CeO₂ calcined at 600 °C, the degradation reached a maximum of 60% after 150 min under UV irradiation and it did not increase later.

In both experimental conditions, CeO₂ calcined at 500°C showed a better efficiency for the degradation of POX so it was used for *in vitro* skin decontamination studies.

3.3. *In vitro* skin decontamination efficacy

Table 1 and Fig. 6 show the amount of POX quantified in each skin compartment. The quantity (μmol/cm²) recovered in each compartment for the different formulations can be compared and linked to the reduction of POX. Skin decontamination with all the formulated products significantly reduced the amount of POX and particularly in the “skin surface” fraction compared to the control skin.

Similarly, Fig. 7 shows the quantities of PNT produced. The quantity of PNT produced reflects the degradation activity of each decontaminant system.

3.3.1. *In vitro* distribution of POX - control

The skin distribution of POX is shown in Fig. 6 and Table 1. After a 24-h skin exposure, POX remained mostly on the skin surface (44.6 μmol/cm² or 95± 7% of the applied dose) and only 0.2% reached the RF. Therefore, POX has a very low skin penetration. Due to its lipophilic properties, the fraction of POX was more important in the *stratum corneum* (hydrophobic layer) (0.97 μmol/cm²) than in the viable epidermis (0.07 μmol/cm²) and dermis (0.61 μmol/cm²) which are hydrophilic. The absorbed fraction *ie* the quantity of POX recovered in the *stratum corneum*, viable epidermis, dermis and receptor fluid was less than 3.7% of the applied dose.

3.3.2. Skin decontamination with powders

Thanks to the adsorption of the contaminant from the skin surface, raw particles significantly reduced the quantity of POX on the skin surface (from 44.6 μmol/cm² for the control to 4.62 μmol/cm² and 0.94 μmol/cm² using FE and CeO₂ as skin decontaminant, respectively). They also significantly reduced the total quantity by at least 8 times for FE and 13 times for CeO₂ compared to the control and, in the same way, the non-absorbed fraction of POX.

FE decreased significantly the quantity of POX in the dermis compartment from 0.61 to 0.16 μmol/cm² and in the viable epidermis from 0.07 to 0.02 μmol/cm². On the other head, both

powders increased significantly the passage of POX in the receptor fluid compared to control (two or three-fold increase).

As shown with the apparition of PNT in the fractions (Fig. 7), CeO₂ degraded POX on and/or into the skin. FP of FE (FP=14) was higher than CeO₂ (FP=9) but no degradation of POX was observed for FE which confirmed that FE has only a physical adsorption effect.

3.3.3. Skin decontamination with liquids

The liquid formulations (RSDL and CeO₂-W) were more efficient for the elimination of POX on and into the skin than powders. These formulations reduced significantly the fraction of POX quantified in all the compartments except in the receptor fluid.

RSDL was the more efficient product (FP = 127). Moreover, RSDL was able to degrade POX into PNT at a rate of 58% for 24 h of experiment. The CeO₂-W (FP =93) was more efficient than CeO₂ in the form of powder (FP 10 times higher). However, its degradation activity has been drastically reduced (production of 0.09 μmol/cm² of PNT for CeO₂-W vs 0.57 μmol/cm² for CeO₂ raw particles) (Fig. 7).

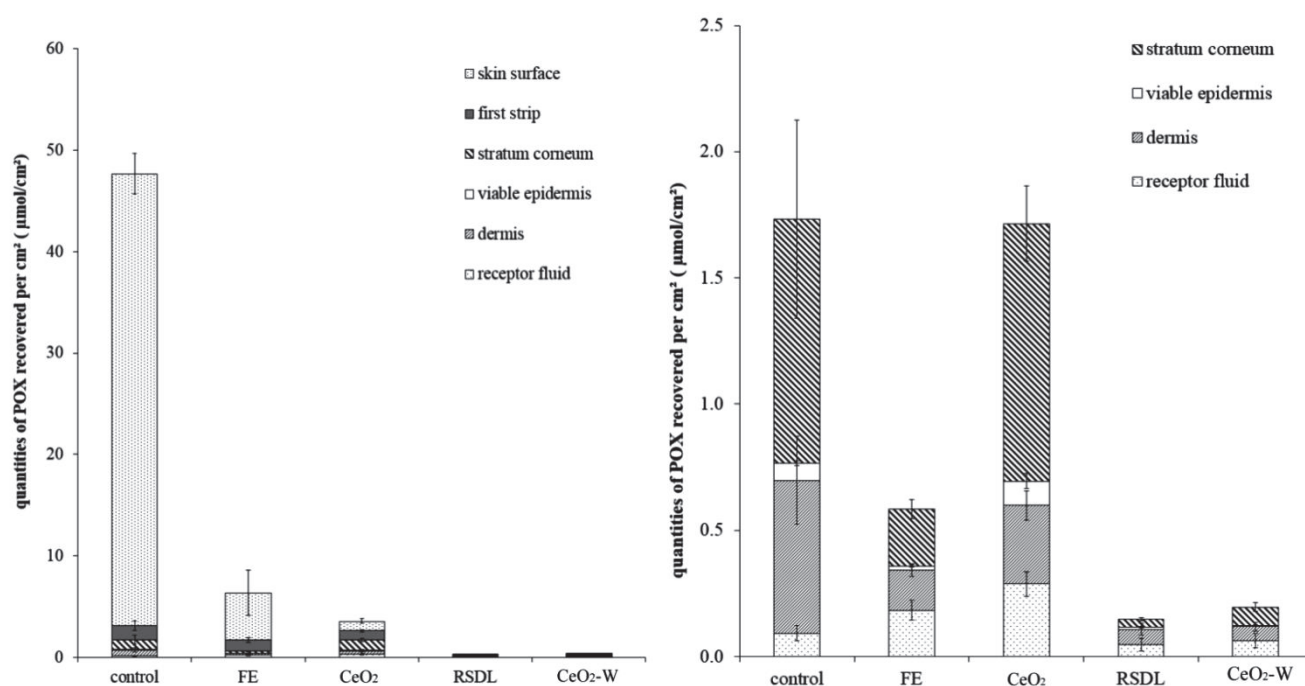


Fig. 6 : Total (left) and skin (right) distribution of POX through pig-ear full thickness unclipped skin 24h after an exposure to POX ($Q_0 = 46.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) with a decontamination at $t=1$ h using FE, CeO₂, RSDL and CeO₂-W. Results are expressed as quantities (μmol) of POX recovered per cm² piece of skin (means ± S.E.M, n=8)

Table 1: *In vitro* distribution of POX through pig-ear full thickness unclipped skin 24 h after an exposure to POX ($Q_0 = 46.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) with a decontamination at $t=1$ h using FE, CeO_2 , RSDL and $\text{CeO}_2\text{-W}$. Results are expressed as quantities (μmol) of POX recovered per cm^2 piece of skin or as percentage of applied dose Q_0 (means \pm S.E.M, $n=8$) (* significant difference with control, Mann-Whitney test, $p<0.05$)

	control	FE	CeO_2	RSDL	$\text{CeO}_2\text{-W}$
skin surface	44.60 ± 2.03	$4.62^* \pm 2.23$	$0.94^* \pm 0.23$	$0.02^* \pm 0.01$	$0.04^* \pm 0.1$
first strip	1.36 ± 0.45	1.11 ± 0.25	0.88 ± 0.10	$0.07^* \pm 0.03$	$0.10^* \pm 0.03$
<i>stratum corneum</i>	0.97 ± 0.39	0.22 ± 0.04	1.02 ± 0.15	$0.03^* \pm 0.01$	$0.07^* \pm 0.02$
viable epidermis	0.07 ± 0.01	$0.02^* \pm 0.00$	0.10 ± 0.03	$0.01^* \pm 0.00$	$0.01^* \pm 0.00$
dermis	0.61 ± 0.17	$0.16^* \pm 0.02$	$0.31^* \pm 0.06$	$0.06^* \pm 0.02$	$0.06^* \pm 0.02$
receptor fluid	0.09 ± 0.03	$0.18^* \pm 0.04$	$0.29^* \pm 0.05$	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03
Total	47.69 ± 0.34 (102.3 % Q_0)	$6.31^* \pm 2.29$ (13.5 % Q_0)	$3.54^* \pm 0.37$ (7.6 % Q_0)	$0.24^* \pm 0.07$ (0.5 % Q_0)	$0.33^* \pm 0.07$ (0.7 % Q_0)
Non absorbed fraction	45.96 ± 1.56 (98.6 % Q_0)	$5.73^* \pm 2.31$ (12.3 % Q_0)	$1.82^* \pm 0.24$ (3.9 % Q_0)	$0.09^* \pm 0.04$ (0.2 % Q_0)	$0.14^* \pm 0.04$ (0.3 % Q_0)
Absorbed fraction	1.74 ± 0.55 (3.7 % Q_0)	$0.58^* \pm 0.08$ (1.2 % Q_0)	1.71 ± 0.22 (3.7 % Q_0)	$0.14^* \pm 0.04$ (0.3 % Q_0)	$0.19^* \pm 0.05$ (0.4 % Q_0)
FP	1	14.3	9.4	127.1	93.1

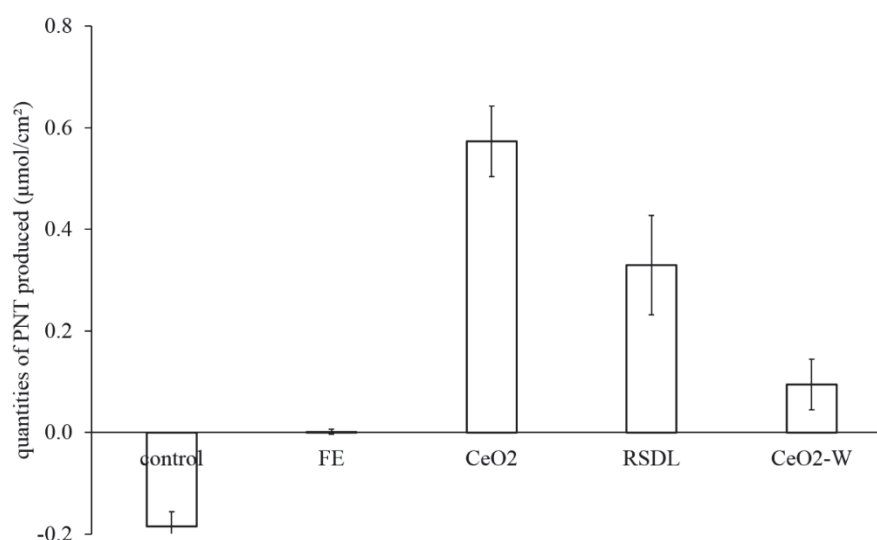


Fig. 7: *In vitro* production of PNT through pig-ear full thickness unclipped skin 24h after an exposure to POX ($Q_0 = 46.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) with a decontamination at $t=1$ h using FE, CeO_2 , RSDL and $\text{CeO}_2\text{-W}$. Results are expressed as means \pm S.E.M ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$), $n=8$.

4. Discussion

4.1. Synthesis of CeO₂ NPs

The present study aimed at using for the first time the reactive sorbent CeO₂ and a liquid formulation containing CeO₂ for skin decontamination after a CWA exposure. The main methods described in the literature to prepare CeO₂ NPs are precipitation [22, 31], sol-gel and hydrothermal [23, 42]. The synthesis can be made from several precursors Ce(III) or Ce(IV) nitrate, and the precipitation with ammonium hydroxide, hydrogen peroxide, NaOH, with or without the presence of surfactant. It results in multiple shape, size and crystallinity of NPs. In order to avoid agglomeration, some synthesis are made with surfactant [42]. The hydrothermal method was chosen for the gain in time and efficacy for the production of CeO₂. We decided to avoid the utilization of surfactant in order to release the reactive surface of cerium oxide. After synthesis, a step of calcination allows the crystallization of particles, their increasing size but can also promote agglomeration [22, 31]. These aggregates with a mean size of 10 µm were also observed in our study.

Our hydrothermal synthesis led to CeO₂ with high crystallinity but very low specific area (<10 m²/g) for NPs (size <20 nm) certainly due to the high aggregation state. Depending of multiple parameters during the synthesis, the specific surface area found in the literature is highly variable. Janos *et al.* [31] obtained cerium oxide after a calcination à 500°C with a crystallite size of 15 nm and a larger specific area (100m²/g). On the other hand, Wu *et al.* [46] synthesized CeO₂ nano-octahedra (heated at 170°C for 10 h) with a size of 120 nm and a specific surface area of 13 m²/g. It appears from the literature that calcination is a crucial step. The conditions of this thermal treatment (not only temperature but also atmospheric conditions and impurities) greatly influence the surface properties of the NPs which are not always reproducible.

4.2. Degradation of POX using CeO₂

The *in vitro* test was developed in order to screen rapidly several metal oxide NPs, based on their ability to degrade POX into PNT. The most effective particles may be used for *in vitro* skin decontamination experiment. The test is conducted with a large excess of NPs compared to POX (§ 3.2, 2 µmole de POX per gram of CeO₂). This condition (quantity of POX per gram of CeO₂) is different to the real case and the application of a decontamination procedure. However, this method enables to quickly select the most effective NPs for degradation of POX.

As we already demonstrated, CeO₂ calcined 2 h at 500°C was more effective than NPs calcined at 600°C for decomposing POX into PNT. This observation can be explained by the lower specific area of NPs calcined at 600°C. Several authors used NPs with high specific area in order to increase CWA adsorption efficacy [19, 25, 47, 48, 49]. Janos *et al.* [31] correlated physicochemical characteristics of CeO₂ calcined at different temperatures, from 200 to 1000°C, with the percentage of parathion degradation. Our results are in accordance with their observations. CeO₂ calcined at 500°C had the best degradation efficacy. The explanation of authors is that CeO₂ calcined at 500°C is a trade-off between a large specific surface area and a maximum number of crystal defects (related to the reactive sites). Parathion, diluted in heptane, disappeared almost completely in less than 0.5 min. The comparison of the degradation kinetic of CWA between multiple studies is complex due to variation in experimental conditions and especially the nature of solvents used. Indeed, even if the role of solvent is not fully understood, the kinetic of degradation was found to be dependent of the solvent [31, 50]. For example, the rate of sulfur mustard degradation by TiO₂ decreased in the following order: nonane > xylene > butyl acetate > ethanol [50]. In our case, solvent as heptane or nonane cannot be used: the kinetic of degradation will not be realistic compared to the real environment during the *in vitro* skin decontamination experiment.

Other studies also correlated characteristic of NPs with the degradation efficiency of CWA. Štengl *et al.* [19] found that an ideal pore volume of TiO₂ doped Ge⁴⁺ for the performance of VX removal was around 0.4 cm³g⁻¹. This ability to absorb VX decreased for NPs with a smaller or a larger pore volume. Acid and base sites, surface hydroxyl groups can also enhanced the reactive properties towards CWAs and help for decontamination. Indeed, O atoms in the pesticide molecule can possibly interact with Lewis acid sites of nanoparticles [49].

Some studies have focused on photocatalytic degradation of CEES (a simulant of HD) using TiO₂ NPs [51]. However, CeO₂ has never been used for the degradation of environmental pollutants or CWA in the presence of light solar UV light. Even if the degradation already occurs in the dark, the degradation of POX with our CeO₂ was improved under ultra violet irradiation showing the photocatalytic activity.

4.3. *In vitro* skin distribution of POX

POX is a lipophilic molecule as revealed by its midrange octanol/water partition coefficient, logP = 1.95, and its molar mass is 275 g/mol. It has been demonstrated that chemicals with a molar mass lower than 500 g/mol and with logP value ranging between -1 and 3 rapidly dissolve into cutaneous lipids and permeate through the stratum corneum [3, 52, 53]. Consequently,

POX can be expected to be absorbed quickly into the skin. However, POX was found to be mainly on the skin surface and only 3.7% has been absorbed through the skin. It has already been reported that VX, which has similar physico-chemical characteristics to POX (MM = 267 g/mol, log P = 0.7), penetrated faster and earlier (lower lag time) than POX through pig-ear skin [54]. Experimental conditions for skin penetration studies are often variable and it is difficult to compare with other studies because all the parameters are not identical (skin nature and thickness, skin surface, exposure time...). Skin penetration studies of POX using Franz cell diffusion are always performed under other conditions. A previous study [55] examined the permeation of POX through a split-thickness pig ear skin. The conditions were not exactly the same than ours: the thickness of the skin samples was $530 \pm 5 \mu\text{m}$, the applied dose of POX was $5 \text{mg}/\text{cm}^2$, the membrane area available for diffusion was 1.13 cm^2 . The authors used the enzymatic method for the quantification of POX on the skin surface, in the skin and the receptor fluid. Still, the results are similar to ours. After a 24h of POX skin exposure, $95 \pm 8\%$ was recovered on the membrane surface, $0.20 \pm 0.20\%$ of Q_0 was quantified in receptor fluid and $0.26 \pm 0.20\%$ in the skin.

4.4. Skin decontamination with powders

The problem of powders is the difficulty to be removed from the skin surface after the decontamination process. It explains the lower efficiency of powders (FP < 15) which last longer on the skin compared to liquid formulations (PF > 90). During the experiment, two concomitant mechanisms occur: the adsorption of the contaminant on the surface of NPs and its simultaneous degradation. Adsorption is an immediate mechanism which occurs during the skin decontamination process. As already mentioned, adsorption is mainly dependent of the surface area of particles. Higher particle surface area leads to higher OP molecules adsorption and consequently to a better elimination from the skin surface by wiping. FE is an adsorbing powder with a large specific surface area ($180 \text{ m}^2/\text{g}$) and selectivity for lipophilic molecules (as POX) contrary to CeO_2 which has a low specific surface area equal to $5.4 \text{ m}^2/\text{g}$ (36 times lower than FE). Therefore the adsorption of POX is enhanced using FE leading to a significant decrease of the skin absorption of POX in viable skin at the end of the experiment compared to the control ($0.36 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ versus $0.77 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ for the control). POX was not efficiently absorbed by CeO_2 which forms agglomerates. It explains why similar amounts of POX are recovered in the absorbed fraction when decontamination with CeO_2 NPs was applied compared to the control ($1.74 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ for the control to $1.71 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ using CeO_2).

Surprisingly, powders increased the permeation rate of POX through the skin compared to liquid form. It has been already shown that the size of the particles is the most relevant factor for their skin permeation. This permeation of NPs could promote the passage of POX, adsorbed on the surface of NPs, through pig-ear skin. The penetration of NPs is dependent of several parameters as the aggregation state of particles, charge and size of nanoparticles [56]. CeO₂ is made of elementary particles of 10 nm highly aggregated, compared to FE which is made of particles of 10 μm [17]. NPs with a size smaller than 4 nm can pass through the *stratum corneum* by diffusion [56]. NPs size between 4 and 20 nm can potentially permeate. If the particle diameter exceeds 21 nm, as FE or CeO₂ aggregates, it will remains on the surface of the skin. Bennett *et al.* [57] demonstrate that the penetration of TiO₂ previously disaggregated in a solution through pig skin *in vitro* is higher than the NPs aggregated (powdered). Following this observation, CeO₂-W would have increase the passage of POX in the RF compared to CeO₂ powdered, which was not the case.

Another explanation may be that massage with the sponge could stimulate the percutaneous penetration of POX through the skin, as also observed by Lademann *et al.* [58]. Considering that it remained more POX on the skin surface decontaminated with powders than on a skin decontaminated with liquid systems. This penetration could be even more important.

After the decontamination process, the main factor is the catalytic degradation of POX. The advantage of cerium oxide is its capacity to degrade POX. We observe the apparition of PNT through the different layers of the skin compared to the control, where no PNT was found. After the skin decontamination process, CeO₂ NPs remained on the skin surface and converted 15% of POX that was not removed after the decontamination.

4.5. Skin decontamination with liquids

The most effective products for skin decontamination were the liquids forms. When liquids are applied on the skin, it favors rinsing and a better extraction of molecules. RSDL contains MPEG which imparts hydrophobic properties to the product. It allows displacing, retaining and removing POX from the skin surface. The importance of the polarity of the decontamination product has been demonstrated with Hui and co-workers [59]. Their study has demonstrated that corn oil and a polyglycol based cleaner were more effective than water or a solution of soap in water in limiting the transfer into the skin of methylene bisphenyl isocyanate, a very lipophilic compound. Another key component of RSDL is the active ingredient (Dekon 139) which rapidly neutralizes the vesicant chemical or the OP nerve agent. Explanation of the degradation mechanism exerted by RSDL remains undescribed in the literature. However, we

demonstrated that Dekon 139 has a degrading activity. The disadvantage associated with RSDL is that it leaves an oily residue on the skin and can make soldiers uncomfortable while carrying out certain military activities. On the other hand, if RSDL leaves a residue, Dekon 139 must certainly remain on the skin surface and exert its effect over exposure time. The last compound of RSDL, DAM, works on the intoxication by dephosphorylating acetylcholinesterase poisoned with OP.

Using a hydrophilic system for the dispersion of CeO₂ did not help the removal of hydrophobic POX from the skin surface. The use of a thickener to avoid the sedimentation of NPs had two drawbacks: (i) after the skin decontamination process, the NPs are conveyed in the suspension and none remained on the skin surface for degrading the organophosphorus compounds, (ii) guar gum does not prevent the accessibility to NPs for the degradation of pesticide. Moreover, the short contact between CeO₂ and POX is not long enough to initiate the degradation of POX. Thus, CeO₂ did not play any part in POX degradation and explain the disappearance of the degradation activity compared to the powder form.

The aqueous dispersion of CeO₂ increased the absorbed quantity of POX compared to RSDL. This may be explained by the fact that water is an absorption enhancer. Indeed, it has been found that lipid-soluble compounds, which have a high affinity for the *stratum corneum*, penetrate the skin less than hydrophilic ones [60]. In general, increase tissue hydration increase transdermal delivery of both hydrophilic and lipophilic compounds [61]. This mechanism is not clearly described in the literature but water could alter the solubility of the permeant in the *stratum corneum* and could modify the permeation of the chemical through the skin. Misik *et al.* [62] have demonstrated that higher permeation rates of POX were observed under wet skin condition rather than in dry condition.

Conclusion

CeO₂ NPs synthesized by hydrothermal pathway and calcined at 500 °C is a promising material for the degradation of POX. This degradation occurs in the dark but is also improved under ultra-violet irradiation. We showed that the choice of the matrix containing the active agent is important for skin decontamination. Aqueous dispersion of CeO₂ reduced significantly the quantity of POX absorbed through the skin. Moreover, it is easy to use in case of mass contamination compared to the powder form. However, only low degradation activity was observed for CeO₂-W compared to powder form. The development of a new galenic form containing cerium oxide NPs and an adapted decontamination protocol is required.

We also aim at developing a product with broad spectrum reactivity. The CeO₂ synthesized has to be tested on other OP compounds or blistering agents.

Acknowledgments

We thank Direction Générale de l'Armement (DGA) for their financial support. Dr. David Amans from ILM and Ms. Stéphanie Pallier from LGPC are thanked for TEM observations and measurements of specific areas.

References

- [1] Rousseau, J., Rüttimann, M., Brinquin, L., 2000. Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 19, 588–598.
- [2] Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., Kuca, K., 2015. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 38, 32–36.
- [3] Klinger, T., 2007. Fundamentals of percutaneous chemical absorption and decontamination. *J. Chem. Health Saf.* 11-15.
- [4] Moody, R., Maibach, H., 2006. Skin decontamination: importance of the wash-in effect. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1783-1788.
- [5] Vucemilović, A., Hadzija, M., Jukić, I., 2008. Efficacy of mineral cationic carrier against sulphur mustard in skin decontamination. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 59, 289-293.
- [6] Vucemilović, A., Hadzija, M., Jukić, I., 2009. Skin decontamination with mineral cationic carrier against sarin determined *in vivo*. *Arh Hig Rada Toksikol.* 60, 173-177.
- [7] Van Hooidonk, C., Ceulen, B., Bock, J., Van Genderen, J., 1983. CW agents and the skin. penetration and decontamination. *Proc. Int. Symp. Protection Against Chemical Warfare Agents.*
- [8] Bannard, R., Casselman, A., Purdon, J., 1991. Metal oximate/polyethylene glycols chemicals decontaminant system. US patent US5071877.
- [9] Chilcott, R.P., Jenner, J., Hotchkiss, S.A., Rice, P., 2001. *In vitro* skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J. Appl. Toxicol.* 21, 279-283.
- [10] Gold, M.B., Bongiovanni, R., Scharf, B.A., Gresham, V.C., Woodward, C.L., 1994. Hypochlorite solution as a decontaminant in sulfur mustard contaminated skin defects in the euthymic hairless guinea pig. *Drug Chem. Toxicol.* 17, 499-527.
- [11] Matousek, J., 1998. Sorption-mechanical principle in skin decontamination. *Nbc risks. Current capabilities and future perspectives for protection.* Sohns, T., Voicu, V.A. (Ed.). 265-268.
- [12] Sawyer, T.W., Parker, D., Thomas, N., Tracy Weiss, M., Bide, R.W., 1991. Efficacy of an oximate-based skin decontaminant against organophosphate nerve agents determined *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology.* 67, 267–277.
- [13] Bjarnason, S., Mikler, J., Hill, I., Tenn, C., Garrett, M., Caddy, N., Sawyer, T.W., 2008. Comparison of selected skin decontaminant products and regimens against VX in domestic swine. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 253-261.
- [14] Braue, E.H., Smith, K.H., Doxzon, B.F., Lumpkin, H.L., Clarkson, E.D., 2011. Efficacy studies of reactive skin decontamination lotion, m291 skin decontamination kit, 0.5% bleach, 1% soapy water, and skin exposure reduction paste against chemical warfare agents, part 1: guinea pigs challenged with VX. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 30, 15-28.

- [15] Taysse, L., Dorandeu, F., Daulon, S., Foquin, A., Perrier, N., Lallement, G., Breton, P., 2010. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the skh-1 hairless mouse. (ii) effects of some currently used skin decontaminants (rsdl and fuller's earth) against liquid sulphur mustard and vx exposures. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 491-498.
- [16] Jager, B.V., Stagg, G.N., 1958. Toxicity of diacetyl monoxime and of pyridine-2-aldoxime methiodide in man. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 102, 203-211.
- [17] Oubagaranadin, J.U.K., Sathyamurthy, N., Murthy, Z.V.P., 2007. Evaluation of Fuller's earth for the adsorption of mercury from aqueous solutions: A comparative study with activated carbon. *J. of Haz. Mat.* 142, 165–174.
- [18] Badosz, T.J., Laskoski, M., Mahle, J., Mogilevsky, G., Peterson, G.W, Rossin, J.A., Wagner, G.W., 2012. Reactions of VX, GD, and HD with Zr(OH)₄: Near Instantaneous Decontamination of VX. *J. Phys. Chem. C.* 113, 11606-11614.
- [19] Štengl, V., Matys Grygar, T., Opluštil, F., Němec, T., 2012. Ge⁴⁺ doped TiO₂ for stoichiometric degradation of warfare agents. *J. of Haz. Mat.* 227–228, 62–67.
- [20] Praveen Kumar, J., Prasad, G.K., Ramacharyulu, P.V.R.K., Garg, P., Ganesan, K., 2013. Mesoporous CuO-ZnO binary metal oxide nanocomposite for decontamination of sulfur mustard. *Mater. Chem. Phys.* 142, 484-490.
- [21] Li, M., Liu, Z., Hub, Y., Shi, Z., Li, H., 2007. Effects of the synthesis methods on the physicochemical properties of cerium dioxide powder. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 301, 153–157.
- [22] Djuriclic, B. & Pickering, S., 1999. Nanostructured Cerium Oxide: Preparation and Properties of Weakly-agglomerated Powders. *J. Eur. Ceram. Soc.* 19, 1925-1934.
- [23] Masui, T., Hirai, H., Imanaka, N., Adachi, G., 2002. Synthesis of cerium oxide nanoparticles by hydrothermal crystallization with citric acid *J. Mater. Sci. Lett.* 21, 489-491.
- [24] Wagner, G.W., Bartram, P.W., Koper, O., Klabunde, K.J, 1999. Reactions of VX, GD and HD. *J Phys Chem B.* 103, 3325-3228.
- [25] Saxena, A., Srivastava, A. K., Singh, B., Goyal, A., 2012. Removal of sulphur mustard, sarin and simulants on impregnated silica nanoparticles. *J. of Haz. Mat.* 211– 212, 226– 232.
- [26] Sharma, N. & Kakkar, R., 2013. Recent advancements on warfare agents/metal oxides surface chemistry and their simulation study, *Advanced Materials Letters.* 4(7), 508–521.
- [27] Kennedy, D.J., Mayer, B.P., Baker, S.E., Valdez, C.A., 2015. Kinetics and speciation of paraoxon hydrolysis by zinc(II)–azamacrocyclic catalysts. *Inorganica Chimica Acta.* 436, 123–131.
- [28] Savio, A.K.P.D., Fletcher, J., Smith, K., Iyer, R., Bao, J.M., Robles Hernández, F.C., 2016. Environmentally effective photocatalyst CoO–TiO₂ synthesized by thermal precipitation of Co in amorphous TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental.* 182, 449–455.
- [29] Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., Chovelon, J.-M., 2002. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. *Analytica Chimica Acta.* 459, 33–41.
- [30] Ivanov, V. K., Shcherbakov, A. B., Usatenko, A. V., 2009. Structuresensitive properties and biomedical applications of nanodispersed cerium dioxide. *Russ. Chem. Rev.* 78(9), 855.
- [31] Janos, P., Kuran, P., Kormunda, M., Stengl, V., Grygar, T. M., Dosek, M., Stastny, M., Ederer, J., Pilarova, V., Vrtoch, L., 2014. Cerium dioxide as a new reactive sorbent for fast degradation of parathion methyl and some other organophosphates. *J. of Rare Earths.* 32 (4), 360-369.
- [32] Zenerino, A., Boutard, T., Bignon, C., Amigoni, S., Josse, D., Devers, T., Guittard, F., 2015. New CeO₂ nanoparticles-based topical formulations for the skin protection against organophosphates. *Tox. Reports.* 2, 1007-1013.
- [33] Rolland, P., Bolzinger, M.A., Cruz, C., Briançon, S., Josse, D., 2011. Human scalp permeability to the chemical warfare agent VX. *Toxicol. In Vitro.* 25, 1974-1980.

- [34] Millerioux, J., Cruz, C., Bazire, A., Polly, V., Lallement, G., Lefevre, L., Josse, D., 2009a. Evaluation of *in vitro* tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicology in Vitro*. 23, 127–133.
- [35] Loke, W.K., Karlsson, B., Waara, L., Göransson Nyberg, A., Cassel, G.E., 1998. Enzyme based microassay for accurate determination of soman in blood samples. *Analytical Biochemistry*. 257, 12–19.
- [36] Boutard, T., Rousseau, B., Couteau, C., Tomasoni, C., Simonnard, C., Jacquot, C., Coiffard, L.J.M., Konstantinov, K., Devers, T., Roussakis, C., 2013. Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO₂. *Mater. Lett.* 108, 13–16.
- [37] OECD. Organisation for economic co-operation and development. Guideline for the testing of chemicals. skin absorption: *in vitro* method. OECD, Paris (2004).
- [38] Dennerlein, K., Schneider, D., Göen, T., Drexler, H., Korinth, G., 2012. Impact of storage conditions for excised human skin on percutaneous penetration of chemicals. 13^e Congrès PPP. La Grande Motte, France.
- [39] Förster, M., Bolzinger, M.A., Rovere, M.R., Damour, O., Montagnac, G., Briçon, S., 2011. Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods. *Skin Pharmacol. Physiol.* 24, 103-112.
- [40] Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., Lademann, J., 2004. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J. Invest. Dermatol.* 122, 14-19.
- [41] SCCS/1358/10. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, adopted by SCCS during the 7th plenary meeting of 22 June 2010.
- [42] Tok, A.I.Y., Boey, F.Y.C., Dong, Z., Sun, X.L., 2007. Hydrothermal synthesis of CeO₂ nano-particles. *J. of Mat. Process. Tech.* 190, 217–222.
- [43] Ji, P., Zhang, J., Chen, F., Anpo, M., 2009. Study of adsorption and degradation of acid orange 7 on the surface of CeO₂ under visible light irradiation. *Appl. Catal., B : Env.* (3–4), 148-154.
- [44] Khan, S. B., Faisal M., Rahman, M. M., Jamal, A., 2011. Exploration of CeO₂ nanoparticles as a chemi-sensor and photo-catalyst for environmental applications. *Sc. of the Total Env.* 409 (15), 2987-2992.
- [45] Huang, C., Wun, X., Ren, W., Shi, P., 2015. Preparation of CeO₂ micro/nanostructure and their photocatalytic properties in glow discharge electrolysis. *Ceram. Int.* 41, 47–50.
- [46] Wu, Z., Li, M., Howe, J., Meyer, H.M., Overbury, S.H., 2010. Probing Defect Sites on CeO₂ Nanocrystals with Well-Defined Surface Planes by Raman Spectroscopy and O₂ Adsorption. *Langmuir.* 26, 16595–16606.
- [47] Verma, M., Kumar Gupta, V., Dave, V., Chandra, R., Prasad, G.K., 2015. Synthesis of sputter deposited CuO nanoparticles and their use for decontamination of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES). *J. Colloid Interface Sci.* 438, 102–109.
- [48] Singh, V. V., Nigam, A. K., Boopathi, M., Pandey, P., Singh, B., Vijayaraghavan, R., 2012. In situ electrochemical sensing of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) a CWA simulant using CuPc/RTIL composite gold electrode. *Sens. Actuator B-Chem.* 161, 1000– 1009.
- [49] Henych, J., Štengl, V., Slušná, M., Matys Grygar, T., Janoš, P., Kuráň, P., Štastný, M., 2015. Degradation of organophosphorus pesticide parathion methyl on nanostructured titania-iron mixed oxides. *Appl. Surf. Sci.* 344, 9–16.
- [50] Štengl, V., Grygar, T.M., Opluštil, F., Olšanská, M., 2013. Decontamination of Sulfur Mustard from Printed Circuit Board Using Zr-Doped Titania Suspension. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 3436–3440.
- [51] Vorontsov, A. V., Lion, C., Savinov, A. N., Smirniotis, P. G., 2003. Pathways of photocatalytic gas phase destruction of HD simulant 2-chloroethyl ethyl sulfide. *J. Catal.* 220 (2), 414-423.

- [52] Benson, H., 2005. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr. Drug Deliv.* 2, 23–33.
- [53] Magnusson, B., Pugh, W., Roberts, M., 2004. Simple rules defining the potential of compounds for transdermal delivery or toxicity. *Pharm. Res.* 21, 1047–1054.
- [54] Vallet, V., Cruz, C., Licausi, J., Bazire, A., Lallement, G., Boudry, I., 2008. Percutaneous penetration and distribution of VX using *in vitro* pig or human excised skin. *Toxicology.* 246, 73–82.
- [55] Millerioux J, Cruz C, Bazire A, Lallement G, Lefevre L, Josse D, 2009b. *In vitro* selection and efficacy of topical skin protectants against the nerve agent VX. *Toxicol. In Vitro.* 23, 539–545.
- [56] Larese Filon, F., Mauro, M., Adami, G., Bovenzi, M., Crosera, M., 2015. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 310–322.
- [57] Bennett, S.W., Zhou, D., Mielke, R., Keller, A.A., 2012. Photoinduced Disaggregation of TiO₂ Nanoparticles Enables Transdermal Penetration. *PLoS ONE.* 7, e48719.
- [58] Lademann, J., Patzelt, A., Schanzer, S., Richter, H., Gross, I., Menting, K.H., Frazier, L., Sterry, W., Antoniou, C., 2011. Decontamination of the skin with absorbing materials. *Skin Pharmacol. Physiol.* 24, 87-92.
- [59] Hui, X., Domoradzki, J.Y., Maibach, H.C., 2012. *In vitro* study to determine decontamination of 3,5-dichloro-2,4,6-trifluoropyridine (DCTFP) from human skin. *Food and Chem. Toxicol.* 50, 2496–2502.
- [60] El Hussein, S., Muret, P., Berard, M., Makki, S., Humbert, P., 2007. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (ex-vivo study). *Exp. Dermatol.* 16, 830–836.
- [61] Williams, A.C., Barry, B.W. 2004. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 603-618.
- [62] Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., Novotny, L., Kuca, K., 2011. Method of static diffusion cells for assessment of pesticides skin permeation. *Mil. Med. Sci. Lett.* 80, 46-51.

4. Conclusion sur l'article

Les essais de dégradation du POX menés en milieu aqueux ont démontré que le CeO₂, calciné à 500 ou 600 °C, permet de dégrader 70% et 60% de POX après 5 h de mise en contact à l'obscurité. Sous UV, la vitesse de dégradation est largement augmentée les premières heures de mise en contact (40% de POX dégradé en 1 h). On suspecte donc une activité photocatalytique du CeO₂.

La décontamination cutanée avec les 4 systèmes 1 h après exposition au POX permet de diminuer significativement la quantité de POX totale, c'est-à-dire les quantités de POX depuis la surface de la peau jusqu'au CR, par déplacement/adsorption du toxique à la surface de la peau lors de la décontamination.

Les NPs de cérine ne réduisent pas la quantité de POX absorbée par la peau (du *stratum corneum* jusqu'au CR) (1,72 µmol/cm² de POX absorbée vs 1,74 µmol/cm² pour la peau non décontaminée) contrairement à la TAF (0,58 µmol/cm² de POX absorbée). Néanmoins, elles permettent de dégrader 15% du POX restant en surface après le processus de décontamination en PNT.

La décontamination avec les systèmes liquides est plus efficace qu'avec les poudres (0,15 µmol/cm² et 0,20 µmol/cm² de POX absorbée pour le RSDL et CeO₂-W respectivement). En effet, l'application de liquide permet un lavage et donc une élimination plus efficace du POX à la surface de la peau par rapport aux poudres, plus difficile à retirer de la peau. Le CeO₂-W permet de réduire significativement la quantité de POX absorbée mais l'activité de dégradation des NPs est réduite. Cependant, il faut noter que moins de NPs de CeO₂ sont appliqués lors de la décontamination par le CeO₂-W (26 mg de CeO₂) par rapport à la forme sèche (36 mg).

Pour confirmer des résultats et comprendre l'impact de la durée entre l'exposition au POX et la décontamination, la quantité de CeO₂ appliqué et le temps d'application des systèmes, des expérimentations complémentaires ont été conduites.

5. Résultats complémentaires

5.1. Influence de la décontamination sur le flux et de temps de latence du Paraoxon

Après établissement du temps de latence du POX (6,7 h comme déterminé dans le chapitre 1), des prélèvements dans le CR des cellules décontaminées sont effectués après 16, 18, 20, 22 et 24 h d'exposition au POX. Le flux de POX à travers la peau et son temps de latence sont résumés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Flux et temps de latence du Paraoxon après 24 h d'exposition et une décontamination à 1 h avec la TAF, le CeO₂, le RSDL et le CeO₂-W.

système de décontamination	Flux (μmol/cm ² /h)	T _{lag} (h)
Contrôle	0,007 ± 0,004	6,7 ± 1,3 (sur n=8)
TAF	0,012 ± 0,050	13,1 ± 3,9 (sur n=3)
CeO₂	0,016 ± 0,004	10,5 ± 0,9 (sur n=4)
RSDL	0,002 ± 0,001	12,4 ± 0,4 (sur n=3)
CeO₂-W	0,003 ± 0,002	/

Le flux de POX à travers une peau d'oreille de porc et non décontaminée est de 0,007 μmol/cm²/h. La décontamination réduit la quantité de POX à la surface et doit, par conséquent, diminuer le flux de POX à travers l'explant de peau (cf. loi de Fick). Néanmoins, les poudres augmentent le flux de POX à travers la peau comparée à la peau contrôle. Les systèmes liquides diminuent quant à eux ce flux. Le CeO₂ et la TAF sont abrasifs c.-à-d. qu'ils peuvent retirer les premières couches de cellules mortes lors du frottement de la peau et ainsi faciliter le passage du POX.

La détermination du temps de latence est délicate. En effet, sa détermination dépend de la valeur de la pente et de l'ordonnée à l'origine ($T_{lag} = -b/a$ avec a la pente de la courbe et b l'ordonnée à l'origine). Lorsque la pente est très faible, le T_{lag} calculé peut être négatif. Ainsi, le temps de latence n'a donné de valeur cohérente que pour certaines répétitions. Ce nombre de cellule a été indiqué dans le tableau 21. D'une façon générale, même si les valeurs calculées sont à prendre avec précaution, le temps de latence du POX est presque doublé lorsqu'un système de décontamination est utilisé.

5.2. Influence de différents paramètres lors de la décontamination sur l'efficacité des systèmes

Afin de mieux comprendre l'influence du protocole expérimental de décontamination sur l'efficacité de décontamination des systèmes, différents paramètres ont été changés un à un :

- l'excédent des systèmes poudres ou liquides n'a pas été retiré avec une seconde éponge permettant de laisser une partie du système de décontamination sur la peau et de le laisser agir,
- la durée entre l'exposition au POX et la décontamination a été réduite à 5 ou 30 min,
- la masse de CeO₂ appliquée sur la peau a été augmentée (36,4 mg à 100 mg).

5.2.1. Impact du temps d'action des différents systèmes

Afin d'évaluer l'efficacité de dégradation des systèmes de décontamination, le CeO₂, la RSDL, CeO₂-W et de l'eau épaissie (préparation identique au CeO₂-W mais sans NPs) sont appliqués sur la peau 1 h après exposition au POX, frottés mais l'excédent n'est pas retiré avec une éponge. Il reste alors une certaine quantité de décontaminant sur la peau qui peut agir. 24 h après exposition, le POX et le PNT sont dosés dans les différents compartiments (Figures 57-59).

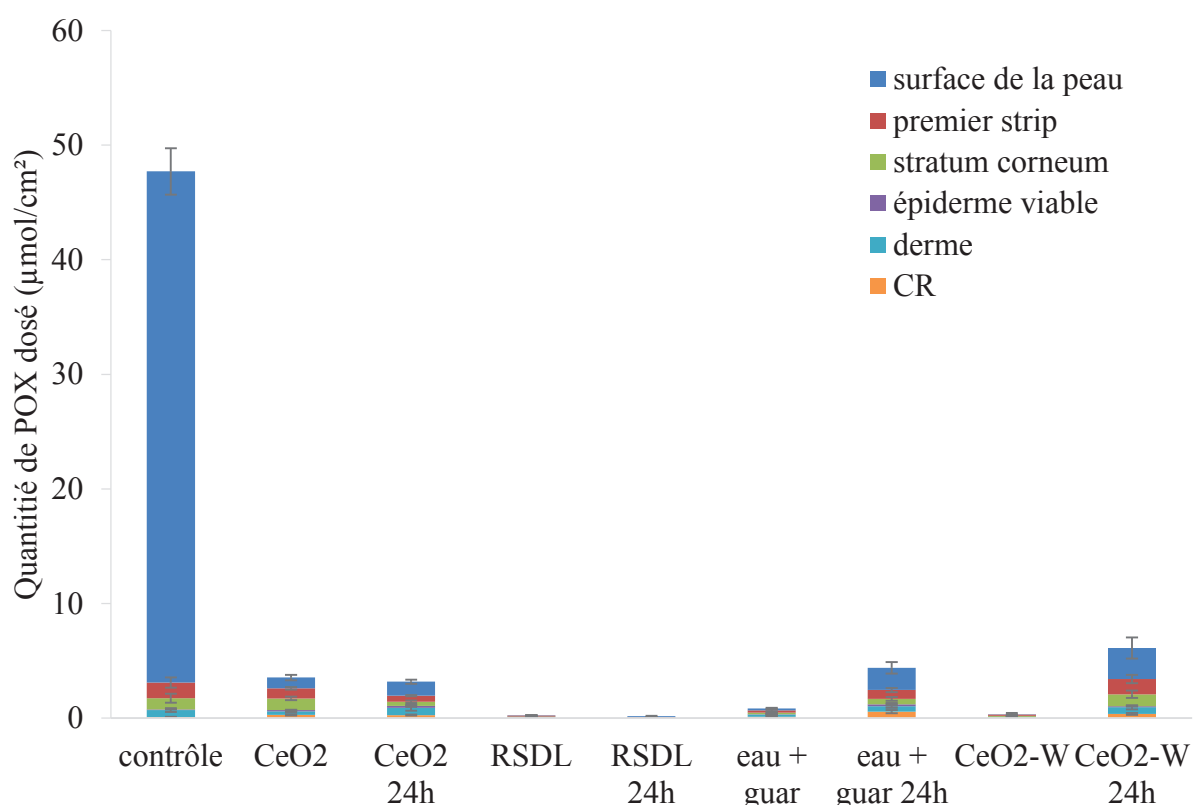


Figure 57 : Distribution du Paraoxon après 24 h d'exposition ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) et une décontamination 1 h après exposition avec 36,4 mg de CeO₂ ou 260 μL de RSDL, CeO₂-W ou d'eau épaissie dont l'excédent a été retiré (notation « système de décontamination ») ou non retiré (notation « système de décontamination 24h ») (n=8)

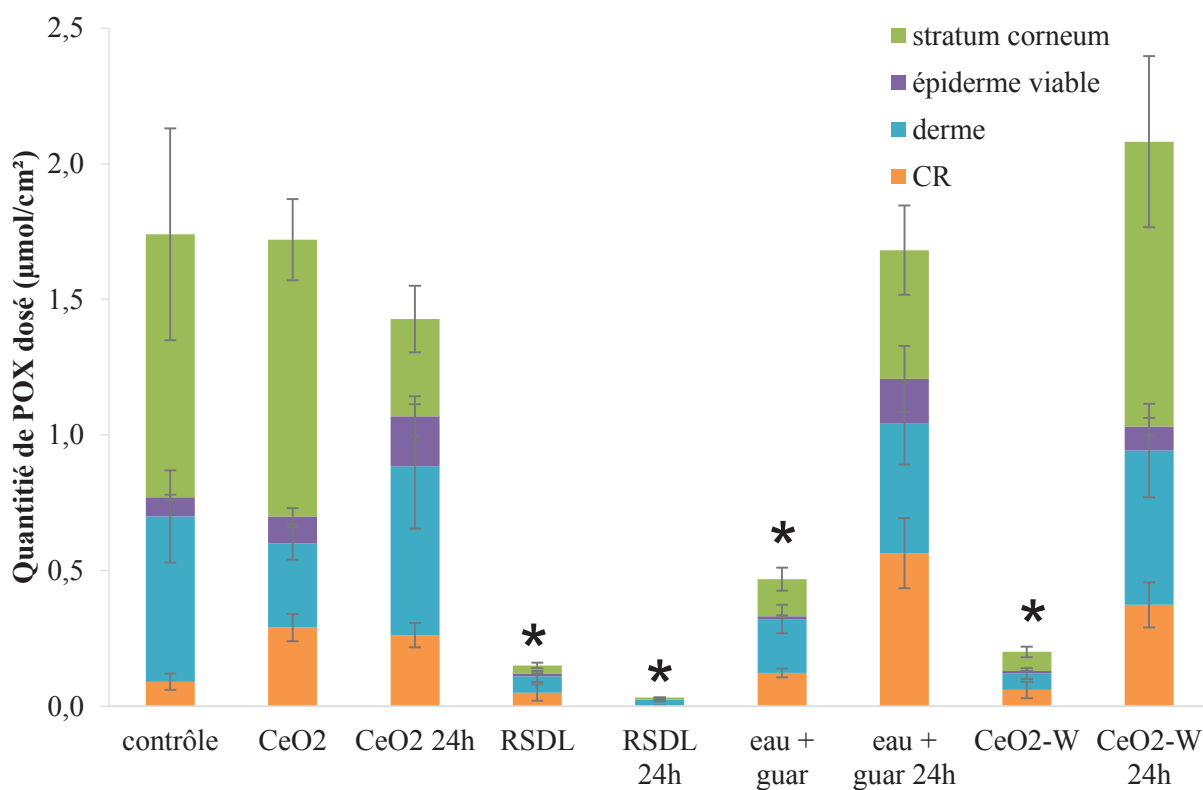


Figure 58 : Fraction absorbée de Paraoxon après 24 h d'exposition ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) et une décontamination 1 h après exposition avec 36,4 mg de CeO_2 ou de TAF ou 260 μL de RSDL, $\text{CeO}_2\text{-W}$ ou d'eau épaisse dont l'excédent a été retiré (notation « système de décontamination ») ou non retiré (notation « système de décontamination 24h ») ($n=8$). * indique une différence significative (test de Mann-Whitney, $p<0,05$) de la fraction absorbée de POX avec le contrôle.

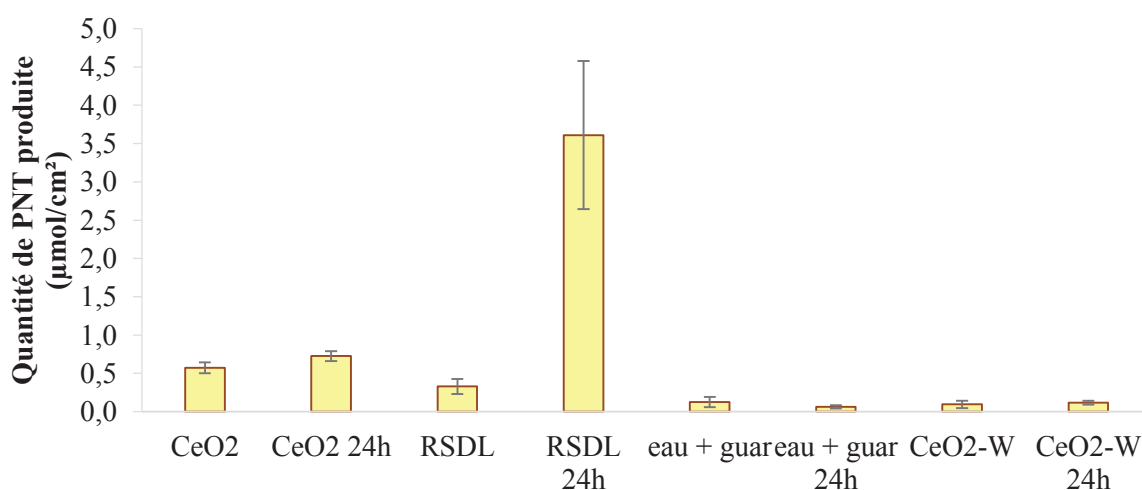


Figure 59 : Quantité de P-nitrophénol produite après 24 h d'exposition au Paraoxon ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) et une décontamination 1 h après exposition avec 36,4 mg de CeO_2 ou de TAF ou 260 μL de RSDL, $\text{CeO}_2\text{-W}$ ou d'eau épaisse dont l'excédent a été retiré (notation « système de décontamination ») ou non retiré (notation « système de décontamination 24h ») ($n=8$).

En premier lieu, avec le protocole expérimental initial (excédent retiré de la surface de la peau), le CeO₂-W (FP=93,1) permet de réduire significativement la fraction absorbée de POX par rapport à l'eau épaissie (FP=37,8) (test de Mann-Whitney, p<0,05). Néanmoins, l'activité de dégradation est presque identique entre ces deux formules. On peut en conclure que les NPs du CeO₂-W permettent d'adsorber plus de POX à la surface de la peau mais, lorsque l'excédent de décontaminant est retiré, les NPs sont entraînées dans l'éponge et ne peuvent pas exercer leur activité de dégradation sur la peau. Si un certain volume des systèmes aqueux (CeO₂-W et eau épaissie) est laissé sur la peau plus longtemps (excédent non retiré), cela favorise la pénétration cutanée du POX. En effet, l'eau est un promoteur d'absorption cutanée.

Un temps d'application du CeO₂ sous forme poudre plus long permet une dégradation de POX supérieure. Cependant, la fraction absorbée est identique (le FP du CeO₂ laissé 24h est de 10,7 vs 9,4 lorsque l'excédent de CeO₂ est retiré). Ce résultat confirme bien que la persistance de poudre à la surface de la peau est une contrainte pour l'élimination du POX et n'est pas compensée par une activité de dégradation plus importante.

La RSDL appliquée 24 h permet d'éliminer presque totalement le POX de la peau (FP=253,9). De plus, la production de PNT est largement augmentée.

5.2.2. Décontamination cutanée 5 et 30 min après exposition au Paraoxon

Afin d'obtenir des différences d'efficacité de décontamination cutanée entre les différents systèmes, la décontamination a été réalisée 1 h après exposition au toxique (décontamination approfondie). En condition réelle, les décontaminations peuvent être réalisées à des temps plus courts. La décontamination avec les 4 systèmes déjà utilisés précédemment a aussi été réalisée 5 et 30 min après exposition au POX (décontamination dite d'urgence). 24 h après exposition, le POX est dosé dans les différents compartiments (Figures 60 et 61, tableau 22). Les résultats sont comparés avec la décontamination 1 h après exposition.

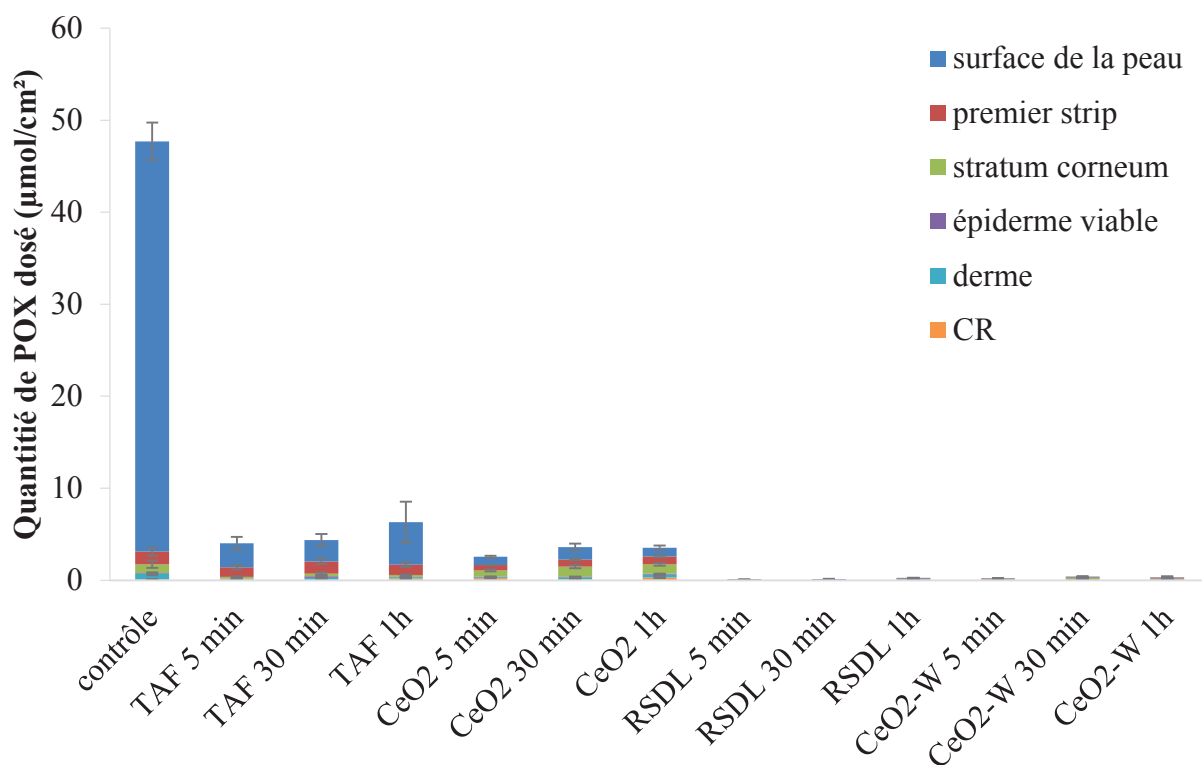


Figure 60 : Distribution du Paraoxon après 24 h d'exposition ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) et une décontamination 5, 30 min ou 1 h après exposition avec 36,4 mg de CeO_2 ou de TAF ou 260 μL de RSDL ou $\text{CeO}_2\text{-W}$ ($n=8$).

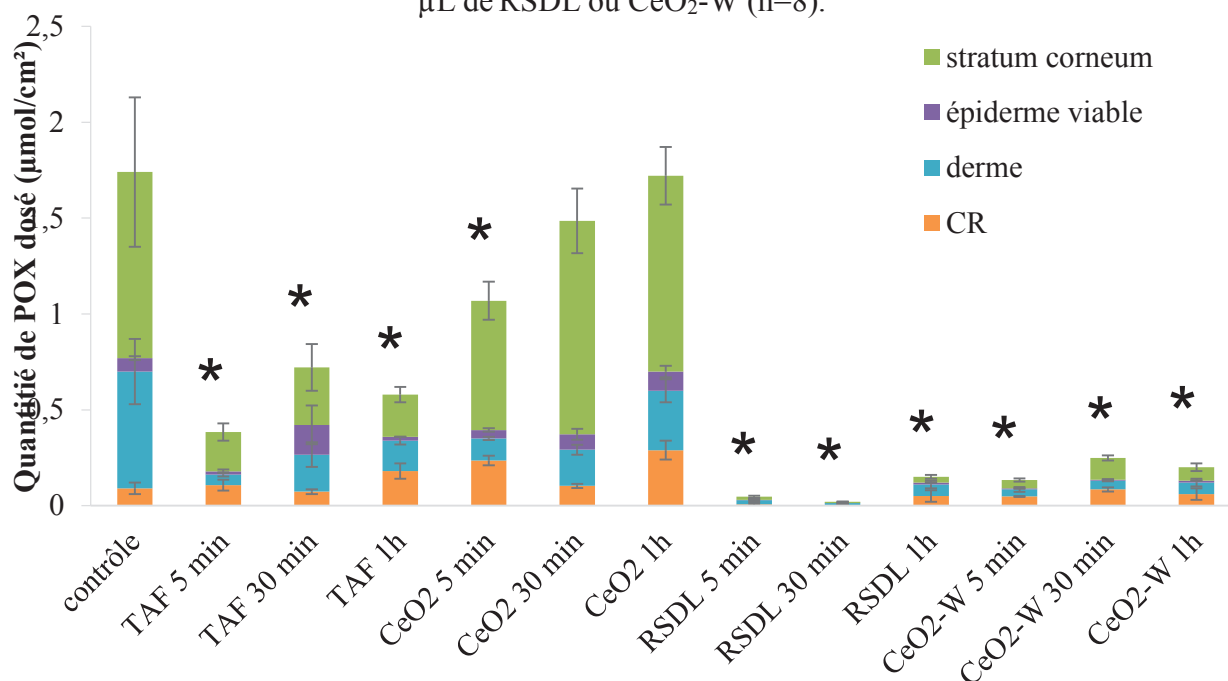


Figure 61 : Fraction absorbée de Paraoxon après 24 h d'exposition ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) et une décontamination 5, 30 min ou 1 h après exposition avec 36,4 mg de CeO_2 ou de TAF ou 260 μL de RSDL ou $\text{CeO}_2\text{-W}$ ($n=8$). * indique une différence significative (test de Mann-Whitney, $p<0,05$) de la fraction absorbée de POX avec le contrôle.

Tableau 22 : Evolution du pronostic fonctionnel (FP) en fonction du décontaminant et de la durée entre l'exposition au Paraoxon et la décontamination

	durée entre l'exposition POX et la décontamination	FP
TAF	5 min	11.2
	30 min	9.7
	1 h	7.2
CeO ₂	5 min	13.7
	30 min	9.7
	1 h	9.4
RSDL	5 min	464.2
	30 min	421.2
	1 h	126.8
CeO ₂ -W	5 min	136.6
	30 min	75.1
	1 h	91.6

Quelle que soit la durée entre l'exposition au POX et la décontamination, les systèmes liquides (RSDL et CeO₂-W) et la TAF permettent de réduire significativement la fraction de POX absorbée par la peau par rapport au contrôle (non décontaminé). Décontaminer la peau avec du CeO₂ 5 min après exposition au POX permet de réduire significativement la quantité de POX absorbée (FP=13,7).

Comme le montre l'évolution du FP dans le tableau 22, pour les systèmes CeO₂, TAF et CeO₂-W, une décontamination réalisée à 30 min au lieu d'1 h ne permet pas d'augmenter significativement le pronostic fonctionnel (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$). Le FP est en revanche significativement augmenté lorsque la décontamination est réalisée à 5 min. La décontamination à 5 et 30 min avec la RSDL permet de multiplier le FP par 4.

La quantité de PNT produite par chaque système a également été dosée (résultats non montrés). La quantité de POX dégradé est indépendante de la durée entre l'exposition au POX et la décontamination.

5.2.3. Impact de la quantité de CeO₂ appliqué sur l'adsorption et la dégradation du POX en décontamination cutanée

Le CeO₂ est un matériau lourd. Pour une même masse de poudre appliquée, le volume de TAF appliqué est plus important que le volume de CeO₂ déposé sur la peau. La capacité d'adsorption du CeO₂, qui a également une surface spécifique très inférieure à la TAF (5,4 m²/g pour le CeO₂ vs 180 m²/g pour la TAF), est limitée. Il été choisi de reconduire la manipulation de décontamination cutanée sur 4 explants cutanés (provenant de deux donneurs différents) en appliquant 100 mg de CeO₂, 30 min après exposition au POX. 24 h après exposition, le POX est dosé dans les différents compartiments (Figure 62a) et la production de PNT est évaluée (Figure 62b).

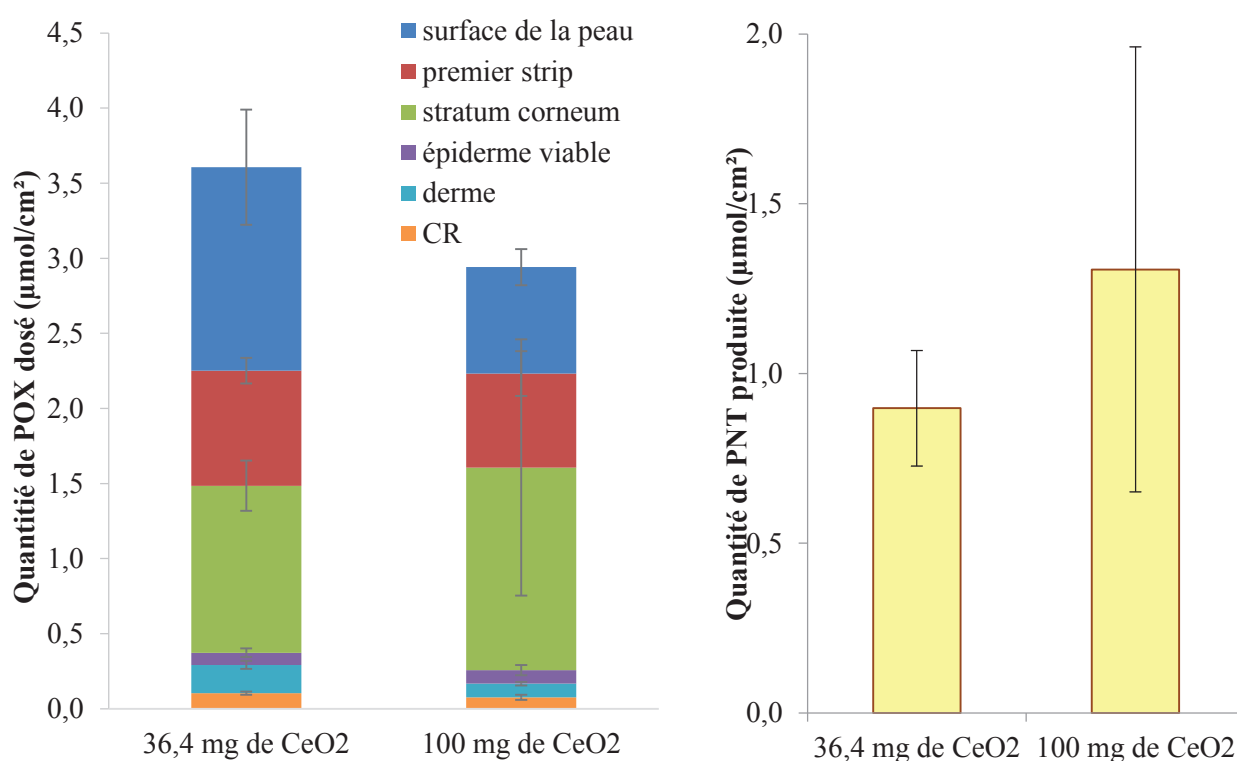


Figure 62 : (a) Distribution du Paraoxon après 24 h d'exposition ($Q_0=46,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) et une décontamination 30 min après exposition avec 36,4 ou 100 mg de CeO₂. (b) Quantité de P-nitrophénol produite. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n = 4).

En appliquant 100 mg de CeO₂ à la surface de la peau, la surface disponible pour adsorber le POX est de 0,54 m² (vs 0,2 m² lorsque 36,4 mg sont appliqués). Augmenter la quantité de CeO₂ permet de réduire significativement la quantité totale de POX par rapport au précédent protocole. Néanmoins, la fraction absorbée de POX par la peau n'est pas diminuée

significativement. En utilisant plus de CeO_2 , on observe une hydrolyse plus importante du POX en PNT mais cette augmentation de production est non significative.

Le dépôt d'une masse plus élevée de CeO_2 augmente le risque de toxicité des NPs sans apporter une efficacité de décontamination cutanée supérieure.

5.3. Activité photocatalytique du CeO_2

Les expérimentations ont été réalisées au sein du laboratoire C-Biosenss (Université d'Auvergne). Afin de confirmer l'activité photo-catalytique du CeO_2 , différentes masses de NPs (5, 50 et 500 mg) calcinées à 500°C sont immergées dans 5 mL d'acide orange-7 (AO7) de concentration $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L placée dans un tube de verre Pyrex. L'AO7 absorbe principalement à 482 nm. La première phase est la phase d'adsorption : le tube est laissé à l'obscurité, le mélange est mis sous agitation. Lors de la phase d'adsorption, l'AO7 vient se coller aux nano grains de la cérine, diminuant ainsi l'absorbance à 482 nm. La seconde étape est la phase de photodégradation, le tube est irradié avec une lampe fluorescente polychromatique Philips TDL 15 W/05, émettant entre 300 et 450 nm. L'AO7 est catalysé en photoproduits et induit la diminution de l'absorbance à 482 nm (Figure 63). L'AO7 et les photoproduits peuvent aussi être identifiés par HPLC-UV selon la méthode d'Awitor *et al.* (2008).

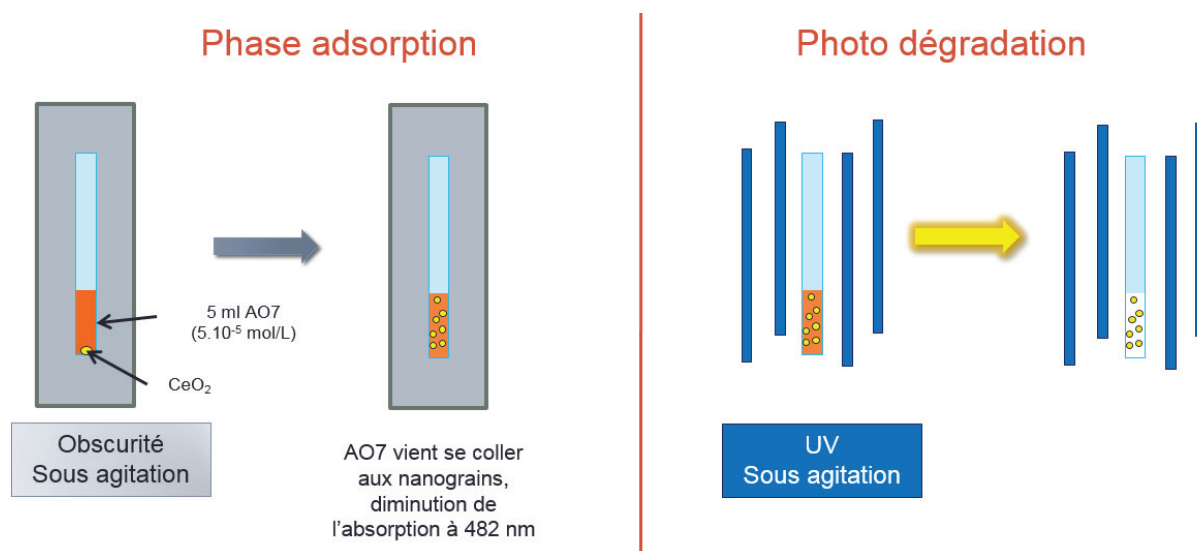


Figure 63 : Détermination de l'activité photocatalytique par dégradation de l'acide orange-7 (AO7).

En augmentant la quantité de CeO_2 , la surface disponible pour l'adsorption de l'AO7 augmente et on observe une forte diminution de l'absorbance à 482 nm pendant la phase d'adsorption (Figure 64). Identiquement, plus la quantité en CeO_2 augmente, plus l'activité

photocatalytique augmente. L'activité photocatalytique a été confirmée par l'apparition des photoproduits en HPLC-UV. Le CeO₂ a donc bien une activité photocatalytique.

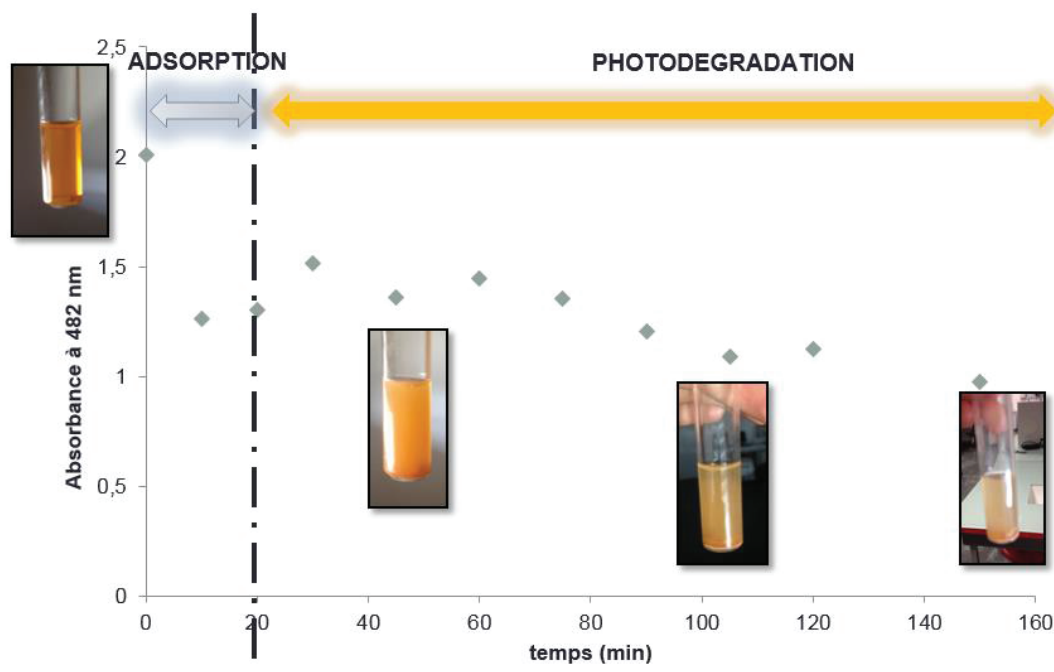


Figure 64 : Absorbance à 482 nm pendant la phase d'adsorption et de photodégradation de $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L d'AO7 par 50 mg de CeO₂

5.4. Synthèse des principaux résultats

Les essais menés en tube ont démontré que la vitesse de dégradation du POX par le CeO₂, calciné à 500 ou 600 °C, est largement augmentée sous UV. L'activité photocatalytique du CeO₂ synthétisé par voie hydrothermale a bien été confirmée par la photodégradation de l'AO7.

Quelle que soit la durée entre l'exposition du POX et la décontamination cutanée, les 4 systèmes (TAF, CeO₂, RSDL et CeO₂-W) permettent de réduire significativement la quantité de POX totale par déplacement et/ou adsorption du toxique à la surface de la peau.

Les poudres sont des systèmes abrasifs qui facilitent le passage du POX à travers la peau d'oreille de porc. Contrairement au CeO₂, la TAF réduit significativement la quantité de POX absorbée par la peau quelle que soit la durée entre l'exposition au POX et la décontamination. Néanmoins, le CeO₂ permet de dégrader 15% du POX restant après le processus de décontamination. Une décontamination 5 min après exposition avec le CeO₂ permet de réduire significativement la fraction de POX absorbée par la peau et d'améliorer le pronostic fonctionnel (FP). Laisser agir le CeO₂ plus longtemps ou augmenter la masse de CeO₂ déposée

sur la peau n'améliore pas le FP : la fraction absorbée de POX n'est pas diminuée et l'activité de dégradation n'est pas significativement augmentée. La décontamination avec des systèmes poudres est délicate car l'excédent de poudre est difficilement éliminable de la surface de la peau et une quantité de POX adsorbée sur les poudres persiste sur la peau. Lorsque la dégradation du POX est inexistante (cas de la TAF) ou pas assez efficace (cas du CeO₂), le POX adsorbé sur la poudre peut potentiellement pénétrer dans la peau.

La décontamination avec les systèmes liquides (RSDL, CeO₂-W et eau épaissie sans NPs) est plus efficace qu'avec les poudres. En effet, l'application de liquide permet un lavage et donc une élimination plus efficace du POX à la surface de la peau par rapport aux poudres. Le CeO₂-W permet de réduire significativement la quantité de POX absorbée. La présence de NPs dans cette formule joue un rôle dans d'adsorption du toxique mais l'activité de dégradation est perdue. L'augmentation du temps d'action de systèmes aqueux est délicate dans la mesure où l'absorption cutanée du POX peut être augmentée.

Le RSDL est un système de décontamination efficace car il permet de réduire significativement la quantité de POX absorbée. De plus, lorsque du RSDL est laissée à la surface de la peau : (i) la pénétration du POX n'est pas augmentée car la formule est largement hydrophobe (90% de MPEG, 10% d'eau) ce qui favorise le stockage dans le *stratum corneum* et ralentit le passage dans l'épiderme viable ; (ii) la dégradation du POX est importante et continue.

En conclusion, l'utilisation d'une suspension aqueuse contenant les NPs permet l'élimination plus efficace du POX à la surface de la peau. Cependant, l'activité de dégradation du CeO₂ est perdue et la présence d'eau augmente l'absorption cutanée du toxique. L'objectif a donc été de formuler un système qui puisse mettre en avant l'activité de dégradation du CeO₂ (comme le CeO₂ sous forme poudre) et permette la diminution de la fraction absorbée du POX (comme le CeO₂-W). Le choix s'est donc porté sur l'émulsion de Pickering.

Chapitre 3 : Développement d'émulsions de Pickering à partir du CeO₂, évaluation de leur efficacité de décontamination cutanée.

1. Introduction

La différence d'efficacité de décontamination cutanée entre la poudre de CeO₂ et CeO₂-W (suspension aqueuse épaissie contenant 10% en poids de cérine) a mis en évidence l'importance du choix de la forme galénique pour permettre une élimination efficace du POX à la surface de la peau tout en conservant l'activité de dégradation du CeO₂. L'objectif est de développer une autre forme liquide, contenant la même masse en CeO₂ (10% en poids), mais en optimisant l'activité catalytique des NPs notamment en améliorant l'accessibilité à sa surface. Les travaux de P. Rolland (2012) avaient démontré que l'émulsion de Pickering était efficace pour l'élimination du VX à la surface de la peau. Les émulsions de Pickering sont des émulsions dans lesquels les tensio-actifs habituels (qui peuvent être des promoteurs d'absorption cutanée) sont remplacés par des particules solides telles que la cérine. Les particules solides stabilisent ainsi les gouttelettes d'huile, sont moins agrégées et pourraient plus facilement adsorber le toxique. De plus, la présence des deux phases, huile et eau, dans l'émulsion permet aussi bien de solubiliser un COP hydrophobe qu'hydrophile. Ainsi, une émulsion de Pickering stabilisée par la TAF (10% de particules et 40% d'adipate d'éthyle dont l'hydrophilie est similaire au VX) permet une meilleure élimination du VX à la surface cutanée que des particules adsorbantes seules ou en suspension aqueuse (Rolland, 2012). Au contraire, une émulsion stabilisée par de la silice (10% d'Aerosil® et 40% d'adipate d'éthyle) est moins efficace que la suspension aqueuse pour l'extraction du VX à la surface cutanée. Ces résultats, qui ont été complétés par l'analyse des propriétés physico-chimiques des formules et qui ont fait l'objet d'une publication (Salerno *et al.*, 2016, annexe 10), ont montré l'importance du pH de la formule :

Salerno, A., Bolzinger, M.-A., Rolland, P., Chevalier, Y., Josse, D., Briançon, S., 2016. Pickering emulsions for skin decontamination. *Toxicology in vitro*. 34: 45–54

En effet, le pH influe directement sur l'interaction entre le VX et les particules solides. Si une interaction électrostatique est favorisée, l'élimination du VX lors du processus de décontamination cutanée sera améliorée. Inclure une huile dont l'hydrophobie est similaire au

toxique est donc un avantage seulement si cette interaction entre le toxique et les particules est défavorisée par le pH.

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, des essais de formulation d'émulsions de Pickering dont les gouttelettes d'huile seraient stabilisées par le CeO₂ ont été réalisés avec des huiles ayant des tensions interfaciales avec l'eau variant de 13 mN/m (huile la plus polaire) à 52 mN/m (huile la moins polaire). Les émulsions de Pickering, stables après émulsification, ont été caractérisées (granulométrie, observation en cryo-microscope électronique à balayage ou cryoMEB) puis utilisées en décontamination cutanée, 1 h après exposition au POX.

L'utilisation d'une émulsion de Pickering, formule amphiphile, peut favoriser la pénétration du toxique mais également celle des NPs. Cette pénétration du CeO₂ défavoriserait l'interaction du POX avec les NPs et donc la dégradation du POX. Le second but a donc été d'évaluer la pénétration cutanée *in vitro* du CeO₂ par une méthode non invasive, la Microspectroscopie Confocale Raman (MCR), depuis la surface de la peau jusqu'à une profondeur de 30 µm en plaçant l'explant de peau directement sous l'objectif du Raman. L'absorption des NPs est comparée lorsqu'elles sont appliquées sous forme sèches (fortement agrégées) ou sous forme d'émulsion de Pickering (CeO₂ moins agrégé car à l'interface huile/eau).

2. Méthode

2.1. Formulation des émulsions de Pickering

Les émulsions contiennent 10% de CeO₂ et 40 % d'huile (p/p). Le CeO₂ est préalablement mélangé à de l'eau distillée. Afin d'être un accord avec une application topique, le pH est ajusté avec une solution d'acide citrique à 0,1 mol/L jusqu'à obtenir un pH entre 4 et 7. Le CeO₂ est dispersé dans l'eau grâce à deux cycles d'ultrasons de 5 min (10 s « on » et 10 s « off » à 80% d'amplitude). Cette étape permet de désagréger au maximum les NPs. Des cycles d'ultrasons supplémentaires ne permettent pas d'améliorer la dispersion des particules.

L'émulsification est réalisée en ajoutant l'huile à la suspension de CeO₂ et à l'aide d'un Ultra turrax (10 000 tr/min) pendant 10 min (Figure 65). Sept émulsions de Pickering ont été réalisées à partir de 7 huiles sélectionnées pour leurs tensions interfaciales avec l'eau différentes (variant de 13 à 52 mN/m).

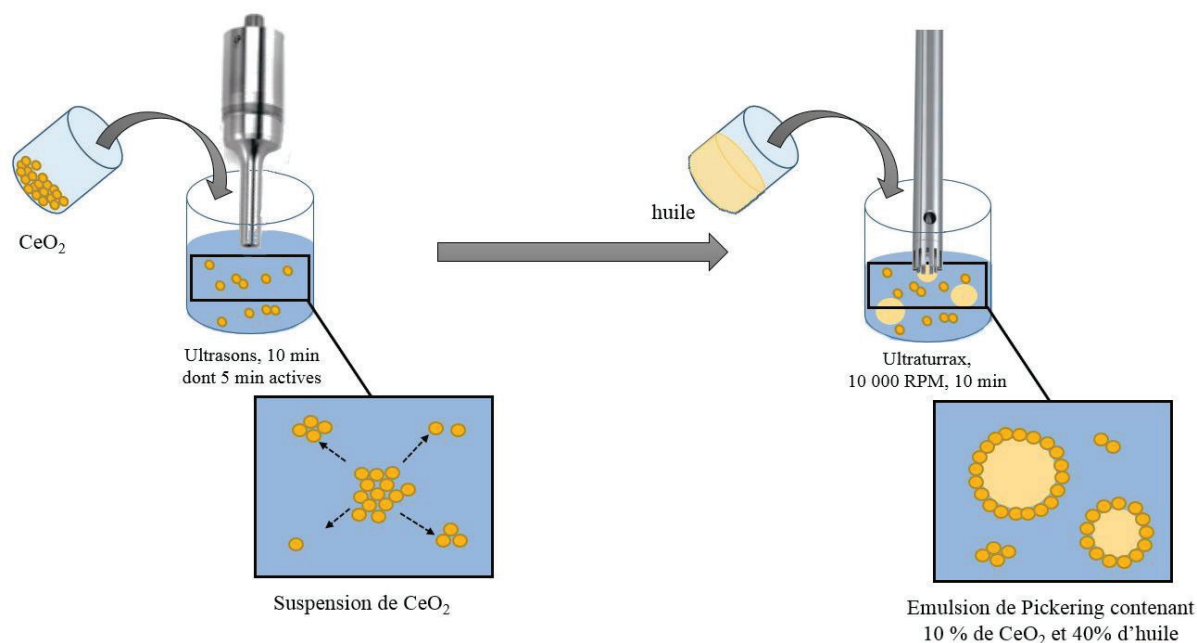


Figure 65 : Protocole de préparation des émulsions de Pickering

2.2. Caractérisation des émulsions de Pickering

La distribution en taille des gouttelettes d'huiles et des NPs de cériane dans les émulsions de Pickering stables (c'est-à-dire qu'aucune séparation de phase n'est observée après émulsification) est mesurée à l'aide d'un granulomètre Mastersizer[®] 2000 (Malvern, UK).

Des observations en cryo-MEB (à l'aide du MEB FEI Quanta FEG 250 équipé d'un cryotransfert GATAN Alto 2500 France) ont permis de visualiser les NPs de cériane à la surface des gouttelettes. Quelques gouttes d'émulsions de Pickering sont placées dans un support puis congelées. L'échantillon est ensuite fracturé. On peut ainsi observer les NPs de cériane tapissant des cavités. Ces cavités correspondent à des gouttelettes d'huile congelées qui ont été décalottées pendant la fracturation.

2.3. Protocole de décontamination cutanée

Le protocole de décontamination cutanée est identique à celui décrit Chapitre 1. Après 1 h d'exposition au POX, les peaux sont décontaminées avec 260 μ L d'émulsion de Pickering (n=8). L'émulsion est étalée sur la peau pendant 10 s avec une éponge sans lotion du kit RSDL. L'émulsion de Pickering est laissée sur la peau 2 min avant que l'excédent soit retiré par une seconde éponge sans lotion du kit RSDL.

2.4. Pénétration cutanée du CeO₂

La pénétration cutanée de la cérine est effectuée en cellule de Franz. Les peaux d'oreille de porc sont placées entre compartiment donneur et récepteur. L'HBSS est le liquide récepteur. Après avoir laissé les cellules 30 min au bain-marie à 37°C, 36 mg de CeO₂ ou 260 µL d'émulsion de Pickering (40% d'huile et 10% de CeO₂ p/p) sont déposés sur la peau et étalés 10 s à l'aide d'une éponge du kit TAF dans le cas de la forme poudre ou d'une éponge du kit RSDL dans le cas des émulsions de Pickering. L'excédent est retiré à l'aide d'une seconde éponge. L'expérience est réalisée en triplicat.

Après 24 h d'expérimentation, le compartiment donneur de la cellule de Franz est retiré et la surface de la peau est soigneusement tamponnée à l'aide de papiers absorbants. Cette étape permet de retirer un maximum de NPs qui pourraient empêcher la visualisation des kératinocytes de la peau en Raman et une mauvaise estimation de la surface. Le compartiment récepteur est ensuite relié à une poche de perfusion pour permettre l'hydratation de la peau lors des mesures en Raman (Figure 66). En effet, la peau peut sécher sous l'effet du laser et les variations de profondeur (Z) et latérales (X et Y) peuvent être importantes. Lorsque la poche de perfusion est reliée au CR, la peau est laissée à température de la pièce (20°C) jusqu'à ce que le Z soit à peu près stabilisé (1 h environ).

Les observations sont effectuées avec l'objectif à grossissement 100, sous excitation laser de 785 nm. Le temps d'acquisition est court, 30 s, car il ne faut pas que la variation de Z pendant l'acquisition du spectre soit trop importante. Les mesures sont effectuées entre 400 à 1710 cm⁻¹, le pic du CeO₂ étant à 463 cm⁻¹. 3 à 5 spectres sont acquis par Z de -2 µm (-2 µm au-dessus de la surface de la peau) à 30 µm (30 µm sous surface de la peau).

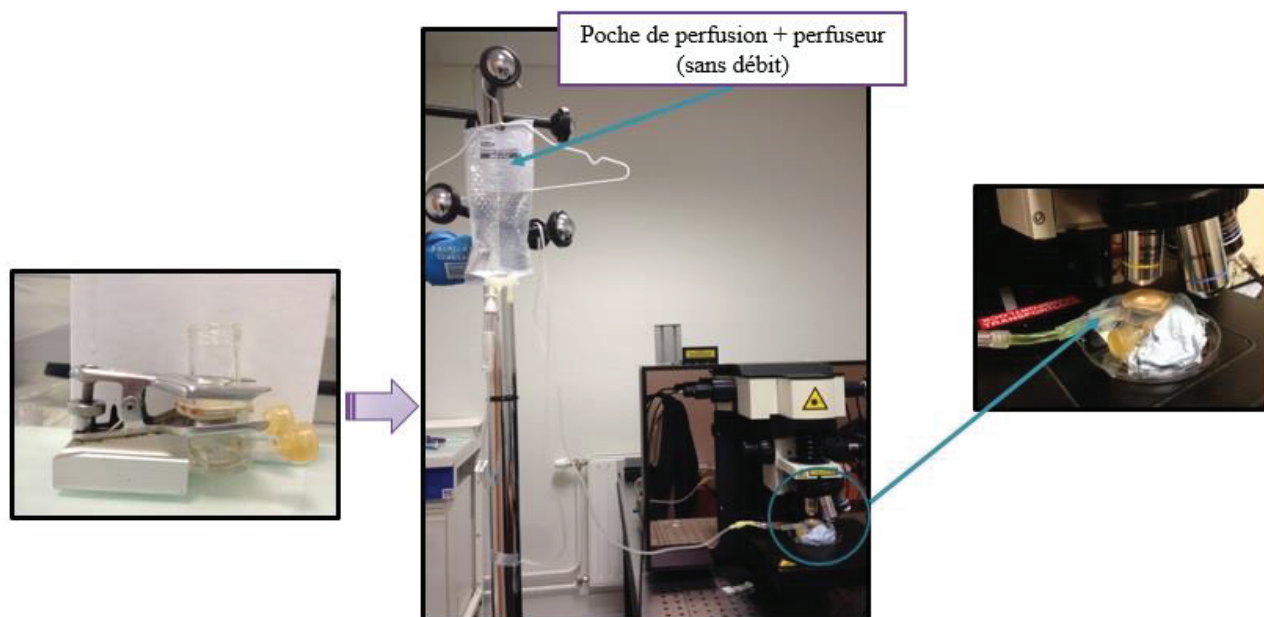


Figure 66 : Mise en place de la cellule de Franz pour l'évaluation de la pénétration cutanée du CeO_2 en microspectroscopie confocale Raman.

3. Résultats sous forme d'article: Formulation of Pickering emulsion stabilized by CeO_2 , application for skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon

Les résultats font l'objet d'une publication en cours de rédaction :

Salerno, A., Bolzinger, M.-A., Devers, T., Chevalier, Y., Pelletier, J., Josse, D., Briançon, S., Formulation of Pickering emulsion stabilized by CeO_2 , application for skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon.

Formulation of Pickering emulsion stabilized by CeO_2 , application for skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon

Alicia Salerno¹, Marie-Alexandrine Bolzinger¹, Thierry Devers², Yves Chevalier¹, Jocelyne Pelletier¹, Denis Josse³, Stéphanie Briançon^{1*}

¹ UMR CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), F-69622, Villeurbanne, France

Université Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, F-69008, Lyon, France

² Centre de Recherche sur la Matière Divisée, IUT de Chartres, Université d'Orléans, F-28000, Chartres, France

³ Service de Santé et de Secours Médical, SDIS06, F-06270, Villeneuve-Loubet, France

Abstract:

Organophosphorus compounds (OP) mainly penetrate via the percutaneous pathway. This study aimed at developing an innovative system for skin decontamination of unprotected skin areas which could prevent excessive absorption of toxic and victims poisoning. We decided to formulate Pickering emulsions (PE) containing metal oxide nanoparticles (NPs), cerium oxide (CeO₂), because of its high reactivity towards OP. The pH of the emulsions were adjusted to pH=5-6 in order to be in accordance with a topical application. The efficiency of PE for skin decontamination was evaluated, *in vitro*, 1 h after an exposure to Paraoxon (POX), an OP pesticide, and compared to a decontamination with powders of NPs and an aqueous dispersion of CeO₂ (CeO₂-W, pH=10). Results showed that PE was as effective as CeO₂-W for skin decontamination: they can significantly reduce the amount of POX absorbed by the skin but have the disadvantage of increasing the amount of POX in the receptor compartment. Moreover, the degradation of POX with PE was almost non-existent in comparison with dry NPs. The study emphasizes the importance of the galenic formulation which can inhibit the degradation of POX with metal oxide NPs. Indeed, there are several likely explanations for this result. First, by using Confocal Raman Microspectroscopy, we demonstrated that PE caused skin absorption of CeO₂ beyond the *stratum corneum* which was not the case when powders were applied. It could reduce extended interactions and the degradation of POX during the experimentation. Second, adding an oil could favour the interaction of POX with oil over the interaction of POX with CeO₂ particles and thus, inhibit its degradation. And lastly, the neutral-acid pH in PE disfavoured the hydrolysis reaction of POX and catalysing effect of CeO₂.

Introduction:

Despite the calls for complete destruction of Chemical Warfare Agent (CWA) stockpiles of signatory nations by 2007 (192 nations signatories), (192 nations signatories), CWA still represent a threat for both military and civilians (Ghouta attack, Syria in 2013, Tokyo subway in 1995). Organophosphorus nerve agents (VX, sarin, tabun, soman) which are CWA and organophosphorus (OP) pesticides (as Paraoxon (POX) or demeton) mainly penetrate the body via the percutaneous pathway. All inhibit the acetylcholinesterase, an enzyme involved in the transmission of nerve impulses. The consequence is a continuous stimulation of the nervous system and leads to respiratory failure and death. For OP nerve agents, the first signs of intoxication appear 1–20 minutes after exposure (Rousseau *et al.*, 2000) and the median lethal dose (LD₅₀ i.e. the dose required to kill half the members of a tested population) vary from 0.01 mg/kg for VX to 0.27 mg/kg for tabun after dermal exposure in rats (Misik *et al.*, 2015). Toxicity of OP pesticides is lower than OP nerve agents (LD₅₀ = 4.3mg/kg in rats for POX (Misik *et al.*, 2015)) and the clinical signs appear 12-24 hours after exposure (Rousseau *et al.*, 2000). Body surface decontamination is therefore crucial to prevent victims poisoning. It reduces the amount of contaminant on the skin surface and thus, decreases the penetration rate and the extent of intoxication.

In agreement with previous studies, Fuller's Earth (FE) and the Canadian Reactive Skin Decontaminant Lotion (RSDL) are the most efficient systems for skin decontamination following a CWA exposure (Bjarnason *et al.*, 2008; Braue *et al.*, 2011; Chilcott *et al.*, 2001; Taysse *et al.*, 2010). RSDL acts by neutralization (chemical degradation) of OP and FE acts by adsorption and displacement of the toxic agent during skin decontamination process. Using RSDL *in vitro* as a skin decontaminant, 45 min after an exposure to VX on a pig-ear skin, allowed the removal more than 96% of VX on and into the skin (Rolland *et al.*, 2013). However, RSDL has a potential systemic toxicity of an active ingredient (2,3-butanedione monoxime) (Jager & Stagg, 1958) and its efficacy against unthickened sulphur mustard in the *in vivo* experiments was relatively low (Van Hooidonk *et al.*, 1995). FE cannot degrade the toxic agent. Our work aim at developing another formulation, which could be efficient for the degradation of OP compounds and easy to use in case of mass contamination.

Several studies talk about decontamination/degradation of CWA using metal oxide nanoparticles (NPs) as Zr(OH)₄ (Bandosz *et al.*, 2012), Ge⁴⁺ doped TiO₂ (Štengl *et al.*, 2012), CuO and ZnO (Praveen Kumar *et al.*, 2013). The first advantage of metal oxide NPs is their high surface area, increasing the adsorption of CWA. The second advantage is the great amount

of highly reactive sites available on the surface of metal oxides as their intrinsic vacancy defects, Lewis acid (metal cations), Lewis base (oxide anions) (Wagner *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 2012; Sharma & Kakkar, 2013). NPs act mostly by CWA hydrolysis and lead to benign or less toxic compounds. In case of POX, which is a well-known surrogate for VX due to its similar physico-chemical properties ($\log P = 2,3$; $MM = 275 \text{ g/mol}$), its catalysis with metal oxide NPs produced diethyl phosphate and p-nitrophenol (PNT) (Kennedy *et al.*, 2015; Savio *et al.*, 2016). In contrast to POX, PNT does not affect cholinesterase activity (Dzyadevych *et al.*, 2002) and LD_{50} is significantly increased (1300 mg/kg in rats). Our previous study (Salerno *et al.*, 2016a) demonstrated that CeO_2 , synthesized using microwave pathway and calcined at 500°C , is a promising material for skin decontamination. First, it effectively degraded POX into PNT under aqueous environment. Such an aqueous environment is closer to the condition of skin application compared to non-polar solvent classically used in the literature. Then, POX skin absorption decreased by 6.4 compared to the control not decontaminated when an aqueous suspension of CeO_2 thickened (CeO_2 -W) were applied 1 h after POX exposure, *in vitro*. However, CeO_2 -W was less efficient for POX degradation than RSDL. A formulation able to degrade and remove POX even more effectively than CeO_2 -W has to be developed.

Pickering emulsions (PE) is an emulsion where the classical emulsifier has been replaced by solid particles which adsorb onto the surface of oil droplets and stabilize the oil/water interface. Such emulsion labeled “surfactant-free” (Chevalier and Bolzinger, 2013; Aveyard *et al.*, 2003; Pickering, 1907; Ramsden, 1903) limits the adverse effects of the presence of surfactants. In particular the skin penetration enhancer effect of surfactants would be prevented. The use of CeO_2 for the stabilization of the emulsion could be better suited for absorption of the toxic agent at the surface of NPs and the solubilisation of OP in both the aqueous and the oil phases. Spagnul *et al.* (2010) showed the interest of an oily phase to extract uranium from skin under certain conditions and thereby the interest of emulsions as skin decontamination systems that combine an oily phase and surfactants. PE can be used in aerosol spray and will be easy to handle in case of mass decontamination. Moreover the liquid emulsion droplets should ensure a better spreading on the skin and a continuous surface covering (Alvarez-Román *et al.*, 2001, 2004). It was also demonstrated that PE using FE was more efficient for the removal of VX from the skin surface compared to raw particles (powders) and an aqueous dispersion of particles (Salerno *et al.*, 2016b). Thus, stable PE containing water, oil and CeO_2 have been developed and characterized. The aim of the experiments was to determine the efficacy of such PE for skin decontamination, using *in vitro* experiments on excised pig-ear skin model mounted in Franz diffusion as already described in a previous work (Salerno *et al.*, 2016a).

The interaction of nanoparticles (NPs) with the skin is still a matter of investigation by researchers, since it has been demonstrated that some NPs can penetrate the outer *stratum corneum* layer of the skin, while others can permeate into the deeper dermal layer, reaching the systemic circulation. It is unlikely that metal oxide NPs penetrate intact human skin under normal conditions. The permeation is dependent on the size of the particles (Larese Filon *et al.*, 2015). Therefore, CeO₂ skin permeation was evaluated using a noninvasive method, Confocal Raman Microspectroscopy, when aggregated particles (dry CeO₂) and less aggregated NPs (Pickering emulsion with CeO₂) were applied on the skin.

1. Materials and methods

1.1. Materials

POX (O,O-diethyl p-nitrophenyl phosphate, purity 90%, 1.27 g/mL density) and silicon oil were purchased from Sigma Company. Cerium ammonium nitrate (Ce(NH₄)₂(NO₃)₆, 99.5%) and sodium hydroxide NaOH (98%) were from Alfa Aesar. P-nitrophenol (PNT), 99% purity was from Fischer Scientific Company. Ethanol (96.3%) was obtained from Hexalab. The receptor fluid of Franz cell was composed of Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS, pH=7.4, Gibco). Methanol and acetic acid glacial used in HPLC method were obtained from Fisher Scientific. Guar gum, citric acid and perhydrosqualane oil were from Copper. Diisopropyl adipate, caprylic/capric triglycerides, octyl benzoate and ethylhexyl stearate were from Stearinerie Dubois. Cyclohexasiloxane (PMX 246) was supplied by Xiameter.

1.2. Synthesis of CeO₂ NPs

The synthesis of CeO₂ nanoparticles assisted by hydrothermally treatment was described in a previous study (Boutard *et al.*, 2013). Briefly, 0.5 mol.L⁻¹ cerium ammonium nitrate solution Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ was mixed with a 2 mol.L⁻¹ sodium hydroxide solution. The precipitation was carried out in a microwave digestion system (Multiwave-3000, Anton Paar) at 150°C for 15 min, and at the maximum pressure of 10 bars. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was recovered by centrifugation, washed three times with distilled water and dried at ambient temperature for overnight. The sample was then calcined at 500°C or 600°C in air for 2h. The powders were milled with a mortar and a pestle and stored in glass bottles at room temperature, in the dark. NPs were characterized in our previous study (Salerno *et al.*, 2016a). The resulting CeO₂ have a size of 10 nm but calcination induced aggregation of particles.

1.3. Formulation of Pickering emulsions

PE were prepared at 40 wt% oil fraction. The first step was the dispersion of ceria (10 wt%) in water with ultrasound disperser Sonics VibraCell (BioBlock Scientific, France) during 10 min (5 min “on”, 5 min “off”, 80% amplitude). Seven oils, having a water–oil interfacial tension varying between 13 and 52 mN.m⁻¹ (Table 1), were mixed with the aqueous phases using an UltraTurrax® T25 rotor–stator device equipped with a S25N18G shaft (IKA, Germany) rotating at 10 000 rpm during 10 min. pH of PE was adjusted by adding drops of a solution of citric acid 0.1M in order to be in balance with a skin application (pH=4-8).

Table 1: Physicochemical characterization of oils: surface tension, water–oil interfacial tension, refractive index and density.

Oil	Abbreviation	water–oil interfacial tension (mN/m)	Refractive index	Density
Diisopropyl adipate	DA	13	1.42	0.982
Cyclohexasiloxane (PMX 246)	PMX	18,8	1.40	0.960
Caprylic/capric triglycerides	CCTG	25,6	1.45	0.946
Silicone oil	SIL	29	1.40	0.950
Octyl benzoate	OB	32,2	1.49	0.961
Ethylhexyl stearate	EHS	38	1.45	0.859
Perhydrosqualane	SQU	52,75	1.45	0.814

1.4. Emulsions droplet size distributions

CeO₂ and emulsions droplets size distributions were measured by small angle light scattering using a MasterSizer® 2000 (Malvern, UK). The refractive indices used for the “optical model” were 1.33 for water, 1.55 for CeO₂ NPs, and the refractive indice depending of the nature of the oil (Table 1) for the oil droplets.

1.5. CryoSEM

In order to directly visualize the arrangement of the NPs particles at the interface of emulsion drops, cryo-SEM observations of emulsions were carried out with a FEI Quanta FEG 250 scanning electron microscope equipped with liquid nitrogen cooled sample preparation and transfer units at the “Centre Technologique des Microstructures” (“CTμ”) at the University of Lyon (Villeurbanne, France). A few drops of the emulsion were mounted in a low temperature SEM stub located on a holder and frozen in nitrogen slush. The stub was transferred into the low temperature chamber which was maintained under ultra-high vacuum. The emulsion was fractured. The fractured surface was coated in platinum (10 mA, 105 s, 1 mbar argon) before being transferred to the cold stage ($-170\text{ }^{\circ}\text{C}$) of the SEM.

1.6. *In vitro* skin decontamination of Paraoxon

1.6.1. Preparation of skin samples

Pig-ears were collected immediately after animals were killed. They were stored at -20°C for a maximum period of one year. On the day of the experiment, the pig-ears were thawed at room temperature and the skin samples were cut into 4.52 cm^2 circular pieces. Full-thickness unclipped skin was used. The thickness was measured with a micrometer (Mitutoyo). The thicknesses of pig-ear skin membranes were $1.1 \pm 0.15\text{ mm}$.

1.6.2. Exposure to POX and decontamination of pig-ear skin

The skin samples were mounted on Franz-type static glass diffusion cells. The cells were maintained at 36°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The skin samples were divided into groups of 8 biological replicates from 4 different donors. The membrane area available for diffusion was 2.54 cm^2 . After 30 minutes equilibration with the receptor fluid, the skin integrity was assessed by measuring the trans-epidermal water loss (Tewameter® TM210, Monaderm). In agreement with the OECD guidelines (OECD, 2004), only the skin samples with TEWL values ranging between 3 and $10\text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ were used in this work. This permeability is comparable to a fresh skin specimen (Dennerlein *et al.*, 2012). The donor compartment remained open during the time of the experiment. Experiments were conducted under a fume hood (air extraction velocity: 0.5 m/s) at ambient temperature and with a relative humidity of $46 \pm 7\%$.

$25.4\text{ }\mu\text{L}$ of POX were applied on the centre of the unclipped pig-ear skin surface. This resulted in an applied dose of $Q_0 = 46.6\text{ }\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (or $10\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$). The decontamination was achieved

after 1 hour. 260 μ L of PE stabilized by CeO₂ were rubbed on the skin surface with a circular motion for 10 sec with a 1.5 cm * 1.5 cm sponge. PE was let stand on the skin for 2 min. Excess decontaminant was then removed with a second sponge and absorbent paper. The POX permeation study was then carried out for 24h, in order to determine the impact of the decontamination process. A skin sample without any decontamination was used as control.

1.6.3. Collection and treatment of samples

At the end of the experiment, the receptor fluid was collected (“receptor fluid RF”).

Then, skin samples were removed from the diffusion cells. The surface of skin samples was gently wiped 2 times with a piece of absorbent paper (Wypall, Kimberly Clark) in order to recover the fraction of POX remaining on the skin surface. The absorbent paper was then placed in 20 ml ethanol (“skin surface”).

The first strip was removed using D-Squame tape (Monaderm). The strip was placed in 10 mL ethanol (“first strip”).

In order to remove the *stratum corneum*, cyanoacrylate glue (Loctite SuperGlue-3, Henkel) were spread on a glass plate, according to the method of cyanoacrylate surface biopsies (Förster *et al.*, 2011, Otberg *et al.*, 2004). After separation, the *stratum corneum* stuck on a glass plate was placed in 10 ml ethanol (“stratum corneum”).

The viable epidermis was separated from the dermis by heat treatment (45s in water at 60°C) (SCCS/1358/10). The dermis was cut into small pieces and placed in 4 mL of ethanol (“dermis”). Viable epidermis was placed separately in 2 mL of ethanol (“viable epidermis”).

The extraction of POX and PNT last for overnight at room temperature.

After each extraction, aliquots of 1 mL were filtered on Nylon membrane disc filters (20 μ m pore-size, 13 mm diameter) before HPLC quantification. Receptor fluid, skin surface and first strip fractions were previously diluted in 1/2, 1/100, 1/10 in ethanol, respectively.

1.6.4. Quantification of POX and PNT by HPLC-UV

Concentrations of POX and PNT were determined by liquid chromatography using the quaternary pump (Waters 600 Controller), auto sampler (model 717 plus Auto sampler), column heater (Waters temperature control module), and Photodiode array detector (Waters 2996). Operated at 40 °C, the column used was a XTerra MS C18 Cartridge column (5 μ m, 4.6 mm x 250 mm). The composition of mobile phase was 65% of methanol (HPLC-grade, Fisher Scientific) and 35% of deionized water with 0.5% of acid acetic (acetic acid glacial and

ultrapure analytical grade type 1 water, $r > 17 \text{ m}\Omega/\text{cm}$) (v/v). Total run time was 10 min at a flow rate of 0.7 mL/min. Injection volume was 10 μL . Compound identification was accomplished by comparison of retention time (PNT has a retention time of 5.5 min and POX of 7.2 min) and UV absorption behavior (PNT was monitored at 314 nm and POX at 269 nm). Signal quantification was carried out in the peak height mode. Data collection and analysis were performed using Empower Pro software. Under the given conditions, the limits of detection were 420 and 750 pg for POX and PNT, respectively. The coefficients of variation of repeatability were 0.5 and 0.1 % for POX and PNT, respectively, at a concentration level 10 g/L.

For the quantification of PNT in skin samples, the initial POX product (90% purity) applied on the skin contains approximately 3% of PNT. This quantity of PNT was deduced to the total quantity of PNT quantified by HPLC-UV for each skin.

1.6.5. Efficacy of a skin decontaminant

An effective skin decontamination product will be described as a decontaminant which: (i) decrease the quantity of contaminant absorbed into the skin, and/or (ii) has an ability to degrade the contaminant present on and into the skin. The non-absorbed fraction (sum of the quantities of POX present on the skin surface and in the first strip) is the fraction considered as removable from the skin. On the contrary, the absorbed fraction (*i.e.* from the *stratum corneum* to receptor fluid) is the quantity of POX which potentially moves into the blood. This is why, for each decontamination experiment, the quantities of POX in the non-absorbed fraction and in the absorbed fraction have been compared.

The improvement factor of functional prognosis (FP) of each decontaminant system have been compared and calculated as follows:

$$FP = \frac{Q_{2T} + Q_{3T} + Q_{4T}}{Q_2 + Q_3 + Q_4}$$

Where:

Q_2 = the amount of POX present on the skin surface immediately after the decontamination process, Q_{2T} for control samples

Q_3 = the amount of POX in the skin (*i.e.* sum of the quantities in *stratum corneum*, viable epidermis and dermis) at the end of the experiment, Q_{3T} for control samples

Q_4 = the amount of POX resorbed (*i.e.* in RF) at the end of the experiment, Q_{4T} for control samples

The more FP increases, the more the functional prognosis is improved.

1.7. Skin permeation of CeO₂

1.7.1. Preparation of skin samples

The *in vitro* absorption of dry CeO₂ and PE on intact pig-ear skin was carried out by using the same protocol as 2.6 except that skin were not exposed to POX. The skin samples were divided into groups of 3 biological replicates from 3 different donors. CeO₂ permeation study was then carried out for 24h. At the end of the experiment, the receptor compartment was connecting to an infusion bag in order to keep the skin hydrated during Raman acquisition.

1.7.2. Raman data acquisition

The presence of the NPs in the *stratum corneum* layer was performed with Confocal Raman Microspectroscopy (MCR) (LabRAM HR®, Horiba scientific) and a confocal microscope probe (BXFM Olympus). The objective used in this experiment had a long working distance of magnitude 100x. The excitation source was a red 785 nm laser. The acquisition time was about 30 s, with a 600 gr/mm grating, and covered the signals corresponding to the skin (including a characteristic peak at 1000 cm⁻¹) and the peak corresponding to ceria (463 cm⁻¹). Spectra were recorder from the surface up to 30 μm under the surface. The baseline was corrected using an automatic polynomial function. For each Z, 3 or 5 spectra were acquired. For each skin sample, the profile of CeO₂ penetration was performed on three different point on the skin surface.

1.8. Data analysis

The amounts of POX and PNT were expressed as quantity per cm² piece of skin (μmol/cm²) recovered in the receptor fluid, skin surface, first strip, *stratum corneum*, viable epidermis, and dermis. The means of all data are indicated with their standard error of the mean (S.E.M., n=8 biological replicates for skin decontamination studies).

For CeO₂ skin permeation using MCR, the ratio I_{463}/I_{1000} (ratio intensity of the peak at 463 cm⁻¹/ intensity of the peak at 1000 cm⁻¹) reflects the presence of ceria in the skin. The means of the ratio for each Z is indicated with their standard error of the mean (S.E.M., n=3 biological replicates).

Because the quantities of POX in each fraction (receptor fluid, skin surface, first strip, *stratum corneum*, viable epidermis, dermis, total, absorbed fraction and non-absorbed fraction) do not follow a normal distribution and variances were not equal, a non-parametric Mann-Whitney

test ($p < 0.05$) was applied to check if decontaminant systems reduced significantly the POX fraction compared to the control.

2. Results

2.1. Physicochemical properties of PE

For the synthesis of PE, 40 wt% of oil was emulsified into a 10 wt% aqueous suspension of CeO_2 . Using diisopropyl adipate, PMX 246, silicone oil or hydrosqualane as oil phase, pure oil was observed on top of the emulsion which means that fast coalescence of oil droplets took place. With OB (PE-OB), CCTG (PE-CCTG) and EHS (PE-EHS), the full oil was dispersed as a milky o/w emulsion. Stable PE were characterized for their droplet and CeO_2 aggregates size distributions (Fig. 1, Table 2).

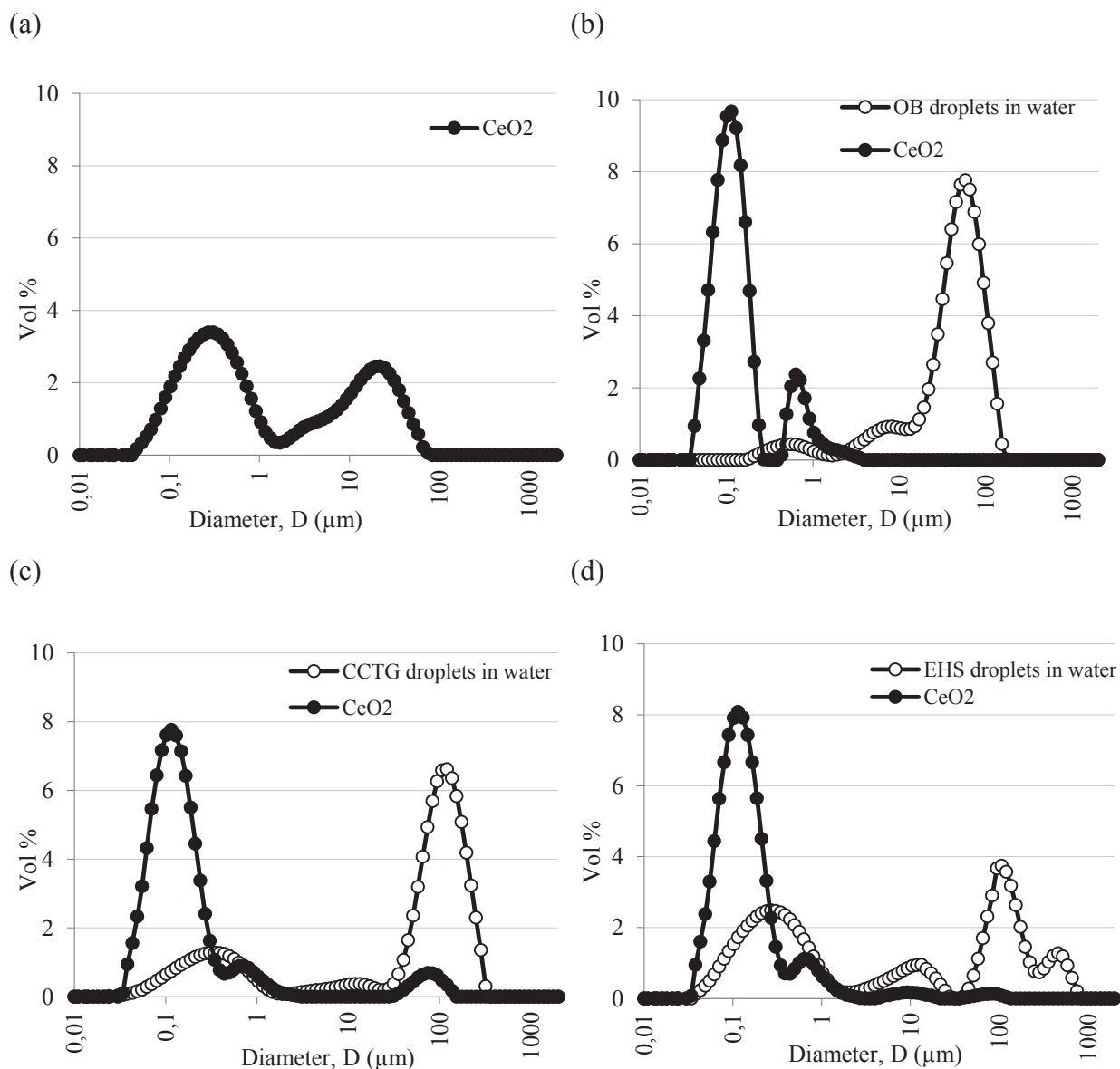


Fig. 1 : ● CeO₂ size distributions and ○ oil droplets size distribution for (a) water + 10 wt% CeO₂ ; (b) water + 40 wt% OB + 10 wt% CeO₂ (PE-OB); (c) water + 40 wt% CCTG + 10 wt% CeO₂ (PE-CCTG); (d) water + 40 wt% EHS + 10 wt% CeO₂ (PE-EHS) (mean curve for three repetitions). Note that refractive indices of oils and ceria are close: some populations may correspond to ceria particles in the curves “oils droplets in water”; likewise, some populations may correspond to oil droplets in the curves “CeO₂ in water”.

Table 2: Mean diameter size of the different population of CeO₂ aggregates and oil droplets (the number in brackets refers to the vol% of population which has the corresponding diameter size)

	size of CeO ₂ aggregates (μm)	size of oil droplets (μm)
Aqueous suspension (10 wt% CeO ₂)	0.31 (59%) 18 (41%)	/
PE-OB	0.12 (85%) 0.63 (15%)	8.2 (10%) 65 (84%)
PE-CCTG	0.12 (88%) 0.71 (12%)	10.5 (5%) 120 (72%)
PE-EHS	0.12 (90%) 0.71 (10%)	12 (12%) 106 (32%) 522 (7%)

CeO₂ have been dispersed in water with two ultrasound cycles in order to break the aggregates. The suspension was subjected to other ultrasonic cycles but no improvement was observed. We noted two distinct populations: one with a mean size of 310 nm (59 vol%), and another with a mean size of 18 μm (41 vol%).

PE had different distinct populations as showed by small-angle light scattering (Fig. 1, Table 2). Sedimentation of CeO₂ particles was observed in all PE showing an excess of CeO₂ aggregates in the aqueous phase.

Two populations, corresponding to the oil droplets stabilized by CeO₂ particles, were observed for PE-OB and PE-CCTG. One large population had a mean droplet size of 60-120 μm. A second small population had a mean droplet size of 8-10 μm. Creaming of these large emulsion droplets was observed on top on the emulsion. Creaming is not disruptive because a simple agitation enabled to reform the emulsion.

For PE-EHS, three populations corresponding to the oil droplets have been detected. These populations have a mean diameter of 12, 106 and 522 μm . This large emulsion droplets can leads to coalescence.

2.2. CryoSEM observations

CryoSEM images of the three emulsions are presented in Fig.2.

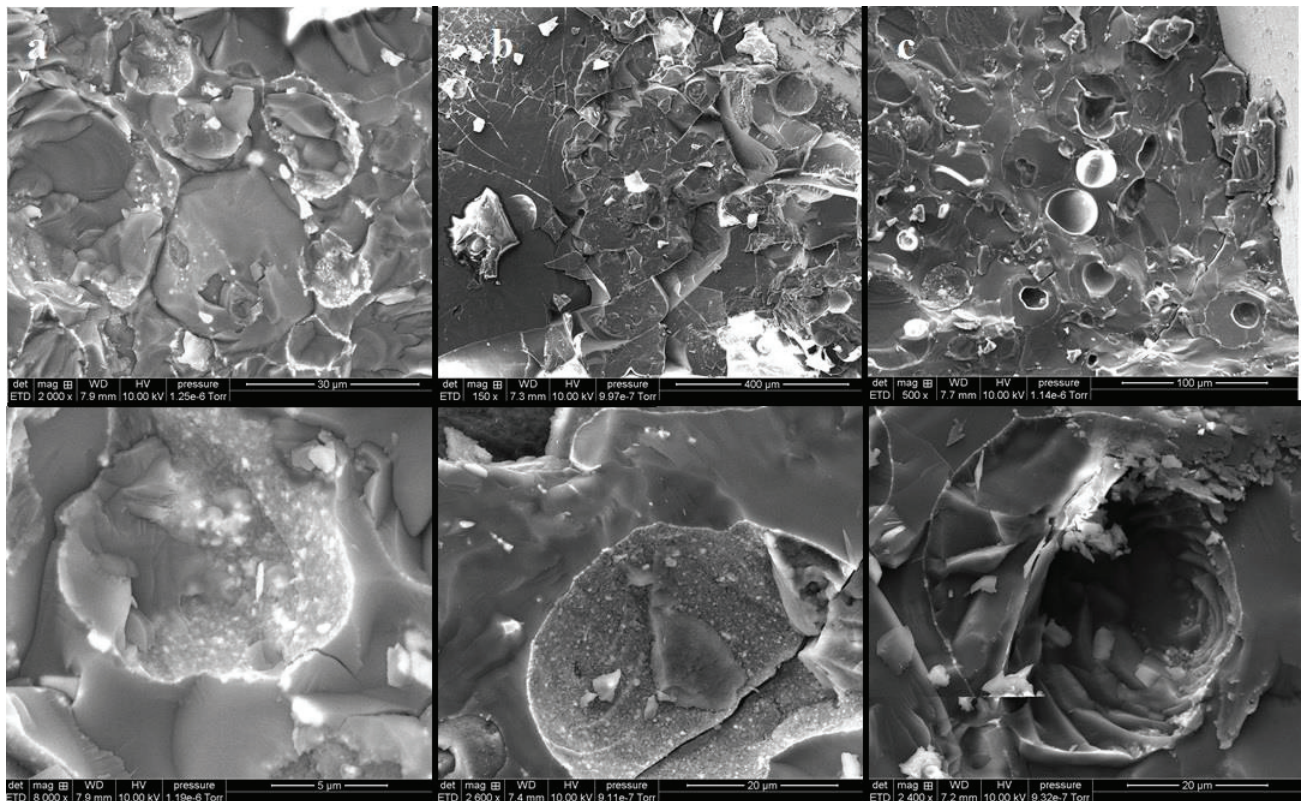


Fig. 2: Cryo- SEM images of OB (a), CCTG (b) and EHS (c) emulsions drop in water covered by 10 wt% ceria particles.

During fracturing, the frozen oil has been removed allowing direct visualization of the particles residing at the interface (Fig. 2). Cryo-SEM is one of the most advantageous techniques for examination of the interfacial structure of emulsion samples (Binks & Kirkland, 2002, Mikula & Munoz, 2000). In Fig. 2, for typical intact oil droplets stabilized by CeO_2 particles, rough surfaces with indentations can be seen. Discrete spherical dots with dimension of around 200–300 nm can be clearly observed on the surface of emulsion droplets, suggesting the anchoring of CeO_2 onto droplet surface. Only, cryo-SEM images of PE with EHS did not allowing direct visualization of the particles at the interface and were rejected.

2.3. *In vitro* skin decontamination of Paraoxon using PE

The quantities of POX (expressed as μmol of POX per cm^2 piece of skin) recovered in each skin layer have been compared for the different formulations (Table 3 and Fig. 3). The skin decontamination efficiency of dry CeO_2 (36 mg) and an aqueous suspension of CeO_2 (10 wt%) containing 1 wt% of guar gum ($\text{CeO}_2\text{-W}$) was already evaluated in a previous study (Salerno *et al.*, 2016a) in the same conditions. In a general point of view, the skin decontamination procedures significantly reduced the amount of POX whatever the products used. Indeed, after decontamination, POX recovered in skin surface fraction is largely decreased and the total amount of POX was reduced by at least a factor of 13 compared to the control skin. On another hand, it led to a significant increase in RF compartment for CeO_2 , PE-OB and PE-CCTG.

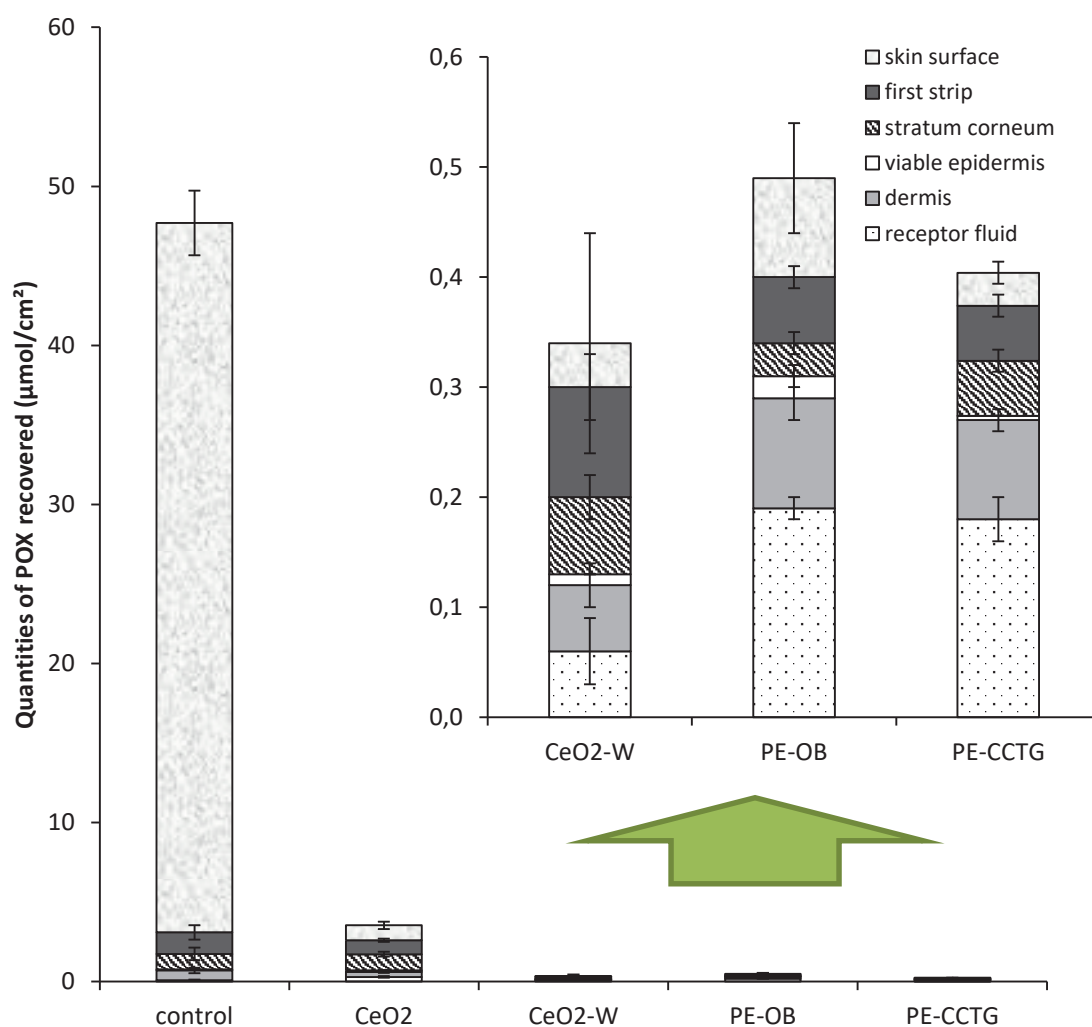


Fig. 3: *In vitro* distribution of POX through pig-ear full thickness unclipped skin 24 h after an exposure to POX ($Q_0 = 46.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) with a decontamination at 1 h using PE (10 wt% NPs) with 40%wt OB (PE-PB) or 40%wt CCTG (PE-CCTG). For control and skins decontaminated

using dry CeO₂ and aqueous dispersion of CeO₂ thickened (CeO₂-W), results are taken from Salerno *et al.* (2016a). Results are expressed as quantities (μmol) of POX recovered per cm² piece of skin (means ± S.E.M, n=8) (* significant difference with control, Mann-Whitney test, p<0.05)

Table 3: *In vitro* distribution of POX through pig-ear full thickness unclipped skin 24 h after an exposure to POX (Q₀ = 46.6 μmol/cm²) with a decontamination at 1 h using PE (10 wt% NPs) with 40%wt OB (PE-PB) or 40%wt CCTG (PE-CCTG). For control and skins decontaminated using dry CeO₂ and aqueous dispersion of CeO₂ thickened (CeO₂-W), results are taken from Salerno *et al.* (2016a). Results are expressed as quantities (μmol) of POX recovered per cm² piece of skin (means ± S.E.M, n=8) (* significant difference with control, Mann-Whitney test, p<0.05)

	control	CeO ₂	CeO ₂ -W	PE-OB	PE-CCTG
skin surface	44.60 ± 2.03	0.94 ± 0.23*	0.04 ± 0.1*	0.09 ± 0.05*	0.03 ± 0.01*
first strip	1.36 ± 0.45	0.88 ± 0.10	0.10 ± 0.03*	0.06 ± 0.01*	0.05 ± 0.01*
<i>stratum corneum</i>	0.97 ± 0.39	1.02 ± 0.15	0.07 ± 0.02*	0.03 ± 0.01*	0.05 ± 0.01*
viable epidermis	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.01 ± 0.00*	0.02 ± 0.01*	0.004 ± 0.0002*
dermis	0.61 ± 0.17	0.31 ± 0.06	0.06 ± 0.02*	0.10 ± 0.02*	0.09 ± 0.01*
receptor fluid	0.09 ± 0.03	0.29 ± 0.05*	0.06 ± 0.03	0.19 ± 0.01*	0.18 ± 0.02*
Total	47.69	3.54*	0.33*	0.49*	0.40*
Non absorbed fraction	45.96	2.84*	0.21*	0.15*	0.08*
Absorbed fraction	1.74	0.69	0.12*	0.34*	0.32*
FP	1	9.4	93.1	59.6	68.3

Compared to dry CeO₂ (FP=9.4), skin decontamination with liquid formulations (FP>60) decreased significantly the quantity of POX in each fraction except in the *stratum corneum* layer. The quantity of POX absorbed through the skin was reduced at least 14 times using CeO₂-W and 5 times using PE.

Including oil in the formulation did not improve factor of functional prognosis (FP) compared to CeO₂-W (FP~60 for PE vs FP=90 for CeO₂-W). Moreover, PE significantly increased the quantity of POX in the RF compartment (from 0.09 μmol/cm² for the control to 0.18 μmol/cm² using PE as skin decontaminants) which was not the case with CeO₂-W (0.06 μmol/cm² of POX in RF).

The nature of the oil only affected the fraction of POX recovered in the viable epidermis: 0.020 μmol/cm² of POX were recovered using PE-OB and 0.004 μmol/cm² with PE-CCTG.

2.4. POX degradation through pig-ear skin using decontamination systems

Fig. 4 shows the quantities of PNT produced. It reflects the degradation activity of each decontaminant system.

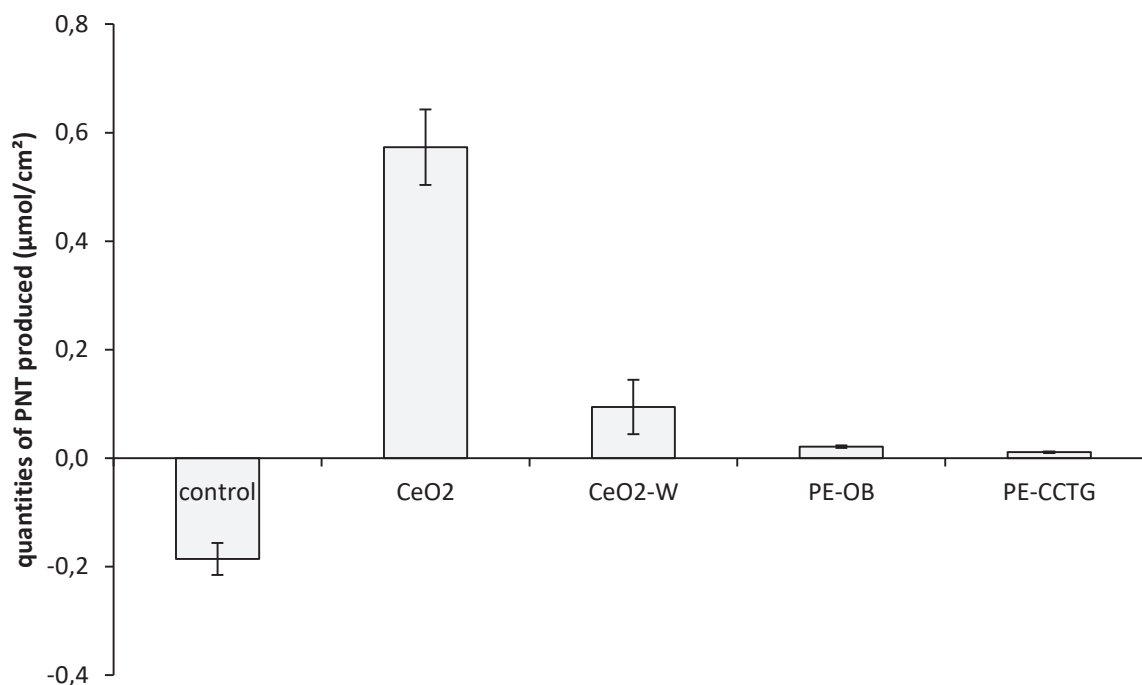


Fig. 4: Production of PNT through a pig-ear skin 24 h after an exposure to POX ($Q_0 = 46.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) with a decontamination at $t=1$ h using PE (10%wt NPs) with 40%wt OB (PE-PB) or 40%wt CCTG (PE-CCTG). For control and skins decontaminated using dry CeO_2 and aqueous dispersion of CeO_2 thickened ($\text{CeO}_2\text{-W}$), results are taken from Salerno *et al.* (2016a). Results are expressed as means \pm S.E.M ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$), $n=8$.

Dry ceria was the more efficient product for the degradation of the toxic (15% of POX which remained after decontamination where degraded into PNT). The $\text{CeO}_2\text{-W}$ was less efficient for the degradation of POX (10% of POX degraded into PNT).

By contrast, skin decontamination using PE did not promote the degradation of POX. Less than $0.02 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ of PNT were quantified.

2.5. Skin absorption of CeO₂

Ratios of I_{463}/I_{1000} as a function of skin relative depth 24 h after an application of dry CeO₂ and the corresponding PE are shown in Fig. 5.

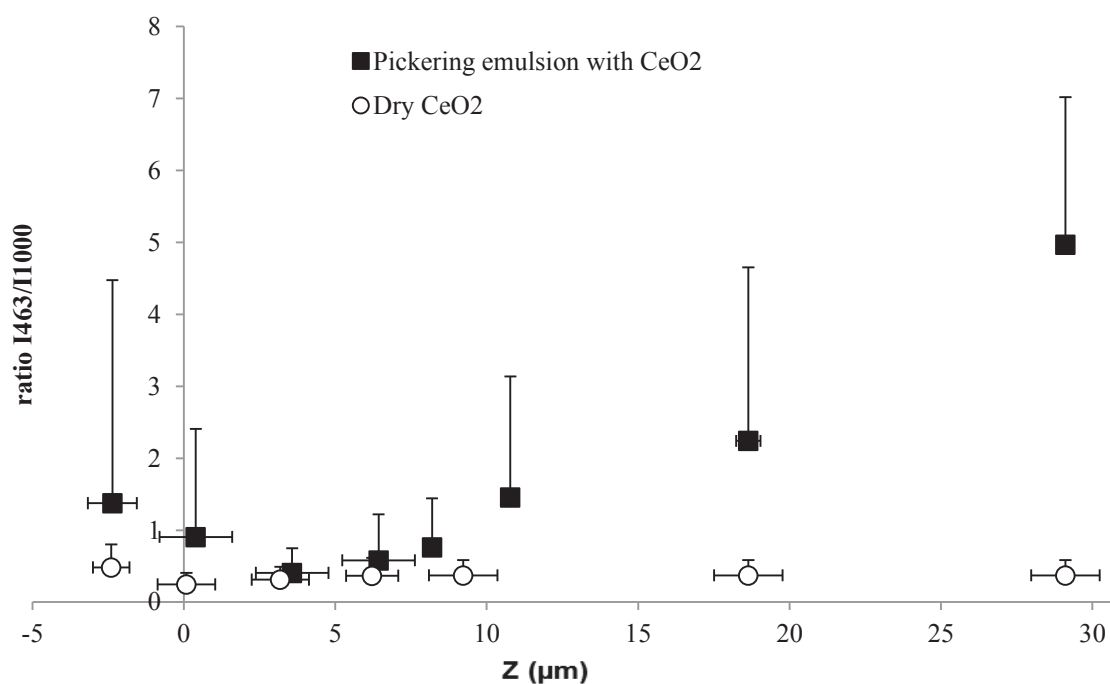


Fig. 5: Ratios of I_{463}/I_{1000} as a function of skin relative depth 24 h after an exposure to dry CeO₂ and the corresponding PE (40 wt% oil, 10%wt NPs). Results are expressed as a means \pm SEM.

Dry ceria NPs (10 nm diameter forming agglomerates of 10 μm) does not penetrate inside the skin. The peak of ceria (463 cm^{-1}) was only observed on top of the skin ($Z=-2\ \mu\text{m}$). The ratios I_{463}/I_{1000} in the skin are on average of 0.5, showing that the peak of CeO₂ is two times less intense than that of the skin and blends with the background noise spectrum.

Included in PE, the CeO₂ is found beyond 30 μm under the surface of the skin. The intensity ratio increases from 3 μm beneath the skin's surface. Thus, PE penetrate deeper into the skin than the powder form and beyond the *stratum corneum* layer.

3. Discussion

The choice of the galenic formulation is therefore an important decision for skin decontamination which must satisfy several criteria:

- the decontaminant system must enable the OP to be removed from the skin by adsorption or skin wash during the decontamination process;

- it must be easy to use in case of mass decontamination;
- it must not promote the skin permeation of the toxic/ reduce the fraction of POX absorbed through the skin,
- ideally, it could decompose several OP compound into less toxic or nontoxic chemical molecule(s).

3.1. Choice of the galenic form for skin decontamination

The adsorption of NPs is largely dependent of its specific surface area. The CeO₂ synthesized has a low specific surface area equal to 5.4 m²/g (Salerno *et al.*, 2016a) due to aggregation during the calcination process (Tok *et al.*, 2007; Djuriclic *et al.*, 1999; Renuka, 2012). Its specific surface area is really low for nanometric particles and limits its adsorption capacity. For comparison, FE designed to adsorb OP compounds on a surface, has a specific surface area of approximately 120-140 m²/g (Bajpai & Vishwakarma, 2003). As POX is hydrophobic (log P = 2.3), its elimination from the skin surface is favoured with an amphiphilic system as PE. In this kind of emulsion, the classical emulsifier has been replaced by solid particles as CeO₂ which adsorb onto the surface of oil droplets and stabilize the oil/water interface. This emulsion combines the hydrophobic behavior of emulsions as decontaminant systems where POX can solubilize in the oil phase, and the adsorption potency of the stabilizing particles. Solid particles, located at the surface of the dispersed oily droplets of the PE, make them highly available for adsorption (Spagnul *et al.*, 2010).

We decided to formulate PE at 40 wt% oil fraction to ensure a high viscosity and thereby an easier skin application (Frelichowska *et al.*, 2009b). If the oil fraction was increased, it would have led to water in oil emulsion which will be harder to rid the skin of excess decontaminant. Moreover, PE may be dispersed as aerosols, which can be even more easy to use in case of mass decontamination.

3.1.1. Formulation of stable PE

Adsorption of solid particles at the oil–water interface requires the partial wetting of the solid by water and oil. A very hydrophilic surface of the solid particles would be totally wet by water, so that the solid particles do not adsorb because they remain dispersed in the aqueous phase of the emulsion. On the same footing, too hydrophobic particles are totally wet by the oil (Chevalier & Bolzinger, 2013; Finkle *et al.*, 1923; Binks & Honozov, 2006). CeO₂ expose the (111), (110), and dipolar (100) surfaces. (100) face is almost uncharged in the accessible range

of pH (1.0-14.8) and can be written Ce-OH^0 . Below $\text{pH}=1.0$, CeO_2 can adsorb proton (“ $\text{Ce}_2\text{-OH}_2^{+1}$ ”). Above $\text{pH}=14.8$, $\text{Ce}_2\text{-OH}^0$ is deprotonated into $\text{Ce}_2\text{-O}^{-1}$ (Nabavi *et al.*, 1993). The (111) face contains one heptacoordinated cerium and one tricoordinated oxygen. An adsorbed water molecule may split with the hydroxyl binding to a cerium and the proton to a surface oxygen. This face is positively charged below $\text{pH}=5.5$, zwitterionic between 5.5 and 10.4, and negatively charges above 10.4 (Nabavi *et al.*, 1993). On (110) face, the protonation reactions of these sites are similar to 111 face, the only difference is that the density of sites is higher because this face contains one hexacoordinated cerium and two tricoordinated oxygens (Nabavi *et al.*, 1993). $\text{CeO}_2\text{-W}$, PE-OB and PE-CCTG had a pH of 10.06, 5.84 and 6.54, respectively. Thus CeO_2 is protonated at its surface, hydrophilic but uncharged in all the formulations.

The water–oil interfacial tension can be taken as a relevant criterion for selection of oils that are successfully emulsified in water with the help of solid particles (Frelichowska *et al.*, 2009a). Seven oils had been selected thanks to their different water–oil interfacial tension. Polar oil has a low water–oil interfacial tension and vice versa. Stable PE were obtained with OB, CCTG and EHS, oils with median water–oil interfacial tension (25-38 mN/m) with mono ester function. On another hand, silicon oil, which has a water-oil interfacial tension of 29 mN/m, did not form a stable PE. Silicon oil does not contain an ester function. The interaction between ester function and CeO_2 surface seems needed to favour stable PE.

3.2. Prevent the skin permeation of POX

In drug therapy, the goal of galenic formulations containing pharmacologically active components is to overcome the *stratum corneum* barrier. In our case, skin decontaminant must not enhance skin permeation of POX during skin permeation study. Secondly, during the skin decontamination process, CeO_2 must bind POX molecules in order to favour its degradation on the skin surface.

3.2.1. Possible interactions of POX with NPs

The role of CeO_2 is to interact with the phosphate group of POX for its elimination during skin decontamination process. It is well known that CeO_2 can form complexes with molecules containing phosphate groups (Dahle *et al.*, 2015, Ogata *et al.*, 2011; Recillas *et al.*, 2012) via electrostatic or acido-basic interactions. Thus, we considered that the interaction of CeO_2 only took place with phosphate groups of POX.

The pH of PE and the aqueous suspension (CeO₂-W) were different. Owing to the pK_a of phosphate groups, pH of PE (pH=6.5 for PE-CCTG and pH=5.8 for PE-OB) favoured the form H₂PO₄⁻. The pH of CeO₂-W has not been adjusted for skin application and has a pH of 10. Thus, phosphate group is more negatively charged (HPO₄²⁻) at the basic pH of the CeO₂-W. In PE and CeO₂-W, CeO₂ is in its neutral form in all its face ((100), (111) and (100)) (Misak *et al.*, 1990; Nabavi *et al.*, 1993). Electrostatic repulsion or interaction cannot take place between anionic POX and neutral CeO₂ (Ce-OH⁰).

Another effect comes from the non-electrostatic interactions between the neutral forms of POX with the surface of the solid particles. Such interactions mainly include Lifshitz–van der Waals forces (components of dispersion called London dispersion forces, induced dipole and polarization) and polar interactions through acid-base interactions (hydrogen bonding) as estimated through contact angle measurements. They are expressed using the surface free energy components of the CeO₂ NPs. The interactions between POX and CeO₂ coming from dispersion forces is quite important because the dispersive component of the surface energy for CeO₂ is $\gamma^{LW} = 49.8 \text{ mJ.m}^{-2}$ (Veriansyah *et al.*, 2011). The Lewis acid (γ^+) and Lewis base components (γ^-) of the surface energy for NPs are 0.12 mJ.m⁻² and 65.61 mJ.m⁻², respectively (Veriansyah *et al.*, 2011), showing that CeO₂ essentially has monopolar basic surface that can only do acid-base interactions with acidic molecules. Therefore, during skin decontamination process, CeO₂ is able to adsorb the protonated form POX in PE (H₂PO₄⁻) or CeO₂-W (HPO₄²⁻) via London dispersion forces and hydrogen bonding.

3.2.2. Inclusion of oil in skin decontaminant system

It is assumed that the inclusion of oil, hydrophobic as POX, could help the extraction of the toxic agent compared to aqueous dispersion of solid particles. In the present case, the total fraction of POX recovered in all the fraction is not significantly different when CeO₂-W or PE were used. The addition of the oil phase in PE (no matter which oil: CCTG or OB) did not improve the efficacy of the system compared to CeO₂-W, meaning that the oil might not act on skin decontamination as expected. This result is in accordance to Spagnul *et al.* (2010) who demonstrated that a simple oily solution extracts only about 7% of the uranium from the contaminated skin. Moreover, PE increased significantly the quantities of POX absorbed through the skin and in the RF fraction. The *stratum corneum* comprises keratinized cells which are chemically resistant and impenetrable. Polar and nonpolar molecules diffuse through the *stratum corneum* by two different mechanisms. Water-soluble compounds appear to diffuse through the outer surface of the hydrated keratinized layer. Lipid-soluble compounds dissolve

in and diffuse through the *stratum corneum* layer. Amphiphilic molecules as PE penetrate easily since they have an affinity for the *stratum corneum* and viable epidermis (Naik *et al.*, 2000). Thus, PE contribute to improve the penetration of POX through the skin. One possible mechanism of POX penetration through skin is the transport by the solid particles. Particles at the interface oil/water or in oil phase are much more hydrophobic (through interaction with ester groups from OB or CCTG) than excess of particles dispersed in water medium. POX can indirectly bind CeO₂ via hydrophobic interactions with oil. Thus, ceria could promote the transport of POX through the dispersing phase of the emulsion.

3.3. Skin permeation of CeO₂ NPs

Nanoceria is receiving much attention as a potential antioxidant agent *in vivo*, because of the possibility to regenerate the initial oxidation state through redox cycling reactions (Karakoti *et al.*, 2010; Celardo *et al.*, 2011). Initial biological studies have highlighted neuro cells protective (Das *et al.*, 2007), cardio cells protective effects (Niu *et al.*, 2007) or anti-inflammatory properties (Hirst *et al.*, 2009). However, even if its cytotoxicity was not strongly demonstrated, it is unlikely that metal oxide NPs as CeO₂ penetrate intact human skin under normal conditions. In a general point of view, NPs ≤ 4 nm can penetrate and permeate intact skin, NPs size between 4 and 20 nm can potentially permeate intact and damaged skin, NPs size between 21 and 45 nm can penetrate and permeate only damaged skin, NPs size > 21 nm cannot penetrate not permeate intact skin (Larese Filon *et al.*, 2015).

We demonstrated that dry ceria do not penetrate the *stratum corneum* layer of the skin. The CeO₂ is made up of particles with a mean diameter of 9 nm (Salerno *et al.*, 2016a) which can potentially permeate pig-ear skin. Nevertheless, calcination induced aggregation of NPs and surely prevents penetration of ceria in the skin. NPs, placing at the interface between oil and water, are less aggregated than the raw particles and can penetrate the skin. Bennet *et al.* (2012) demonstrated that penetration of NPs into and through the entire dermal profile of porcine skin *in vitro* is higher when a solution of TiO₂ NPs, previously disaggregated by photo induction, is used.

Moreover, amphiphilic formulation as PE penetrates easily in the skin and probably enhances skin permeation of ceria.

Breaking up of emulsion droplets at the skin surface was a possible source of small free CeO₂ particles that could penetrate the skin. Microparticles of size ranging from 3 to 10 μm only penetrate into hair follicles (Rolland *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1989, 1990). A minority percentage of oil droplets in PE-OB and PE-CCTG have a size lower than 10 μm and can

permeate the skin via hair follicles pathway. However, the mean diameter of CeO₂ aggregates in PE was 100 nm, much smaller than aggregates in the raw particles, and can permeate the skin through hair follicles. The bond between CeO₂ and oil allow favourable interactions with the *stratum corneum* lipids and consequently make the penetration easier.

3.4. Degradation of POX

The degradation activity of CeO₂ against POX when PE are used as skin decontaminant is practically non-existent compared to dry form. However, the hydrogen bonding between CeO₂ and POX in PE should favoured its adsorption and degradation into PNT. Indeed, the predominance of hydrogen bonding for the adsorption and catalysis of CWA molecules to metal oxide NPs has been acknowledged (Kumar *et al.*, 2013; Henych *et al.*, 2015).

Many mechanisms can explain this observation. The first one is that the addition of an oil phase favoured the hydrophobic interaction of POX with oil or the interaction of CeO₂ with oil (which seems needed to favour stable PE) over interactions of POX with CeO₂. If there is no adsorption of POX on CeO₂ particles, catalytic degradation of POX into PNT cannot occurs.

A second approach is that penetration rate of CeO₂ or POX is higher than skin permeation of the other one. POX degradation is relatively slow in aqueous condition, the difference of skin permeation between POX and CeO₂ do not favour an extended interaction and the degradation of POX.

Finally, hydrolysis of CWA is low at neutral or acidic pH and can be accelerated at basic pH (Gomaa H.M. & Faust S.D., 1972). The hydrolysis of CWA can occur with a nucleophilic attack of the hydroxide ions on the phosphorus atom. Thus, the catalysis of POX hydrolysis with CeO₂ NPs is less efficient in PE.

4. Conclusion

To conclude, PE containing 10 wt% of CeO₂ were successfully prepared using OB or CCTG, oils with medium interfacial tension against water (25 et 38 mN.m⁻¹). PE caused large skin absorption of CeO₂ beyond the *stratum corneum*. The study emphasizes the importance of the galenic formulation which can promote the penetration of NPs through the skin and have an impact on the decontaminant efficiency of NPs. It would be interesting to study the decomposition of other OP by CeO₂.

Acknowledgments

We thank Direction Générale de l'Armement (DGA) for their financial support. Mrs Catherine Bosser, Dr. Thierry Hoc from LTDS (Ecole Centrale of Lyon) and Mr. Pierre-Yves Dugas from C2P2 (Université Lyon 1) are thanked for Raman measurements and Cryo-SEM observations.

References:

- Alvarez-Román, R., Barré, G., Guy, R.H., Fessi, H., 2001. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 191–195.
 - Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H., Fessi, H., 2004. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm. Res.* 21, 1818–1825.
 - Anslyn, E.V. & Dougherty, D.A., 2006. *Modern Physical Organic Chemistry*. Ed. University Science Books. Sausalito, California. 1095 p.
 - Aveyard, R., Binks, B.P., Clint, J., 2003. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 100-102, 503-546.
 - Bajpai, A.K., Vishwakarma, N. 2003. Adsorption of polyvinyl alcohol onto Fuller's earth surfaces. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 220: 117–130.
 - Bandosz, T.J., Laskoski, M., Mahle, J., Mogilevsky, G., Peterson, G.W., Rossin, J.A., Wagner, G.W., 2012. Reactions of VX, GD, and HD with Zr(OH)₄: Near Instantaneous Decontamination of VX. *J. Phys. Chem. C.* 113, 11606-11614.
 - Bennett, S.W., Zhou, D., Mielke, R., Keller, A.A., 2012. Photoinduced disaggregation of TiO₂ nanoparticles enables transdermal penetration. *PLoS One* 7 (11), e48719.
 - Binks, B. P., & Kirkland, M., 2002. Interfacial structure of solid-stabilised emulsions studied by scanning electron microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics.* 4(15) : 3727-3733.
 - Binks, B.P. & Horozov T.S., 2006. *Colloidal Particles at Liquid Interfaces*. Cambridge University Press.
- Bjarnason, S., Mikler, J., Hill, I., Tenn, C., Garrett, M., Caddy, N., Sawyer, T.W., 2008. Comparison of selected skin decontaminant products and regimens against VX in domestic swine. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 253-261.
- Boutard, T., Rousseau, B., Couteau, C., Tomasoni, C., Simonnard, C., Jacquot, C., Coiffard, L.J.M., Konstantinov, K., Devers, T., Roussakis, C., 2013. Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO₂. *Mater. Lett.* 108, 13–16.
 - Braue, E.H., Smith, K.H., Doxzon, B.F., Lumpkin, H.L., Clarkson, E.D., 2011. Efficacy studies of reactive skin decontamination lotion, m291 skin decontamination kit, 0.5% bleach, 1% soapy water, and skin exposure reduction paste against chemical warfare agents, part 1: guinea pigs challenged with VX. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 30, 15-28.
 - Celardo, I., Pedersen, J.Z., Traversa, E., Ghibelli, L., 2011. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 3, 1411.
 - Chevalier, Y., Bolzinger M.A., 2013. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 439: 23–34.
 - Chilcott, R.P., Jenner, J., Hotchkiss, S.A., Rice, P., 2001. *In vitro* skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J. Appl. Toxicol.* 21, 279-283.

- Dahle, J.T., Livi, K., Arai, Y., 2015. Effects of pH and phosphate on CeO₂ nanoparticle dissolution. *Chemosphere*. 119: 1365–1371.
- Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J.-F., Riedel, L.M., Seal, S., Hickman, J.J., 2007. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*. 28 (10): 1918–1925.
- Dennerlein, K., Schneider, D., Göen, T., Drexler, H., Korinth, G., 2012. Impact of storage conditions for excised human skin on percutaneous penetration of chemicals. 13^e Congrès PPP. La Grande Motte, France.
- Djuriclic, B. & Pickering, S., 1999. Nanostructured Cerium Oxide: Preparation and Properties of Weakly-agglomerated Powders. *J. Eur. Ceram. Soc.* 19, 1925-1934.
- Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., Chovelon, J.-M., 2002. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. *Analytica Chimica Acta*. 459, 33–41.
- Finkle, P., Draper, H.D., Hildebrand, J.H., 1923. The theory of emulsification. *J. Am. Chem. Soc.* 45: 2780–2788.
- Förster, M., Bolzinger, M.A., Rovere, M.R., Damour, O., Montagnac, G., Briançon, S., 2011. Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods. *Skin Pharmacol. Physiol.* 24, 103-112.
- Frelichowska, J., Bolzinger, M.A., Pelletier, J., Valour, J., Chevalier, Y., 2009b. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *Int. J. Pharm.* 371, 56-63.
- Frelichowska, J., Bolzinger, M.A., Chevalier Y., 2009a. Pickering emulsions with bare silica. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 343, 70-74.
- Henych, J., Štengl, V., Slušná, M., Matys Grygar, T., Janoš, P., Kuráň, P., Štastný, M., 2015. Degradation of organophosphorus pesticide parathion methyl on nanostructured titania-iron mixed oxides. *Applied Surface Science*. 344: 9–16.
- Hirst, S.M., Karakoti, A.S., Tyler, R.D., Sriranganathan, N., Seal, S., Reilly, C.M., 2009. Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Small*. 5 (24), 2848–2856.
- Jager, B.V., Stagg, G.N., 1958. Toxicity of diacetyl monoxime and of pyridine-2-aldoxime methiodide in man. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 102, 203-211.
- Karakoti, A., Singh, S., Dowding, J., Seal, S., Self W., 2010. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 39 (11): 4422-4432.
- Kennedy, D.J., Mayer, B.P., Baker, S.E., Valdez, C.A., 2015. Kinetics and speciation of paraoxon hydrolysis by zinc(II)–azamacrocyclic catalysts. *Inorganica Chimica Acta*. 436, 123–131.
- Larese Filon, F., Mauro, M., Adami, G., Bovenzi, M., Crosera, M., 2015. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 310–322.
- Mikula, R.J, Munoz, V.A. 2000. Characterization of emulsions and suspensions in the petroleum industry using cryo-SEM and CLSM. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 174: 23–36.
- Misak, N. Z., El-Naggar, I. M., Maghrawy, H. B., Petro, N. S., 1990. On the behavior of hydrous ceria as an ion-exchanger-anion selectivity. *J. Colloid Interface Sci.* 135 (1): 6-15.
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., Kuca, K., 2015. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 38, 32–36.
- Nabavi, M., Spalla, O., Cabane, B., 1993. Surface chemistry of nanometric ceria particles in aqueous dispersion. *J. of Colloid and Interface Science*. 160 (2): 459-471.
- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L., Wang, X., Kolattukudy, P., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*. 73(3): 549–559.
- OECD. Organisation for economic co-operation and development. Guideline for the testing of chemicals. skin absorption: *in vitro* method. OECD, Paris (2004).

- Ogata, F., Tominaga, H., Yabutani, H., Kawasaki, N., 2011. Phosphate adsorption ability of granular gibbsite and cerium hydroxide. *J. Oleo Sci.* 60: 133–138.
- Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., Lademann, J., 2004. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J. Invest. Dermatol.* 122, 14-19.
- Pickering, S., 1907. Emulsions. *J. Chem. Soc.* 91, 2001-2021.
- Ramsden, W., 1903. The separation of solid materials on the surface of solutions and suspensions. observations concerning surface diaphragms, foam blisters, emulsions and mechanical coagulation. *Proc. Roy. Soc.* 72, 156-164.
- Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A., Font, X., 2012. Preliminary study of phosphate adsorption onto cerium oxide nanoparticles for use in water purification; nanoparticles synthesis and characterization. *Water Sci. Technol.* 66: 503–509.
- Renuka N.K., 2012. Structural characteristics of quantum-size ceria nano particles synthesized via simple ammonia precipitation. *Journal of Alloys and Compounds.* 513: 230– 235.
- Rolland, A., Wagner, N., Chatelus, A., Shroot, B., Schaefer, H., 1993. Site-specific drug delivery to pilo-sebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 10, 1738–1744.
- Rolland, P., Bolzinger, M.A., Cruz, C., Josse, D., Briançon, S., 2013. Hairy skin exposure to VX in vitro: Effectiveness of delayed decontamination, *Toxicol. In Vitro* 27, 358–366.
- Rousseau, J., Rüttimann, M., Brinquin, L., 2000. Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 19, 588–598.
- Salerno, A., Devers, T., Bolzinger, M.-A., Josse, D., Pelletier, J., Briançon, S., 2016a. In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO₂. *Chemico-Biological Interactions.*
- Salerno, A., Bolzinger, M.-A., Rolland, P., Chevalier, Y., Josse, D., Briançon, S., 2016b. Pickering emulsions for skin decontamination. *Toxicology in vitro.* 34: 45–54.
- Savio, A.K.P.D., Fletcher, J., Smith, K., Iyer, R., Bao, J.M., Robles Hernández, F.C., 2016. Environmentally effective photocatalyst CoO–TiO₂ synthesized by thermal precipitation of Co in amorphous TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental.* 182, 449–455.
- Saxena, A., Srivastava, A. K., Singh, B., Goyal, A., 2012. Removal of sulphur mustard, sarin and simulants on impregnated silica nanoparticles. *J. of Haz. Mat.* 211– 212, 226– 232.
- SCCS/1358/10. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, adopted by SCCS during the 7th plenary meeting of 22 June 2010.
- Schaefer, H., Watts, F., Brod, J., Illel, B., 1990. In: Scott, R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J. (Eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration: Methods, Measurement, Modelling.* IBC Technical Services, London, pp. 163–173.
- Schaefer, H., Watts, F., Papantoniou, C., Mahieu, C., 1989. European Patent 0,375, 520.
- Sharma, N. & Kakkar, R., 2013. Recent advancements on warfare agents/metal oxides surface chemistry and their simulation study, *Advanced Materials Letters.* 4(7), 508–521.
- Štengl, V., Matys Grygar, T., Opluštil, F., Němec, T., 2012. Ge⁴⁺ doped TiO₂ for stoichiometric degradation of warfare agents. *J. of Haz. Mat.* 227–228, 62–67.
- Spagnul, A., Bouvier-Capely, C., Adam, M., Phan, G., Rebière, F., Fattal, E., 2010. Quick and efficient extraction of uranium from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion. *Int. J. Pharm.* 398, 179-84.
- Taysse, L., Dorandeu, F., Daulon, S., Foquin, A., Perrier, N., Lallement, G., Breton, P., 2010. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the skh-1 hairless mouse. (ii) effects of some currently used skin decontaminants (rsdl and fuller's earth) against liquid sulphur mustard and vx exposures. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 491-498.
- Tok, A.I.Y., Boey, F.Y.C., Dong, Z., Sun, X.L., 2007. Hydrothermal synthesis of CeO₂ nanoparticles. *J. of Mat. Process. Tech.* 190, 217–222.

- Praveen Kumar, J., Prasad, G.K., Ramacharyulu, P.V.R.K., Garg, P., Ganesan, K., 2013. Mesoporous CuO-ZnO binary metal oxide nanocomposite for decontamination of sulfur mustard. *Mater. Chem. Phys.* 142, 484-490.
- Van Hooijdonk, C., Langenberg, J.P., 1995. Comparison of the in vitro efficacy of four skin decontaminants towards three chemical warfare agents. TNO-Prins Maurits Laboratory. PML 1, 994-889.
- Veriansyah, B., Chun, M.S., Kim, J., 2011. Surface-modified cerium oxide nanoparticles synthesized continuously in supercritical methanol: Study of dispersion stability in ethylene glycol medium. *Chemical Engineering Journal.* 168 (3): 1346-1351.
- Wagner, G.W., Bartram, P.W., Koper, O., Klabunde, K.J, 1999. Reactions of VX, GD and HD. *J Phys Chem B.* 103, 3325-3228.

4. Conclusion sur l'article

Les NPs de CeO₂ permettent de stabiliser 3 émulsions de Pickering contenant 40 % d'huiles moyennement polaires : l'octyl benzoate (OB), le caprylic/capric triglycéride (CCTG) ou le stéarate d'ethyl hexyl (EHS). Après l'émulsification à l'Ultra Turrax, aucune séparation de phase n'est observée pour ces trois émulsions. Du CeO₂ en excès est observé dans la phase aqueuse. L'huile de silicone, qui est aussi une huile moyennement polaire, ne permet pas de former une émulsion de Pickering stable. Cette huile ne possède pas de fonction ester, contrairement à OB, CCTG et EHS. Cette fonction ester semble nécessaire pour l'interaction CeO₂-huile et permettrait la stabilisation des gouttelettes. Après observations de ces trois émulsions de Pickering en cryoMEB, la stabilisation des gouttelettes d'OB ou CCTG par le CeO₂ est visible. Par contre, la stabilisation des gouttelettes d'EHS par les particules solides n'est pas évidente. De plus, cette émulsion possède des gouttelettes de grande taille ce qui risque d'entraîner la coalescence des émulsions à long terme.

Les émulsions de Pickering contenant 40% d'OB ou 40 % de CCTG ont été utilisées en décontamination cutanée. Les émulsions de Pickering sont aussi efficaces que la formule CeO₂-W : elles permettent de réduire significativement la quantité de POX absorbée par la peau mais présentent le désavantage d'augmenter la quantité de POX dans le CR (0,018 µmol/cm² de POX dosé dans le compartiment récepteur vs 0,06 µmol/cm² de POX lorsque CeO₂-W est utilisé en décontamination). En effet, les formules amphiphiles telles que les émulsions de Pickering pénètrent plus facilement dans la peau et peuvent favoriser l'absorption du POX. L'activité de dégradation du POX par la cérine dans les émulsions de Pickering est presque inexistante par rapport aux NPs sèches. Le placement des NPs à l'interface huile/eau ne favorise pas la dégradation du POX.

Les études en MCR ont permis de montrer qu'incluse dans des émulsions de Pickering, les NPs de CeO₂ sont détectées au-delà du *stratum corneum*. L'intensité du pic à 463 cm⁻¹ augmente lorsque le Z augmente. Les NPs, se plaçant à l'interface entre l'huile et l'eau, sont moins agrégées et pourraient plus facilement pénétrer dans la peau. La nature amphiphile de l'émulsion pourrait aussi favoriser l'absorption du CeO₂ dans la peau. En contrepartie, aucune NP de CeO₂ n'est détectée dans la peau lorsqu'il était appliqué sous forme sèche. La forte agrégation des particules empêche sûrement leur absorption cutanée.

Ainsi, à partir de ces résultats, plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence d'activité de dégradation du CeO₂ au sein des émulsions de Pickering. Premièrement, une

différence de cinétique de pénétration du CeO₂ et du POX défavoriserait l'interaction entre le POX et les NPs au cours de l'expérimentation.

Le pH (abaissé à 5-6 dans les émulsions de Pickering alors que le pH est de 10 lors des expériences de dégradation du POX par le CeO₂ en tube) pourrait également impacter la dégradation du POX par les NPs (voir chapitre bibliographique III sur l'impact du pH sur l'hydrolyse des COP). En effet, Gomaa & Faust (1972) ont démontré que la dégradation du Paraoxon était favorisée en milieu basique. L'hydrolyse du POX en PNT étant défavorable en milieu neutre et acide, le CeO₂ ne pourrait pas exercer son rôle de catalyseur de la réaction.

En troisième point, l'interaction POX/huile ou CeO₂/huile défavoriserait l'interaction CeO₂/POX. Il faudrait donc vérifier, avec une manipulation simple, que le CeO₂ dans l'émulsion de Pickering n'a pas perdu son activité catalytique. Si le CeO₂ au sein de l'émulsion dégrade autant de POX que la poudre de NPs, il faudrait repenser à un protocole d'application adapté à la formule (concentration en particules augmentée, temps d'application de la formule supérieure à 2 min, etc). Pour répondre à cette seconde hypothèse, une expérimentation complémentaire a été menée.

5. Résultats complémentaires, activité catalytique du CeO₂ en émulsion

L'activité catalytique du CeO₂ sous forme poudre et en émulsion a été comparée. 10 µL de POX est mis en contact avec 14,17 mg de CeO₂ (ces quantités sont proportionnelles à celles appliquées sur la peau). D'un autre côté, 102 µL d'émulsion de Pickering contenant 10% de CeO₂ et 40% d'OB ou CCTG sont mélangés à 10 µL de POX (n=3). Après 24h, de l'éthanol est ajouté dans les tubes et le POX et PNT sont dosés par la méthode HPLC-UV.

Quelle que soit l'émulsion de Pickering, le CeO₂ dégrade 4% du POX en 24 h. Les NPs sous formes brutes (poudre) dégradent 15% de POX. Cette expérience confirme bien que les NPs perdent leur activité catalytique en émulsion. Le CeO₂ est à l'interface entre la gouttelette d'huile. Nous avons supposé que l'interaction entre les fonctions esters des huiles et le CeO₂ permettait, en partie, la stabilisation des gouttelettes d'huile. Cette interaction pourrait cacher les sites réactifs du CeO₂ et empêcher la dégradation du POX. L'activité de dégradation observée serait seulement due aux NPs en excès dans la phase aqueuse. L'interaction POX-huile pourrait aussi ne pas favoriser l'interaction du POX avec les NPs.

Lors de la décontamination cutanée, les émulsions de Pickering sont laissées sur la peau pendant 2 min avant de retirer l'excédent. Même si nous avons vu que la dégradation du POX par le CeO₂ en milieu aqueux est un phénomène lent et qu'un temps d'application permettrait

d'initier la dégradation du POX par les NPs, celui-ci ne suffirait pas pour induire une dégradation significative de POX par le CeO₂. De plus, si l'excédent n'est pas retiré rapidement, l'émulsion de Pickering pourrait favoriser la pénétration du POX dans la peau.

Ces résultats ont montré le besoin de s'intéresser aux paramètres expérimentaux qui gouvernent la dégradation du POX par les NPs de CeO₂ lors de la décontamination cutanée.

Chapitre 4 : Compréhension des mécanismes de dégradation du Paraoxon par les NPs de CeO₂ en milieu aqueux.

1. Introduction

Lors des essais en décontamination cutanée, l'activité de dégradation des NPs de CeO₂ en suspension aqueuse est presque inexistante par rapport à la forme poudre. Il faut alors regarder d'un point de vue moléculaire quels sont les facteurs qui expliquent ces différences. Dans la littérature, les auteurs choisissent d'étudier la dégradation des OP par les NPs dans des milieux apolaires pour plusieurs raisons. Premièrement, comme déjà évoqué, les solvants apolaires accélèrent la dégradation des OP (Janos *et al.*, 2014, Stengl *et al.*, 2013). Deuxièmement, les solvants non aqueux permettent de s'affranchir du pH et de la présence d'éventuels sels. En modifiant l'état de surface des NPs, il a déjà été démontré que le pH basique favorisait la dégradation des OP (Liao *et al.*, 2016; Gomaa & Faust, 1972). La présence de sels tels que le NaCl ou le KCl peut augmenter l'agrégation des NPs et diminuer l'accessibilité aux sites réactifs (Chen & Li, 2012, Buettner *et al.*, 2010; Oriekhova & Stoll, 2016). Cependant, lors de la décontamination de la peau, les NPs et le POX sont dans un environnement aqueux et des sels peuvent provenir de la peau.

La dégradation du POX par des NPs est exponentielle : la vitesse de dégradation est très importante en début d'expérimentation puis diminue progressivement. On devrait normalement observer une vitesse de dégradation constante en fonction du temps. Janos *et al.* (2014) montre, qu'en fonction de la température de calcination du CeO₂, il peut rester une quantité résiduelle de POX non dégradée par les NPs. Or la catalyse comprend trois étapes : une étape de fixation du substrat sur le catalyseur, une transformation de l'espèce fixée et la libération du substrat (Lehn, 1999). On peut alors se demander s'il y a un empoisonnement des sites par le produit de dégradation, le diéthylphosphate, qui resterait lié au site réactif et empêcherait l'adsorption d'autres molécules de POX.

Les manipulations en tubes, comme décrites précédemment, permettent d'évaluer rapidement la dégradation du POX par des NPs. Mais ces manipulations sont réalisés en large excès de NPs par rapport au nombre de mole de POX et le pourcentage de dégradation n'est pas représentatif de la dégradation en décontamination cutanée. Des manipulations conduites dans les mêmes conditions que la peau (rapport nombre de moles de POX par masse de CeO₂ identique, sans ajout d'eau) permettraient de se rapprocher des conditions en décontamination cutanée. A partir de ces expérimentations, le but est de mettre en place un modèle qui permette de comprendre les paramètres qui gouvernent la dégradation du POX par les NPs en milieu

aqueux et en présence de sels (milieu HBSS). Une fois le modèle déterminé, il permettra de confirmer ou d'infirmier que les paramètres qui impactent la dégradation en tube sont identiques aux paramètres qui gouvernent l'efficacité de dégradation de la poudre de CeO₂ et du CeO₂-W lors des décontaminations cutanées *in vitro* 1 h après exposition au POX.

2. Méthodes

La dégradation du POX en milieu HBSS et en présence de CeO₂, synthétisé par voie hydrothermale, est évaluée en condition très diluée (ratio nombre de moles de POX par gramme de CeO₂ très faible) et en condition concentrée (ratio nombre de moles de POX par gramme de CeO₂ élevé). Toutes les conditions expérimentales sont reportées dans le tableau 23. Pour chaque expérience, réalisée en triplicat, un contrôle sans NPs est effectué.

Tableau 23 : Conditions expérimentales pour l'évaluation de la dégradation du Paraoxon en présence de CeO₂ et d'HBSS. On considère que le produit initial de Paraoxon (pur à 90%) contient 10% d'eau.

Numéro de l'expérience	Masse de CeO ₂ (mg)	V _{POX} (mL)	V _{HBSS} (mL)	V _{H₂O} (mL)	Temps de réaction (min)
1	14,17	0,0254	0,025	0,0025	1440
2	14,17	0,0100	0,025	0,0010	1440
3	14,17	0,0254	0,006	0,0025	1440
4	14,17	0,0100	0,011	0,0010	1440
5	14,17	0,0100	0,010	0,0010	4320
6	14,17	0,0100	0,006	0,0010	1440
7	14,17	0,0100	0,000	0,0010	1440
8	42,51	0,0100	0,011	0,0010	1440
9	42,5	0,0100	0,010	0,0010	4320
10	100	4,8.10 ⁻⁵	2	4,8.10 ⁻⁶	120; 300; 1440; 1860
11	100	4,8.10 ⁻⁵	2	4,8.10 ⁻⁶	120; 300; 2790; 3150; 4280
12	200	9,6.10 ⁻⁵	2	9,6.10 ⁻⁶	120; 300; 1440
13	200	9,6.10 ⁻⁵	2	9,6.10 ⁻⁶	120; 300; 2790; 4280
14	36	0,0254	0	0,0025	1440
15	26	0,0254	0	0,2625	1440

2.1. Dégradation du POX très dilué

Le protocole est détaillé dans le chapitre 1 (partie 1.1). Un ou 2 mL d'une solution à 200 µmol/L de POX dilué dans l'HBSS est mise en contact avec 100 ou 200 mg de CeO₂. Le ratio

est donc de 2 μ mole de POX par gramme de CeO_2 . Tous les tubes sont placés sur un agitateur à balancement. La réaction du CeO_2 avec le POX est suivie par spectrophotométrie à température ambiante à l'obscurité pendant maximum 72 h. Le pH du mélange est d'environ de 10 et ne varie pendant l'expérimentation.

2.2. Dégradation du POX très concentré

Différentes quantités de CeO_2 (W_{CeO_2}) sont mises en contact avec différents volumes de POX (V_{POX}) et d'HBSS (V_{HBSS}). La réaction du CeO_2 avec le POX est réalisée à température ambiante et à l'obscurité. Les tubes sont mis en position verticale et ne sont pas mis sous agitation.

Après 24 h ou 72 h d'expérimentation, 4 mL d'éthanol est ajouté dans chaque tube. Le mélange est placé aux ultrasons pendant 30 min afin de désorber le POX de la surface des NPs puis dilué au 1/100 dans l'éthanol. Comme le PNT est dilué dans l'éthanol, son absorbance à 360 nm est plus faible et sa quantification par spectrophotométrie est plus délicate. La méthode HPLC-UV a donc été préférée pour la quantification du PNT et du POX résiduel.

2.3. Expression des résultats

La productivité, exprimée par le "turn over frequency" (TOF) (mmole/min/mg), et le taux de conversion du POX en PNT, nommé X, permettent de comparer l'activité catalytique du CeO_2 lors des différentes expériences. Le TOF est calculé de la manière suivante:

$$\text{TOF} = \frac{n_{\text{PNT}}}{t \times W}$$

Où:

n_{PNT} : nombre de moles of POX convertis en PNT (mmole)

W: masse de CeO_2 (mg)

t: temps de réaction (min)

Le taux de conversion X est exprimé par:

$$X = \frac{n_{\text{PNT}} \times 100}{n_{\text{POX}}}$$

Où:

n_{POX} : quantité initiale de POX (mole)

2.4. Modèles cinétiques

Il sera difficile de conclure à partir de tous les résultats expérimentaux et de déterminer l'impact de la masse de CeO₂, des volumes d'HBSS et du POX sur le taux de conversion du POX en PNT et sur le TOF. Une modélisation a donc été réalisée premièrement à partir des expériences effectuées en tube. Puis, on a vérifié que le modèle cinétique était adapté aux conditions de décontamination cutanée.

Plusieurs modèles cinétiques ont été testés. Janos *et al.* (2014) avait décrit la dégradation du parathion en présence de CeO₂ avec une cinétique d'ordre un. Ce modèle cinétique a donc été le premier testé. Ensuite, comme un empoisonnement des sites catalytiques par un réactif, un produit, ou un phénomène physique (ex : la consistance) est suspecté, le modèle cinétique de Langmuir-Hinshelwood et un modèle prenant en compte l'agrégation des particules ont également été expérimentés.

Un programme a été écrit sur MATLAB afin de résoudre les différentes équations des modèles cinétiques et des bilans de matières.

3. Résultats sous forme d'article: Model-based optimization of parameters for degradation reaction of POX using CeO₂ nanoparticles in water media

Les résultats font l'objet d'une publication en cours de rédaction :

Salerno, A. Pitault, I., Devers, T., Pelletier, P., Briançon, S. Model-based optimization of parameters for degradation reaction of POX using CeO₂ nanoparticles in water media.

Model-based optimization of parameters for degradation reaction of POX using CeO₂ nanoparticles in water media

Alicia Salerno^{a,b}, Isabelle Pitault^a, Thierry Devers^c, Jocelyne Pelletier^{a,b}, Stéphanie Briançon^{a,b*}

a CNRS UMR5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, Université Lyon 1, 69622, Villeurbanne, France.

b Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologique, Université de Lyon, 69373, Lyon, France.

c Interfaces Confinement Matériaux et Nanostructures, IUT de Chartres, Université d'Orléans, 28000, Chartres, France

d Service de Santé et de Secours Médical, SDIS06, 06270, Villeneuve-Loubet, France

Abstract

Organophosphorus (OP) compounds, which mainly penetrate via the percutaneous pathway, are a diverse family of chemicals which include pesticides in agriculture and chemical warfare agents (CWA). Degradation and body surface decontamination is vital to prevent the skin penetration of POX and victims poisoning. Paraoxon (POX) is one of the OP pesticides and a well know simulant of VX, a CWA. Cerium oxide (CeO_2) demonstrated a good efficiency for the degradation of POX. The aim of the study is to develop a model which include the impact of weight of CeO_2 , POX and diluent volumes on the degradation kinetics. The modelling was realized with rapid and simple experiments carried out in tubes. We choose an aqueous diluent which contain ions (Hanks's Balanced Salt Solution) in order to be in accordance with *in vitro* skin decontamination conditions. Three different models have been tested: a first order kinetic model, Langmuir-Hinshelwood type kinetic model and particle aggregation kinetic model. Using the particle aggregation kinetic model, the simulated and experimental data are in a good accordance for diluted experiments but also for concentrated experiments with the same set of kinetic parameters. It highlighted the importance of particles aggregation due to salts and consistency of the mix on the degradation efficiency of CeO_2 . The model works also really well to predict the degradation efficiency of CeO_2 powders during *in vitro* skin experiments. However, it does not correctly forecast with an aqueous decontaminant, containing CeO_2 , which causes an incorrect estimation of C_{POX} and W_{CeO_2} in the set of parameters.

1. Background

Organophosphorus (OP) compounds are a diverse family of chemicals which include pesticides and nerve agents. They are used in agriculture (Hassail, 1990) and also as chemical warfare agents. The OP pesticide Parathion owns a thionate esters (P=S), which have a lower mammalian toxicity (its LD₅₀ i.e. the dose required to kill half the members of a tested population is 6.8-50 mg/kg in rats (Hayes & Laws, 1990; Meister, 1992)) than the corresponding oxonate ester (P=O) Paraoxon (POX) (LD₅₀ = 4.3mg/kg in rats for POX (Misik *et al.*, 2015)). Parathion is oxidized to its active metabolite POX both inside and outside of the organism (Eto, 1979). POX can penetrate the body via the percutaneous pathway and acts by inhibiting an enzyme, the acetylcholinesterase, interfering with the normal process of neurotransmission. This leads to respiratory failure and death of the organism. The clinical signs appear 12-24 h after exposure (Rousseau *et al.*, 2000).

Many studies talk about the degradation of OP species using metal oxide nanoparticles (NPs). The shape, size, specific surface area, crystallinity and surface properties of NPs are dependent on the method of synthesis and the calcination temperature. These parameters impact the degradation efficiency of NPs. Indeed, metal oxide NPs have a large specific surface area, increasing the adsorption of OP compounds. The method of synthesis also influence the amount of highly reactive sites available on the surface of metal oxides as their intrinsic vacancy defects, Lewis acid (metal cations), Lewis base (oxide anions) (Wagner *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 2012; Sharma & Kakkar, 2013). NPs act mostly by hydrolysis of OP compounds and lead to benign or less toxic compounds. In case of POX or parathion, its catalysis with MnO₂ (Liao *et al.*, 2016), TiO₂, (Savio *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2012), TiO₂ doped CoO or Rh₂O₃ (Savio *et al.*, 2016) produced diethyl phosphate and p-nitrophenol (PNT) (Kennedy *et al.*, 2015; Savio *et al.*, 2016) as shown in Fig. 1. In contrast to POX, PNT does not affect cholinesterase activity (Dzyadevych *et al.*, 2002) and LD₅₀ is significantly increased (1300 mg/kg in rats). The study of OP compound degradation in presence of metal oxide NPs is generally realized in non-polar solvent for many reasons. Firstly, the majority of OP compounds are hydrophobic and their solubilisation is favoured in non-polar solvents. It facilitates the study of OP degradation at high concentration. Secondly, the degradation kinetics of OP compounds in a non-aqueous environment proceeded much faster compared to aqueous solutions (Janos *et al.*, 2014, Stengl *et al.*, 2013). Janos and co-workers (2014) observed that the degradation of methyl parathion using CeO₂ NPs in an apolar solvent proceeded much faster, within ~10² minutes, compared to more than 10² hours in aqueous solutions. Finally, the use of non-polar solvent excludes the impact of pH or the presence of non-organic compounds (as NaCl or KCl) which influence the

surface properties of NPs and thus, their reactivity towards OP compounds (Liao *et al.*, 2016; Gomaa & Faust, 1972). However, the non-aqueous environment is not realistic and healthy compared to the real environment.

CeO₂ already demonstrated a good efficiency for the degradation of POX (Salerno *et al.*, 2016) and methyl parathion (Janos *et al.*, 2014). The kinetic curves of POX or parathion degradation could be described well by pseudo-first-order kinetic model and showed the time dependencies for a disappearance of the pesticide. As time increases, the kinetic degradation decreases until the degradation stops and a quantity of the OP may persist.

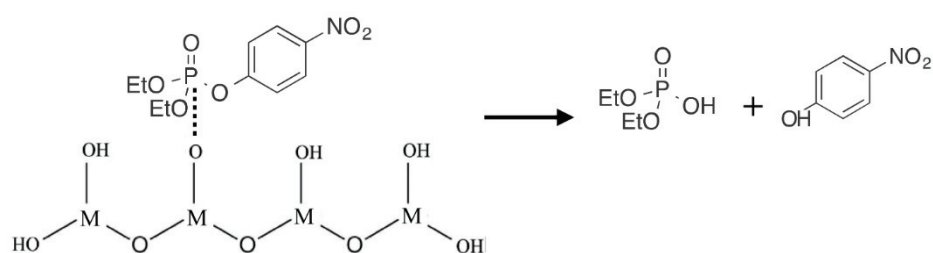


Fig. 1: Catalytic degradation of Paraoxon with a general metal oxide (MO) adapted from (Kennedy *et al.*, 2015; Janos *et al.*, 2014). Degradation products are: diethyl phosphate (left) and p-nitrophenol (PNT, right).

2. Objectives

Our previous study (Salerno *et al.*, 2016) aimed at using CeO₂ for the *in vitro* skin decontamination of POX. The Franz cells diffusion method with HBSS (Hanks's Balanced Salt Solution) as the receptor fluid and pig-ear skins was used. The results showed that powder of CeO₂ was efficient for the degradation of POX on the skin surface in comparison with an aqueous suspension of CeO₂ (more easy to use in case of mass decontamination) where the degradation activity was largely decrease.

Thus, the aim of the present study is to optimize the catalytic activity of this CeO₂ by the understanding of degradation mechanism of POX with CeO₂ NPs in an aqueous environment. We determined the impacts of the weight of CeO₂, the presence of salts (the skin has endogenous ions), the volume of HBSS and the concentration of POX.

3. Methods

3.1. Materials

POX (O,O-diethyl p-nitrophenyl phosphate), purity 90%, 1.27 g/mL density was purchased from Sigma Company (St Quentin Fallavier, France). Cerium ammonium nitrate ($\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, 99.5%) and sodium hydroxide NaOH (98%) were from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). P-nitrophenol (PNT), 99% purity was from Acros Organics Company (Geel, Belgium). Ethanol (96.3%) was obtained from Hexalab (Saint Fons, France). HBSS was purchased from Gibco (Bleiswijk, Netherlands). Methanol and glacial acetic acid were obtained from Fisher Scientific (Leicestershire, United Kingdom). Guar gum was from Copper (Melun, France).

3.2. Synthesis of CeO_2 nanoparticles

The synthesis of CeO_2 nanoparticles assisted by hydrothermally treatment was described in a previous study (Boutard *et al.*, 2013). Briefly, 0.5 mol/L cerium ammonium nitrate solution $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ was mixed with a 2 mol/L sodium hydroxide solution. The precipitation was carried out in a microwave digestion system (Multiwave-3000, Anton Paar) at 150°C for 15 min, and at the maximum pressure of 10 bars. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was recovered by centrifugation (4800 RPM for 5 min), washed three times with distilled water and dried at ambient temperature for overnight. The sample was then calcined at 500°C in air for 2h. The powders were stored in glass bottles at room temperature and in the dark before use.

The physico-chemical properties of the resulting NPs were presented in a previous study (Salerno *et al.*, 2016). The calcination allowed the crystallization of NPs but promoted the agglomeration of CeO_2 particles: the specific surface area measured by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method was 5.4 m²/g. The mean particle diameter of CeO_2 is 9 nm. Calcination of NPs induced agglomeration (size of agglomerates: 10 μm).

3.3. Formulation of the aqueous suspension of CeO_2 thickened (CeO_2 -W)

Aqueous suspension of CeO_2 was prepared at 10 wt% CeO_2 (CeO_2 -W). Therefore, the first step was the dispersion of 10% CeO_2 in deionized water using a magnetic stirrer (600 RPM) during 24 h. In order to avoid nanoparticles sedimentation, 1 wt% of Guar gum was added in the aqueous suspension. The mixture was heated 30 min at 55°C under magnetic agitation and left to cool at ambient temperature. pH of CeO_2 -W was approximately 10.

3.4. Degradation efficiency of nanoparticles

We will distinguish experiments where POX was highly diluted (ratio number of moles of POX per gram of CeO₂ very low) and experiments where POX was highly concentrated (ratio number of moles of POX per gram of CeO₂ higher).

3.4.1. POX highly diluted in tubes

Reaction of CeO₂ with POX was evaluated in aqueous suspension, in the dark at ambient temperature. For the experiment, 200 mg or 100 mg of CeO₂ was mixed with 2 mL or 1 mL of POX diluted in HBSS (200 μmol/L), respectively (Table 1). The degradation of POX was monitored during 72 h by measuring the concentration of the degradation product p-nitrophenol (PNT) by spectrophotometry (UV-1601 Shimadzu spectrophotometer), which absorbs at 360 nm. The tubes were disposed on a rocking shaker to facilitate interactions between CeO₂ and POX molecules. pH of the reaction mixture was approximately 10 and did not vary during the experimental period. At different reaction time, the mixtures were centrifuged at 5000 RPM for 2 minutes. The absorbance of the supernatant was measured at 360 nm in order to quantify the PNT concentration. The calibration curve of PNT was linear in the concentration range of 10-500 μmol/L. The supernatant was then replaced in its solution after each measure.

A solution of 200 μmol/L of POX diluted in HBSS was used as blank. Each experiment was conducted in triplicates.

3.4.2. POX highly concentrated in tubes

Various amount of CeO₂ (W_{CeO_2}) was put in contact with various volume of POX (V_{POX}) and volume of HBSS (V_{HBSS}). The experimental conditions are reported in Table 1. Reaction of CeO₂ with POX was also evaluated in the dark, at ambient temperature. After 24h or 72h, the volume was completed at 4 mL with ethanol in order to stop the reaction. The mixture was placed in ultrasound bath for 30 min, in order to desorb POX from NPs, and diluted in 1/100 in ethanol. As POX is diluted in ethanol, the quantification of PNT using spectrophotometer is difficult (low absorption at 360 nm). An HPLC-UV method (described below) was preferred for the quantification of PNT and the non-degraded POX.

For each condition, a control was carried out without CeO₂. Each experiment was conducted in triplicates.

3.4.3. *In vitro* skin decontamination efficacy with CeO₂

The protocol for *in vitro* skin decontamination efficacy of CeO₂ NPs after an exposure to POX was already described in a previous study (Salerno *et al.*, 2016). In agreement with the OECD guidelines (OECD, 2004), only the skin samples with TEWL values ranging between 3 and 10 g/h/m were used in this work. Briefly, full-thickness unclipped pig-ear skin samples (thickness 1.1 ± 0.15 mm) were mounted on Franz-type static glass diffusion cells using HBSS as the receptor fluid. The membrane area available for diffusion was 2.54 cm². The cells were maintained 30 min at 36°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of 32 ± 1 °C. The skin samples were divided into groups of 8 biological replicates from 4 different donors.

25.4 µL of POX ($Q_0 = 46.6$ µmol/cm² or 10 µL/cm²) were applied in the centre of the pig-ear skin surface. The decontamination was achieved after 1 h. 36 mg of CeO₂ or 260 µL of CeO₂-W were rubbed on the skin surface with a circular motion for 10 s with a sponge. For CeO₂-W, the product was allowed to stand on the skin for 2 min. Excess of decontaminant was then removed with a second sponge and absorbent paper. The POX permeation study was then carried out for 24h, in order to determine the impact of the decontamination process. POX and PNT at the surface of the skin, in the skin and in the receptor fluid were quantified by the HPLC-UV method.

3.5. Quantification of POX and PNT by HPLC-UV

Concentrations of POX and PNT were determined by liquid chromatography using the quaternary pump (Waters 600 Controller), auto sampler (model 717 plus Auto sampler), column heater (Waters temperature control module), and Photodiode Array Detector (Waters 2996). Operated at 40 °C, the column used was a Xterra MS C18 Cartridge column (5 µm, 4.6 mm x 250 mm). The composition of mobile phase was 65% of methanol (HPLC-grade, Fisher Scientific) and 35% of deionized water with 0.5% of acid acetic (acetic acid glacial and ultrapure analytical grade type 1 water, $r > 17$ mΩ/cm) (v/v). Total run time was 10 min at a flow rate of 0.7 mL/min. Injection volume was 10 µL. Compound identification was accomplished by comparison of retention time (PNT has a retention time of 5.5 min and POX of 7.2 min) and UV absorption behavior (PNT was monitored at 314 nm and POX at 269 nm). Signal quantification was carried out in the peak height mode. Data collection and analysis were performed using Empower Pro software. Under the given conditions, the limits of detection were 420 and 750 pg for POX and PNT, respectively. The coefficients of variation of

repeatability were 0.5% and 0.1 % for POX and PNT, respectively, at a concentration level 10 g/L.

For the quantification of PNT in skin samples, the initial POX product (90% purity) applied on the skin contains approximately 3% of PNT. By inference, POX product contains 7% of water. The quantity of PNT coming from impurities was subtracted to the total quantity of PNT quantified by HPLC-UV for each skin.

Table 1: Experimental conditions for POX degradation using CeO₂ in presence of HBSS. We considered that the initial POX product (90% purity) contains 10% of water. Experiments n°1 to 13 were performed in tubes, experiments n°14 and 15 on *in vitro* skins.

Experiment	W _{CeO2} (mg)	V _{POX} (mL)	V _{HBSS} (mL)	V _{H2O} (mL)	Reaction times (min)
1	14.17	0.0254	0.025	0.0025	1440
2	14.17	0.0100	0.025	0.0010	1440
3	14.17	0.0254	0.006	0.0025	1440
4	14.17	0.0100	0.011	0.0010	1440
5	14.17	0.0100	0.010	0.0010	4320
6	14.17	0.0100	0.006	0.0010	1440
7	14.17	0.0100	0.000	0.0010	1440
8	42.51	0.0100	0.011	0.0010	1440
9	42.5	0.0100	0.010	0.0010	4320
10	100	4.8.10 ⁻⁵	2	4.8.10 ⁻⁶	120; 300; 1440; 1860
11	100	4.8.10 ⁻⁵	2	4.8.10 ⁻⁶	120; 300; 2790; 3150; 4280
12	200	9.6.10 ⁻⁵	2	9.6.10 ⁻⁶	120; 300; 1440
13	200	9.6.10 ⁻⁵	2	9.6.10 ⁻⁶	120; 300; 2790; 4280
14	36	0.0254	0	0.0025	1440
15	26	0.0254	0	0.2625	1440

The entire experiments 10 and 12 were duplicated independently. These experiments showed a good reproducibility.

3.6. Data analysis

The turn over frequency (TOF) (mmol/min/mg), which is the TON (Turn Over Number) per time unit, and the conversion of POX into PNT, named X, allow comparison of CeO₂ catalytic activity during the experiments. TOF was consequently calculated as follows:

$$\text{TOF} = \frac{n_{\text{PNT}}}{t \times W} \quad (1)$$

Where:

n_{PNT}: number of moles of POX converted into PNT (mmol)

W: weight of CeO₂ NPs (mg)

t: reaction time (min)

POX conversion X was expressed as:

$$X = \frac{n_{\text{PNT}} \times 100}{n_{\text{POX},0}} \quad (2)$$

Where:

$n_{\text{POX},0}$: initial number of moles of POX (mmol)

3.7. Mass balance equations and parameter estimation

Some kinetic models have been assessed. A one-order kinetic model, a Langmuir-Hinshelwood type kinetic model considering several causes of poisoning and a model taking into account the aggregation of solid particles. All kinetic models will be described and discussed in a further part. The experiments used to the parameter estimation have been performed in tubes considered as batch systems. In this work, the mass balance equations for POX conversion depend on the studied kinetic model. For instance, the mass balance equation for the first order kinetic law and the Langmuir-Hinshelwood law is:

$$\frac{dC_{\text{POX}}}{dt} = -r \frac{W}{V} \quad (3)$$

where:

C_{POX} is the concentration of POX present in the tube (mmol/mL),

r is the chemical rate (mmol/mg_{CeO₂}/min) ,

V is the global volume of POX solution and added HBSS or water (mL),

W is the weight of Cerium oxide putted into the tube (mg).

For the model of solid particle aggregation, the mass balance equations are:

$$\text{Mass balance for POX conversion: } \frac{dC_{\text{POX}}}{dt} = -r S_T \quad (4)$$

$$\text{Mass balance of particle number: } \frac{dN_p}{dt} = -k_5 \frac{N_p}{V} \frac{N_p}{V} \quad (5)$$

Where:

S_T is the geometric area of Cerium oxide spherical particles putted into the tube (m²),

N_p is the total number of particles of Cerium oxide putted into the tube (-),

k_5 is the kinetic parameter of particle aggregation (mL²/min/ N_p)

The demonstration of the dependence of the both mass balance equations is given in the paragraph 4.2.3.

A software code to solve the equation systems was written in Matlab. The differential equations representing the mass balances are integrated using the solver ode23. Parameter estimation was carried out in Matlab using the lsqnonlin function including the Levenberg-Marquardt algorithm. The objective function to be minimised is the sum of the squares of the error between the calculated and measured concentrations of POX.

4. Results

The Turn Over Frequencies (TOF) and the conversion X after different reaction times in all the experimental conditions are given in Table 2. The results have been commented on the basis of the experimental groups which differed in V_{TOT} (total liquid volume in the tube) and the experimental environment (tube/skin) as in material and method section: experiments with POX highly concentrated in tube (experiments n°1 to 9), experiments with POX highly diluted in tube (experiments n°10 to 13), *in vitro* skin decontamination experiments (experiments n°14 and 15).

Table 2: Experimental conditions and the resulting TOF and conversion X after different reaction times.

	W_{CeO_2} (mg)	$V_{\text{POX}+\text{H}_2\text{O}}$ (mL)	V_{HBSS} (mL)	V_{POX} (mL)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)	V_{TOT} (mL)	C_{POX} (mmol/mL)	$C_{\text{H}_2\text{O}}$ (mmol/mL)	C_{P} (mmol/mL)	C_{KCl} (mmol/mL)	C_{Na} (mmole/mL)	W/V (mg/mL)	reaction time (min)	X (%)	TOF (mmol/min/ $\text{mg} \cdot 10^{-9}$)
1	14.17	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-2}$	2.1	30.2	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$7.1 \cdot 10^{-2}$	280	1440	5.5	285
2	14.17	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-2}$	1.2	41.0	$5.0 \cdot 10^{-4}$	$3.8 \cdot 10^{-3}$	0.1	403	1440	9.6	196
3	14.17	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$6.0 \cdot 10^{-3}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$3.1 \cdot 10^{-2}$	3.4	15.0	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	451	1440	6.7	348
4	14.17	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.1 \cdot 10^{-2}$	2.0	31.5	$3.7 \cdot 10^{-4}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$7.4 \cdot 10^{-2}$	675	1440	5.0	102
5	14.2	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$	2.1	30.3	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$7.1 \cdot 10^{-2}$	710	4320	6.0	41
6	14.17	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$6.0 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$	2.6	24.1	$2.6 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$5.3 \cdot 10^{-2}$	886	1440	11.0	225
7	14.17	$1.0 \cdot 10^{-2}$	0	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	4.2	5.6	0	0	0	1417	1440	4.0	82
8	42.51	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.1 \cdot 10^{-2}$	2.0	31.5	$3.7 \cdot 10^{-4}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$7.4 \cdot 10^{-2}$	2024	1440	15.0	102
9	42.51	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$	2.1	30.3	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$7.1 \cdot 10^{-2}$	2126	4320	22.0	50
10	100	$4.8 \cdot 10^{-5}$	2.0	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$4.8 \cdot 10^{-6}$	2.0	$1.0 \cdot 10^{-4}$	55.0	$7.0 \cdot 10^{-4}$	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$	50	120	18.5	3.08
													300	31.5	2.10
													1440	82.7	1.15
													1860	89.7	0.96
													120	17.6	2.93
													300	29.6	1.97
11	100	$4.8 \cdot 10^{-5}$	2.0	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$4.8 \cdot 10^{-6}$	2.0	$1.0 \cdot 10^{-4}$	55.0	$7.0 \cdot 10^{-4}$	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$	50	2790	83.6	0.60
													3150	89.4	0.57
													4280	93.4	0.44
12	200	$9.6 \cdot 10^{-5}$	2.0	$8.6 \cdot 10^{-5}$	$9.6 \cdot 10^{-6}$	2.0	$2.0 \cdot 10^{-4}$	55.0	$7.0 \cdot 10^{-4}$	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$	100	120	40.4	6.73
													300	78.3	5.22
													1440	106.7	1.48
													120	39.4	6.56
13	200	$9.6 \cdot 10^{-5}$	2.0	$8.6 \cdot 10^{-5}$	$9.6 \cdot 10^{-6}$	2.0	$2.0 \cdot 10^{-4}$	55.0	$7.0 \cdot 10^{-4}$	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$	100	300	66.4	4.42
													2790	103.0	0.74
													4280	102.2	0.48
14	36	$2.5 \cdot 10^{-2}$	0	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$	4.2	5.6	0	0	0	1417	1440	14.3	292.1
15	26	$2.5 \cdot 10^{-2}$	0	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$2.6 \cdot 10^{-1}$	$2.9 \cdot 10^{-1}$	0.4	51.1	0	0	0	91	1440	10.4	294.2

4.1. POX highly concentrated (experiments n°1 to 9)

In concentrated conditions, experiments cannot be only compared on the basis of the total volume. Indeed, one slight change in the initial experimental condition (W_{CeO_2} , V_{POX} , V_{HBSS} , reaction time) will modified other parameters which will have an impact on the degradation efficiency. As explained below (see § 4.4.3), the W/V_{TOT} ratio (which reflect the consistency of the mix) will have an impact on degradation efficiency of CeO_2 particles. For example, experiments n°12 and 15 seem different but their W/V_{TOT} are similar. If the mix will look like a paste this could limit the POX to reach the inner structure of CeO_2 NPs. Three experimental groups can be formed depending on the consistency (Table 2): (i) experiments n°1 to 3 that had a W/V_{TOT} ratio around 280-450 mg/mL and are the most liquid (ii) experiments n°4 to 7 that had a W/V_{TOT} ratio between 675 and 1417 mg/mL and had a consistency of a paste and, (iii) in experiments n° 8 and 9 that had a ratio equal to 2125 mg/mL and had a higher volume of CeO_2 , the powder was not totally wet by POX and HBSS.

4.1.1. Effect of catalyst weight and reaction time in concentrated experiments

As can be seen in Table 2, even if experiments are in different consistency groups, there was a major effect of the catalyst weight and the reaction time t in the POX conversion X . For one experimental condition, when the weight of CeO_2 NPs was multiplied by three (experiments n°4 vs 8 and 5 vs 9), X also was multiplied by three and the TOF was identical.

When the contact time was increased by a factor of 3 (experiments n°4 vs 5 and 8 vs 9), the percentage of conversion increased but has not tripled, showing that the POX degradation kinetics depends on POX concentration and the kinetic order thus is greater than zero.

4.1.2. Effect of HBSS and POX volumes in concentrated experiments

Regarding the impact on the consistency (W/V_{TOT} is increased by a factor 2), no simple conclusion about the impact of HBSS volume can be deduced from the experimental data. For a increase of HBSS volume (experiments n° 6 and 4), as the conversion X , the TOF decreased by half (TOF = 225 mmole/min/mg for 6 μL of HBSS and TOF=102 mmole/min/mg for 11 μL of HBSS).

In case of experiments n°4 and 2, the increase of HBSS volume led to an increase of TOF (TOF = 102 mmole/min/mg for experiment n°4 and TOF=196 mmole/min/mg for experiments n°2).

For a more important change of the consistency (experiments n°2 and 6), the conversion X and the TOF were identical. However these experiments are not in the same consistency group. It appears that the increase of POX volume provided a significant acceleration of POX degradation but a reduction of the conversion. However, this conclusion can be drawn only from a comparison of two experiments which had a different W/V_{TOT} ratio (n° 3 and 6).

4.2. POX highly diluted (experiments n°10 to 13)

The degradation of POX over CeO_2 was studied in polar solvent HBSS using the procedure described in the experimental section. The kinetic degradation of POX was proportional to the weight of CeO_2 and confirmed the effect of solid on the chemical reaction.

As in concentrated experiments, the conversion X exponentially decreased with time: the kinetic curves showed the time dependencies for a disappearance of the pesticide accompanied by the formation of PNT as the main degradation product (Table 2). At the beginning, the degradation was fast ($TOF \approx 6 \cdot 10^{-9}$ mmole/min/mg with 200 mg of CeO_2 and $TOF \approx 3 \cdot 10^{-9}$ mmole/min/mg with 100 mg of NPs). Then, after 3 days of reaction, the degradation kinetics decreased and the degradation of POX reached a maximum of 90% and 100% for 100 mg and 200 mg of CeO_2 , respectively. However, it is difficult to compare the experiments 10/11 with 12/13 because two parameters have been changed: the weight of ceria and the initial concentration of POX ($C_{POX,0}$). But in accordance with the previous observation the instantaneous POX concentration is a parameter of the kinetics of POX degradation.

4.3. *In vitro* skin experiments (experiments n°14 and 15)

The two *in vitro* skin experiments are also difficult to compare because the weight of ceria and the water volume were different. However, the conversion X seem proportional to the weight of solid particles (14% of POX degraded for experiment n°14 with 36 mg of ceria vs 10% of conversion for experiment n°15 and 26 mg of CeO_2). The TOF were identical for the two experiments (290 mmole/min/mg). The water volume does not seem to have an impact on the degradation efficiency of particles against POX.

Experiments n° 7 and 14 were made in the same ratio of POX and CeO_2 but with a tripled CeO_2 weight for the experiment n°14. After 24 h of experiment, the conversion X and the TOF decreased by a factor 3 when the experiment was conducted in a tube compared to the skin decontamination conditions.

4.4. Kinetic models

As it has been observed previously, it was difficult to conclude on the experimental results because many parameters are paired. The modelling is the easiest means to conclude on the impact of W_{CeO_2} , V_{POX} , V_{HBSS} on the conversion X and TOF. The modeling was first realized with experiments carried out in tube. Then, we verified that the model was suitable for the *in vitro* skin decontamination.

The first order kinetic model has been the first tested due to the Janos paper (Janos *et al.*, 2014) which also demonstrated the time dependency of the parathion methyl degradation with CeO_2 samples. For the first order kinetic model, the chemical rate equation is: $r = kC_{POX}$ (6). The authors found a residual fraction of parathion methyl at the end of the reaction (depending on the temperature calcination of CeO_2 samples) and assumed that the destructive capacity of the reactive sorbent is limited. An inhibition by the reagents or the products being suspected, a Langmuir-Hinshelwood kinetic model was tested in this study. Finally, a particle aggregation kinetic model was also tested to take into account a possible effect of salt concentration.

4.4.1. First order kinetic model

As mentioned by Janos *et al.* (2014), we also found a residual quantity of POX which was not degraded even if the reaction time was extended to more than 70 h (experiments n°11). A mass transfer limitation can be suspected during all the experiments.

4.4.1.1. Mass transfer limitation

For each experiment, the Weisz modulus Φ' (which quantifies the ratio of apparent chemical rate to internal diffusion rate in the ceria) and external mass transfer fraction f_{ex} (which is the ratio of apparent chemical rate to external transfer rate in the limit layer around the particles) were assessed as follow:

$$\Phi' = \frac{\bar{r}_P \frac{d_P}{6}}{D_e \times C_{POX}} \quad (7)$$

$$f_{ex} = \frac{\bar{r}_P \left(\frac{d_P}{6}\right)^2}{k_D \times C_{POX}} \quad (8)$$

using the Sherwood number equal to 2 to calculate the mass transfer coefficient k_D :

$$Sh = \frac{k_D \left(\frac{d_P}{6}\right)}{D_m} \quad (9)$$

Where:

d_p : mean particle diameter of CeO_2 equal to $10 \cdot 10^{-6}$ m (Salerno *et al.*, 2016),

D_e : the effective POX diffusivity equal to 10^{-9} m²/s,

\bar{r}_p : the reaction rate in mol/s/m³_{CeO2}

C_{POX} : the concentration of POX (mmol/ m³_{Liquid})

k_D : is the mass transfer coefficient (m/s)

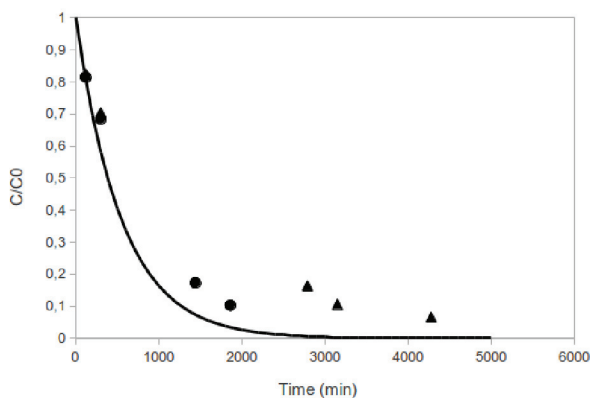
D_m : the POX molecular diffusivity equal to 10^{-10} m²/s,

For all experiments, the Weisz modulus and the external mass transfer fractions were extremely low (lower to 10^{-5}) that means no transfer limitation could interfere with kinetic parameter estimation. Thus, for all kinetics models, the mass transfer limitation is not considered.

4.4.1.2. Estimation of the k parameter of the first order kinetic model

The problem of mass transfer limitation dismissed, all experiments were used to estimate the k parameter of the first order kinetic model (Equation (6)). The obtained parameter value was $k = 34.4 \cdot 10^{-6}$ m³/mg_{CeO2}/min, but the sum of the squares of the error between the calculated and measured concentrations of POX was very high. In fact, the experiments wherein the POX was diluted were quite well-fitted, but for all the experiments wherein the POX was concentrated, the estimated conversion was 100%. Other estimations were performed on two groups of experiments separately: the diluted POX experiments (10 to 13) and the concentrated POX experiments (1 to 9). With the diluted POX experiments, another parameter value was found near the first one: $k = 36.2 \cdot 10^{-6}$ m³/mg_{CeO2}/min. With this value, as it can be seen on Figure 2, all the conversions of the diluted POX experiments have been well-fitted.

(a)



(b)

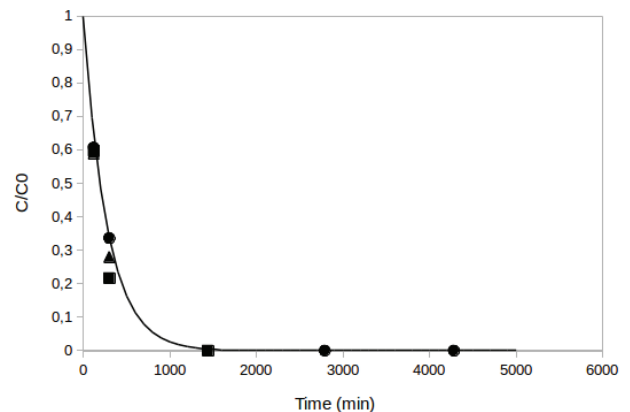


Figure 2: Experimental and simulated C/C_0 ratio vs time for diluted experiments (a) diluted 100 mg (b) diluted 200 mg.

It can be pointed out that the conversion in experiments 10 and 11 seem to be limited to about 90%. However, the first order kinetics model is not able to take into account this behaviour. Janos *et al.* proposed to introduce a maximal conversion to be reached in their equation, but it is not satisfactory.

Regarding the concentrated POX experiments, no first order parameter value suitable to fit all the experiments has been found. This confirms that a first order kinetic law depending on the CeO₂ weight is not accurate to represent the POX degradation.

4.4.2. Langmuir-Hinshelwood kinetic model

For the concentrated experiments, the CeO₂ particles show a Turn Over Frequency (TOF) up to 100 times higher than the ones for the diluted experiments. Thus, an inhibition by the dilution solution (HBSS) is suspected.

4.4.2.1. Effect of HBSS volume on kinetics

HBSS contains Potassium Chloride (KCl) (5.3 mmol/L), Potassium Phosphate monobasic (KH₂PO₄) (0.4 mmol/L), Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) (4.2 mmol/L), Sodium Chloride (NaCl) (137.9 mmol/L), Sodium Phosphate dibasic (Na₂HPO₄) (0.3 mmol/L) and D-Glucose (Dextrose) (5.5 mmol/L). These salts can have an impact on CeO₂ absorption efficiency.

The aggregation of NPs is fundamentally governed by the interfacial force between particles, which includes several either attractive or repulsive forces. When the attractive force is greater than the repulsive force, NPs approach each other and aggregate; otherwise, NPs stay stable (Chen & Li, 2012). The Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory has been widely used to characterize the interfacial force between particles. According to DLVO, van der Waals forces (components of dispersion called London dispersion forces, induced dipole and polarization) and electrostatic interaction compose the interfacial force. Non-DLVO forces (polar Lewis acid/base (AB) force and steric force) also exist. Thus, the theory which includes Non-DLVO forces and DLVO theory is known as the extended DLVO (EDLVO) theory (Van Oss, 2006). The effects of ionic strength by adding salts as KCl and CaCl₂ on CeO₂ aggregation has been investigated by several authors (Chen & Li, 2012, Buettner *et al.*, 2010; Oriekhova & Stoll, 2016). Chen & Li (2012) found that, at ambient temperature (25°C) and pH 4.5, an increase of salts concentration had an effect on decreasing zeta potential and thus an agglomeration of particles. The critical coagulation concentration (CCC) for CeO₂ NPs in KCl

was 40 mmol/L. In CaCl₂, CCC was 10 mmol/L. The lower CCC for CeO₂ NPs in CaCl₂ solutions than those in KCl solutions is due to divalent ions Ca²⁺ which more effectively screen the surface charge of NPs and subsequently enhance the aggregation (Chen & Li, 2012). Buettner *et al.* (2010) found that the CCC, at pH 11.0 and at 22°C, was 80 mmol/L and 16 mmol/L for NaCl and CaCl₂ salts, respectively. Indeed, Buettner *et al.* (2010) found that the CCC of NaCl was 80 mmol/L for the aggregation of CeO₂ particles at very basic pH (11.0). In case of diluted experiment, the pH of the solution was 10. The concentration of salts (KCl, NaCl) was nearly or superior to this CCC except for the experiments n°7 (where no HBSS was added), n°3 (concentration of sodium equal to 2.7.10⁻² mmol/mL) and n°6 (concentration of salts equal to 5.3.10⁻² mmol/mL). It confirms that the high concentration of salts led to the high aggregation of solid particles by reducing the repulsion forces between NPs and can limit the catalytic reaction.

HBSS also contains phosphate groups PO₄. It is well known that CeO₂ can form complexes with molecules containing phosphate groups (Dahle *et al.*, 2015, Ogata *et al.*, 2011; Recillas *et al.*, 2012) as phosphate poly(ethylene glycol) (Qi *et al.*, 2012) via electrostatic or acido-basic interactions. Indeed, the hard/soft acid/base theory predicts the tendency of hard acidic Cerium to strongly bond with hard base ligands such as phosphate. Phosphate sorption increases with increasing initial concentration of PO₄ (Dahle *et al.*, 2015). Nevertheless, at high pH, the surface of CeO₂ becomes more negative and repels HPO₄²⁻ or PO₄³⁻ species, decreasing P sorption. Thus, some PO₄ coming from salts and POX can reduce the number of vacant sites and have a negative impact on the catalysis of POX. Indeed, the second product of POX decomposition is the diethylphosphate that also contains Phosphore.

The number of moles of K⁺, Na²⁺ and PO₄, that can be considered as reduction of active sites and consequently as inhibition, were recalculated in each experiment and are given in Table 2.

4.4.2.2. Estimation of the k parameters in the Langmuir-Hinshelwood kinetic model

A Langmuir-Hinshelwood kinetic model was considered with POX and water as reactants and with two inhibiting lumps: the first “P” contains all components made up Phosphore (DiEtP, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) and the second “Na” contains salts (KCl, NaHCO₃, NaCl). For the Langmuir-Hinshelwood kinetic model, the chemical rate equation is:

$$r = \frac{k_1 C_{POX} C_{H_2O}}{1 + k_2 C_P + k_3 C_{Na}} \quad (10)$$

No single set of parameters accurate for all the experiments has been obtained. Two sets of parameters have been found (Table 4): the one for the diluted experiments and the second for the concentrated experiments. The accuracy of the sets can be seen on the parity curves in Figure 3 a and b.

Table 4: Sets of parameters obtained with the Langmuir-Hinshelwood kinetic model.

Parameters	k_1	k_2	k_3
Diluted experiments	$14.85 \cdot 10^{-6}$	$9.99 \cdot 10^{+3}$	10^{+2}
Concentrated experiments	$20.16 \cdot 10^{-6}$	10^{+5}	$9.99 \cdot 10^{+3}$

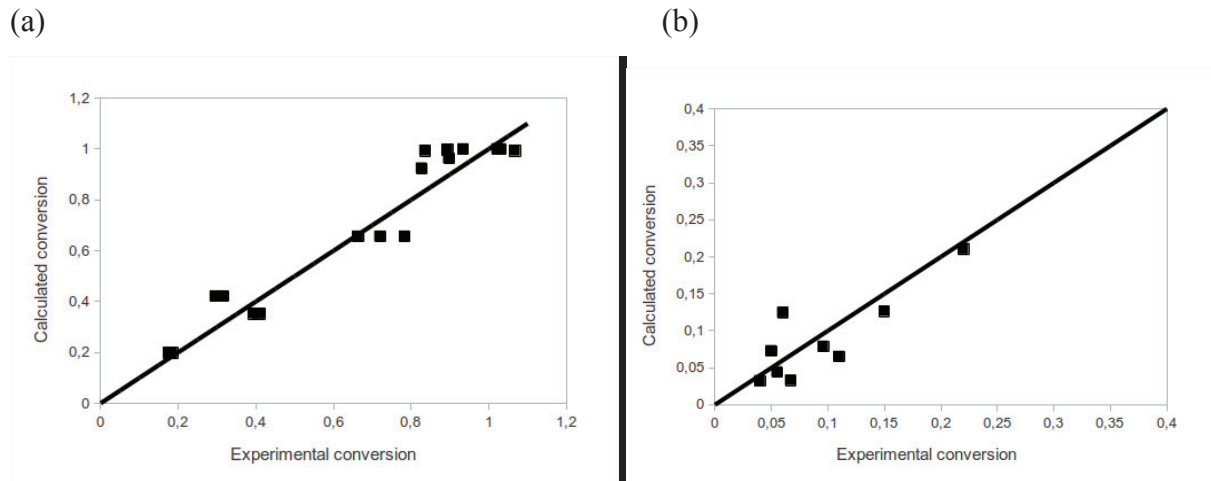


Figure 3: Parity curves. Experimental vs calculated conversion for diluted experiments (a) and concentrated experiments (b).

The values of the parameter k_1 are of the same order of magnitude. However, the values of the parameters k_2 and k_3 are further different from each other, but each rate $k_2 C_P$ and $k_3 C_{Na}$ is greater than 1 and interferes with the rate of POX decomposition. For diluted experiments, the rates $k_2 C_P$ are lower than the rates $k_3 C_{Na}$ showing the predominant effect of salts and for concentrated experiments, the reverse is observed, this is a predominant effect of P.

4.4.3. Particle aggregation kinetic model

The Langmuir-Hinshelwood kinetic model assumes an adsorption equilibrium of each component at the solid surface to take into account the decrease of activity with salts concentration. In this following model, we have tried to take into account the decrease of the ceria surface due to the aggregation of particles induced by the salt concentration (see § 4.4.2.1.). We considered a fixed number of available sites (-OH sites) on the CeO₂ surface and this surface is progressively decreased by salts and the -OH sites are blocked by Phosphore compounds. We assume that all particles of ceria are spherical and at the initial time, all of them have the same radius R₀. The initial number of particles N_{p0} can be determined by the following equation:

$$N_{p0} = \frac{W}{\rho V_{p0}} = \frac{W}{\rho} \frac{3}{4\pi R_0^3} \quad (11)$$

Where

W is the ceria weight (mg),

ρ is the density of CeO₂ particles = 1.5 mg/mL

R₀ is the initial mean radius of spherical particles (cm)

and the total surface of ceria particles can be expressed as:

$$S_T = N_p 4\pi R^2 = N_p 4\pi \left(\frac{W}{\rho N_p} \frac{3}{4\pi} \right)^{\frac{2}{3}} = (4\pi N_p)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{3W}{\rho} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (12)$$

Thus, we considered a mass balance equation for the POX conversion:

$$\frac{dC_{POX}}{dt} = -k_4 C_{POX} S_T = -k_4 C_{POX} (4\pi N_p)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{3W}{\rho} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (13)$$

and a balance of particle number:

$$\frac{dN_p}{dt} = -k_5 \frac{N_p}{V} \frac{N_p}{V} \quad (14)$$

We considered that the particle number decrease is a function of the density of the particles in the liquid phase, the density of the particles increasing the occurrence of collision and thus of the aggregation. For each experiment, W and ρ can vary as operating conditions but are not function of time or concentrations contrary to N_p.

In a first model, we assumed that the particle number decrease also was a function of salt concentration. But this model didn't fit very well the experimental data.

For the aggregation model, we have showed that the estimated parameters k_4 and k_5 depend on the value of the initial particle radius R_0 putted in the code as parameter and then in all cases, $k_4 = 9.42 \cdot 10^{+3} R_0$ and $k_5 = 1.61 \cdot 10^{-7} R_0^3$.

The parity curve for the diluted and concentrated experiments is given in figure 4 showing a good suitability of the estimated parameter values.

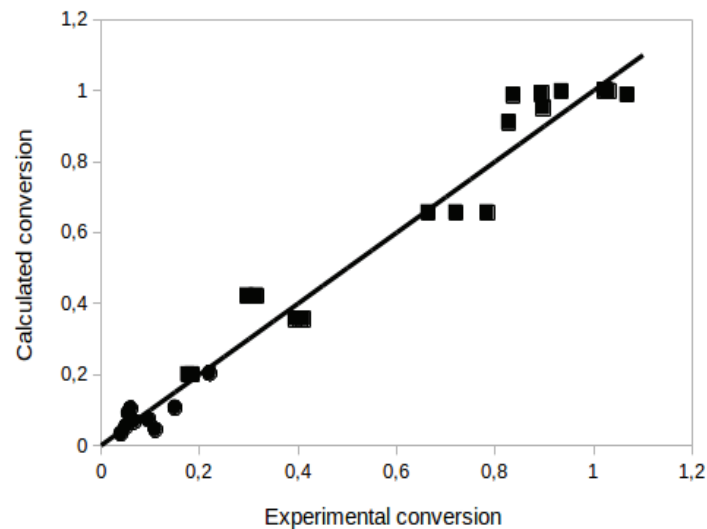


Figure 4: Parity curve. Experimental vs calculated conversion for diluted experiments (■) and concentrated experiments (●).

For some experiments, with concentrated and diluted POX, the profiles of C/C_0 ratio and N_p have been simulated and C/C_0 ratio and N_p have been compared to the corresponding experimental data (Figure 5).

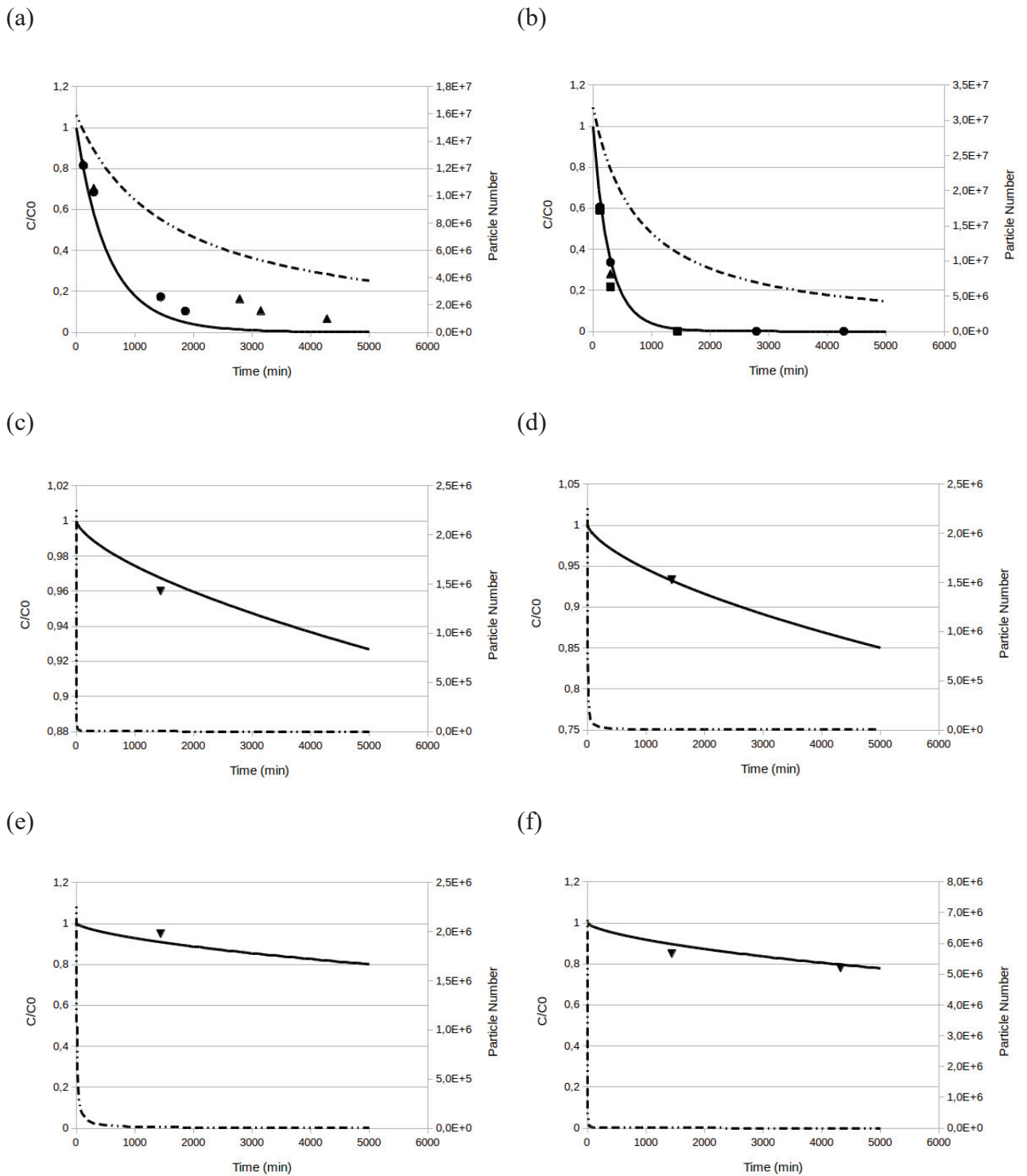


Figure 5: Experimental and simulated C/C_0 ratio and N_p vs time (dotted line : secondary axis) for some experiments (a) diluted 100 mg (b) diluted 200 mg (c) experiment n°7 (d) experiment n°3 (e) experiment n°1 (f) experiments n°8-9 .

The simulated and experimental data are in a good accordance for diluted experiments but also for concentrated experiments with the same set of kinetic parameters. This shows that the

particle aggregation model seems to be the model which better represents the physical and chemical behavior during the POX conversion. The aggregation was more important for the concentrated experiments (Fig. 5 c and f) compared to the diluted experiments (Fig. 5 a to b) while the salt concentration was more concentrated in diluted experiments than in concentrated experiments. It demonstrated that salts is not the predominant factor which enhance aggregation.

Indeed, in case of concentrated experiments, there was a physical compaction due to the high density or consistency of solid (sedimentation) where the tubes were not stirred: the N_p decrease rate is huger than the N_p decrease rate for the diluted ones. The W/V_{TOT} ratio have a more important impact rather than the salt concentration for concentrated experiments. In case of diluted experiment, the low consistency of solid particles decreased the aggregation rate of CeO_2 particles especially since the tubes were shaken all along the experiment.

4.4.4. *In vitro* skin experiment

The aim of the study was to find the parameters which govern the degradation of POX using CeO_2 NPs for the purpose of *in vitro* skin decontamination studies. Nevertheless, the conditions in *in vitro* skin experiment are quite different because, first of all, ceria and POX permeate progressively in the skin. 25.4 μ L of POX was deposited on the skin surface and permeated the skin via intercellular or intracellular pathways. Thus, its concentration on the skin surface decreases with time. Moreover, the decontamination process complicated the system for the modelling of POX degradation using ceria on skin.

CeO_2 was applied 1 h after skin exposure to POX, mass on the skin and the excess of decontaminant was removed. Thus, the final amount of CeO_2 or water which remained on the skin is difficult to determine. Several hypotheses have been put forward in order to simplify the system: (i) the CeO_2/POX and $CeO_2/water$ ratios were maintained before and after skin decontamination, (ii) because ceria was too agglomerated to penetrate the skin, the degradation of POX only took place on the skin surface, (iii) our previous study (Salerno *et al.*, 2016) has demonstrated that 24h after the exposure to the OP compounds, POX remained mostly on the skin surface (98% of the applied dose). We can consider that the permeation of POX in the skin was negligible.

For these experiments, with skin decontamination of POX using ceria, the profiles of C/C_0 ratio and N_p have been simulated and they have been compared to the corresponding experimental data (Figure 6a and b).

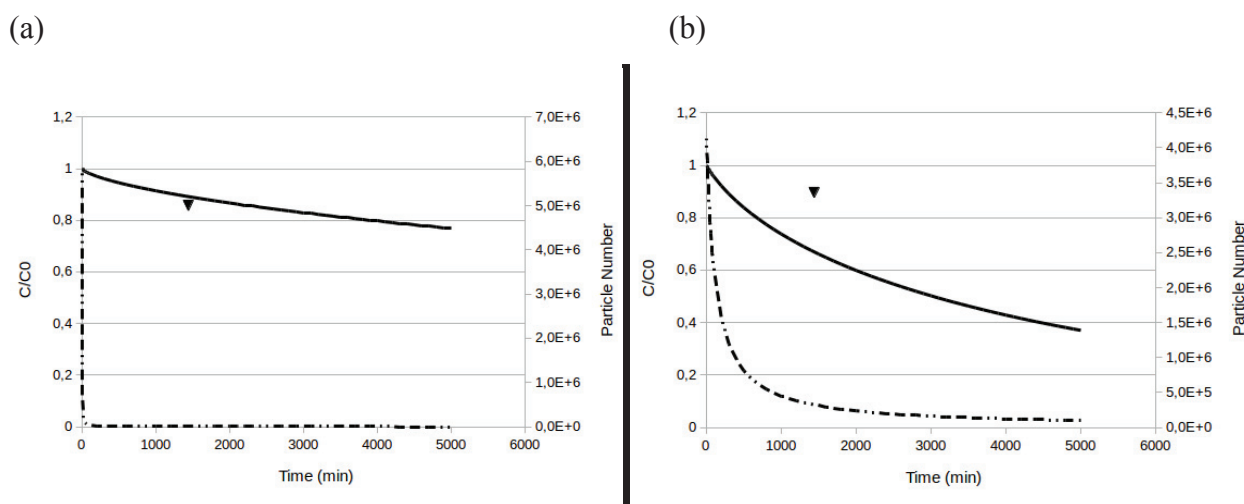


Fig. 6: Experimental and simulated C/C_0 ratio and N_p vs time (dotted line: secondary axis) for skin decontamination of POX using dry ceria (a) and CeO_2 -W (b).

Using the particle aggregation model, we observe that simulated and experimental data are also in a good accordance for skin decontamination experiment with dry CeO_2 . It confirms that the permeation of POX or CeO_2 during the experiment had no impact on the degradation efficiency. It shows that experiment realized in a tube (experiment n°7 was made in the same W_{CeO_2}/V_{POX} ratio) which seemed to have different results, was in fact representative of the degradation of POX on the skin surface. It becomes an advantage in time gain for the selection of optimal conditions for skin decontamination of POX using CeO_2 powder.

CeO_2 -W was formulated with deionized water. In the absence of salts, the NPs aggregated slower (Fig. 6): the catalytic degradation of POX should be faster. However, using CeO_2 -W as a skin decontaminant, the simulated C/C_0 ratio is over-estimated compared to the experimental data. Two reasons can cause an incorrect estimation of C_{POX} and W_{CeO_2} in the set of parameters. First, permeation of POX or CeO_2 during the experiment can occur in this case. Indeed, water is a skin absorption enhancer (El Hussein *et al.*, 2007) and can cause the absorption of POX and CeO_2 during the experiment. Secondly, during the skin decontamination process, the excess of decontaminant was removed with a second sponge. The sponge can easily absorb water contained in CeO_2 -W but also POX present on the skin. The quantification of POX and water absorbed by the sponges should be carried out for a better estimation of C_{POX} . The determination of POX degradation using a liquid skin decontaminant is thus more delicate.

5. Conclusion

The particle aggregation kinetic model is the best model to predict the degradation of POX using CeO₂ nanoparticles in aqueous media. The model takes into account the weight of ceria, POX and HBSS volumes but also the consistency of the mix and the salts concentration which can increase the aggregation of solid particles and decrease the conversion of POX into PNT. The Table 3 summarize the impact of the assumptions describe above on the catalysis.

Table 3: Key parameters which have an impact on the kinetic degradation of POX

Key parameter	Impact on the kinetic degradation of POX
C _{POX}	Positive
W _{CeO2}	Positive
Reaction time	Positive
W/V _{tot} (consistency)	Positive with a medium consistency (about 400 mg/mL) Negative with high consistency : it enhances the particle aggregation Negative with low consistency : it reduces the POX concentration and thus the kinetics
K ⁺ and Na ⁺ coming from HBSS	Negative : they cause agglomeration of particles and decrease the number of vacant sites

The model correctly forecasts the degradation efficiency of CeO₂ powders during *in vitro* skin experiments. However, it does not work with an aqueous decontaminant which complicated the system (water enhance the skin absorption of POX, use of a sponge to remove the excess). Even if the reaction is slow, it lasts in time tends towards zero. However, as demonstrated one experiment and the results of Janos (Janos *et al.*, 2014), a residual fraction of POX at the end of the reaction persist which is not due to mass transfer limitation. Further research must be investigated to understand this phenomenon.

Acknowledgments

We thank Direction Générale de l'Armement (DGA) for their financial support.

Nomenclature:

d_p : mean particle diameter of CeO₂

C_{POX} : the concentration of POX (mmol/mL)

D_e : the effective POX diffusivity equal to 10^{-9} m²/s,

D_m : the POX molecular diffusivity equal to 10^{-10} m²/s,

k : the kinetic parameter in the first order kinetic model

k_1 : the kinetic parameter reflecting the contribution of POX in the Langmuir-Hinshelwood kinetic model

k_2 : the kinetic parameter reflecting the contribution of Phosphore in the Langmuir-Hinshelwood kinetic model

k_3 : the kinetic parameter reflecting the contribution of salts in the Langmuir-Hinshelwood kinetic model

k_4 : the kinetic parameter of POX conversion in the particle aggregation kinetic model (mL/mg/min/m²)

k_5 : the kinetic parameter of particle aggregation

k_D : is the mass transfer coefficient (m/s)

N_P : the total number of particles of Cerium oxide putted into the tube (-)

n_{PNT} : number of moles of POX converted into PNT (mmol)

$n_{\text{POX},0}$: initial number of moles of POX (mmol)

R or \bar{r}_p : the chemical rate

R_0 : the initial mean radius of spherical particles (cm)

S_T : the geometric area of Cerium oxide spherical particles putted into the tube (m²)

t : reaction time (min)

TOF: Turn Over Frequency (TOF) (mmol/min/mg)

V_{TOT} : the global volume of POX solution and added HBSS or water (mL)

W : weight of CeO₂ NPs (mg)

X : conversion rate of POX into PNT

ρ : the density of CeO₂ particles (mg/mL)

References:

- Boutard. T., Rousseau. B., Couteau. C., Tomasoni. C., Simonnard. C., Jacquot. C., Coiffard. L.J.M., Konstantinov. K., Devers. T., Roussakis. C., 2013. Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO₂. *Mater. Lett.* 108. 13–16.
- Buettner, K.M., Rinciog, C.I., Mylon, S.E., 2010. Aggregation kinetics of cerium oxide nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 366 (1-3): 74–79.
- Huang, Y., 2012. Temperature Effect on the Aggregation Kinetics of CeO₂ Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolytes. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology.* 2(7).
- Dahle, J.T., Livi, K., Arai, Y., 2015. Effects of pH and phosphate on CeO₂ nanoparticle dissolution. *Chemosphere.* 119: 1365–1371.
- Dzyadevych. S.V., Soldatkin. A.P., Chovelon. J.-M., 2002. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. *Analytica Chimica Acta.* 459. 33–41.
- El Hussein, S. Muret, P., Berard, M., Makki, S., Humbert, P., 2007. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermisedermis layers (ex-vivo study), *Exp. Dermatol.* 16: 830-836.
- Eto. M. *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*; CRC Press: Boca Raton. FL. 1979; p 93
- Gomaa H.M. & Faust S.D., 1972. Chemical Hydrolysis and Oxidation of Parathion and Paraoxon in Aquatic Environments. 111: 189–209.
- Hassail. K. A. *The Biochemistry and Uses of Pesticides.* 2nd ed.; VCH: Weinheim. 1990; pp 269-275.
- Hayes. W.J. and E.R. Laws (ed.). 1990. *Handbook of Pesticide Toxicology.* Vol. 3. Classes of Pesticides. Academic Press. Inc.. NY.
- Janos, P., Kuran, P., Kormunda, M., Stengl, V., Grygar, T. M., Dosek, M., Stastny, M., Ederer, J., Pilarova, V., Vrtoch, L., 2014. Cerium dioxide as a new reactive sorbent for fast degradation of parathion methyl and some other organophosphates. *J. of Rare Earths.* 32 (4): 360-369.
- Kennedy. D.J., Mayer. B.P., Baker. S.E., Valdez. C.A., 2015. Kinetics and speciation of paraoxon hydrolysis by zinc(II)–azamacrocyclic catalysts. *Inorganica Chimica Acta.* 436. 123–131.
- Liao, X., Zhang, C., Liu, Y., Luo, Y., Wu, S., Yuan, S., Zhu, Z., 2016. Abiotic degradation of methyl parathion by manganese dioxide: Kinetics and transformation pathway. *Chemosphere.* 150: 90–96.
- Meister. R.T. (ed.). 1992. *Farm Chemicals Handbook '92.* Meister Publishing Company. Willoughby. OH
- Misik. J., Pavlikova. R., Cabal. J., Kuca. K., 2015. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 38. 32–36.
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: in vitro Method*, OECD, Paris, 2004.
- Ogata, F., Tominaga, H., Yabutani, H., Kawasaki, N., 2011. Phosphate adsorption ability of granular gibbsite and cerium hydroxide. *J. Oleo Sci.* 60: 133–138.
- Oriekhova, O., Stoll, S., 2016. Stability of uncoated and fulvic acids coated manufactured CeO₂ nanoparticles in various conditions: From ultrapure to natural Lake Geneva waters. *Science of The Total Environment.* 562: 327–334.

- Prasad, G.K., Ramacharyulu, P.V.R.K., Kumar, J.P., Srivastava, A.R., Singh, B., 2012. Photocatalytic degradation of paraoxon-ethyl in aqueous solution using titania nanoparticulate film. *Thin Solid Films*. 520: 5597–5601.
- Qi, L., Fresnais, J., Muller, P., Theodoly, O., Berret, J.-F., Chapel, J.-P., 2012. Interfacial Activity of Phosphonated-PEG Functionalized Cerium Oxide Nanoparticles. *Langmuir*. 28 (31): 11448–11456.
- Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A., Font, X., 2012. Preliminary study of phosphate adsorption onto cerium oxide nanoparticles for use in water purification; nanoparticles synthesis and characterization. *Water Sci. Technol*. 66: 503–509.
- Rousseau. J.. Rüttimann. M.. Brinquin. L.. 2000. Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim*. 19. 588–598.
- Salerno, A., Devers, T., Bolzinger, M.-A., Pelletier, J., Josse, D., Briançon, S., 2016. In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO₂. *Chemico-Biological Interactions*.
- Savio. A.K.P.D.. Fletcher. J.. Smith. K.. Iyer. R.. Bao. J.M.. Robles Hernández. F.C.. 2016. Environmentally effective photocatalyst CoO–TiO₂ synthesized by thermal precipitation of Co in amorphous TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental*. 182. 449–455.
- Saxena. A.. Srivastava. A. K.. Singh. B.. Goyal. A.. 2012. Removal of sulphur mustard, sarin and simulants on impregnated silica nanoparticles. *J. of Haz. Mat*. 211– 212. 226– 232.
- Sharma. N. & Kakkar. R.. 2013. Recent advancements on warfare agents/metal oxides surface chemistry and their simulation study. *Advanced Materials Letters*. 4(7). 508–521.
- Van Oss C.J., 2006. *Interfacial forces in aqueous media*. 2nd Ed. Taylor & Francis. Boca Raton. 456 p.
- Wagner. G.W.. Bartram. P.W.. Koper. O.. Klabunde. K.J. 1999. Reactions of VX, GD and HD. *J Phys Chem B*. 103. 3325-3228.

4. Conclusion sur l'article

Lors des expériences en condition concentrée (très peu d'HBSS ajouté au mélange), la réaction est lente mais présente et la concentration en POX tend vers zéro. Cependant, comme l'a démontré une expérience (n°11) et les résultats de Janos (Janos *et al.*, 2014), une fraction résiduelle de POX, qui ne sont pas en raison de la limitation de transfert de masse, persiste à la fin de la réaction.

Le modèle cinétique d'ordre un ne permettait pas d'obtenir une bonne prédiction de la conversion du POX quelque soit les conditions expérimentales. Le modèle de Langmuir-Hinshelwood, qui démontrait l'impact des sels et des phosphates sur la diminution des sites catalytiques, a donc été testé. Cependant, il ne mettait pas en accord les paramètres cinétiques lorsque le POX était concentré et très dilué.

Le modèle d'agrégation des particules est le meilleur modèle pour prédire la dégradation de la POX par les NPs de CeO₂ en milieu aqueux quelque soit les conditions expérimentales. Le modèle prend en compte la masse de CeO₂, les volumes de POX et d'HBSS mais également la consistance du mélange et la concentration en sels qui peuvent augmenter l'agrégation des particules solides et diminuer l'efficacité de dégradation du POX.

De plus, ce modèle permet de prédire correctement le taux de conversion du POX après une décontamination cutanée *in vitro* par des poudres de CeO₂. Toutefois, il ne fonctionne pas avec le système CeO₂-W. En effet, dans ce cas, le ratio CeO₂/POX n'est pas conservé entre avant et après la décontamination. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, l'eau contenue dans CeO₂-W peut augmenter le passage du POX et du CeO₂ dans la peau. Ceci conduit à une mauvaise estimation de la concentration en POX et en CeO₂ et donc à une mauvaise estimation du taux de conversion X. Des paramètres supplémentaires, rendant compte d'un meilleur lavage de la surface de la peau par les systèmes liquides et du passage du POX et du CeO₂ dans la peau, doivent donc être ajoutés au modèle.

On a ainsi pu se rendre compte des conditions expérimentales qui gouvernent l'efficacité de dégradation des NPs de CeO₂ sur la peau. Un autre paramètre qui impacte considérablement la réactivité des NPs des oxydes métalliques est leur surface spécifique. Nos conditions de synthèses ne permettent pas d'obtenir du CeO₂ avec une surface spécifique importante. L'objectif du chapitre 5 traitera donc de l'optimisation des propriétés physico-chimiques du CeO₂ par la modification des conditions de synthèse des NPs.

Chapitre 5 : Impact des conditions de synthèses sur les propriétés physico-chimiques et l'activité catalytique du CeO₂

1. Introduction

Les conditions de synthèses de la cérine influent sur les propriétés physico-chimiques des NPs (taille, forme, surface spécifique, etc) (Mai *et al.*, 2005 ; Pan *et al.*, 2008) et donc sur leur activité catalytique. L'influence de la nature du micro-onde, de la température et de l'atmosphère lors de la calcination sur la structure et l'état d'oxydation du CeO₂ a été étudiée dans ce chapitre. Janos *et al.* (2014) a déjà démontré l'impact de la température de calcination sur la taille, la surface spécifique et l'état d'oxydation du CeO₂ sur l'efficacité de dégradation du parathion. Le CeO₂ calciné à 500°C a une surface spécifique importante (110 m²/g). En augmentant la température de calcination des NPs, la surface spécifique chute linéairement jusqu'à 700°C et devient presque nulle. L'auteur montre également que les NPs calcinées à 500°C présentent une intensité plus importante du pic du Ce³⁺ en XPS (méthode détaillée dans le paragraphe 4.3.2.2). Aucune corrélation directe n'a été démontrée mais ces deux facteurs semblent permettre au CeO₂ de dégrader la totalité du parathion en quelques minutes. Jusqu'ici nos NPs de CeO₂ étaient obtenues par voie hydrothermale dans un micro-onde où 400 mL de milieu réactionnel étaient introduits. Le précipité était alors calciné sous air (atmosphère oxydante) et environ 7 g de CeO₂ pouvait être obtenu. Dans le cas où ces NPs seraient utilisées à l'échelle industrielle, l'utilisation d'un micro-onde permettant la synthèse d'une quantité plus importante de cérine (et donc un micro-onde avec un récipient de réaction plus important) serait avantageux. Il faut alors vérifier que les propriétés physico-chimiques des NPs soient conservées (taille, surface spécifique, état d'oxydation, activité catalytique). La société Anton Paar mettant à disposition un micro-onde avec une capacité de volume réactionnel d'un litre, une synthèse de CeO₂ a pu être effectuée dans les mêmes conditions de temps et de température. Les propriétés des NPs de CeO₂ obtenus après précipitation et calcination et leur activité de dégradation vis-à-vis du Paraoxon ont été réévaluées.

Chen *et al.* (2011) avait démontré que le TiO₂ calciné sous hydrogène, grâce à un nombre plus important de lacunes d'oxygènes ou la formation des ions Ti³⁺, présente une activité photocatalytique plus importante que calciné sous air. Dans le but d'augmenter la surface spécifique et la réactivité de la cérine, les conditions de calcination ont donc également été changées (températures entre 300 et 600°C sous flux d'hydrogène ou sous flux d'air).

2. Méthodes

2.1. Synthèse des nanoparticules de CeO_2

Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 2 mol/L (NaOH , 98%, Alfa Aesar) est ajoutée à une solution aqueuse de nitrate de cérium à 0,5 mol/L ($\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, 99,5%, Alfa Aesar). Dans le cas du traitement hydrothermal par le Multiwave-3000 (Anton Paar) noté MW1, 400 mL de milieu réactionnel sont répartis dans 4 tubes placés au micro-onde. Dans le cas du Masterwave BTR (Anton Paar) noté MW2, 700 mL de milieu réactionnel sont introduits et mélangés dans un seul récipient à 150°C pendant 15 min. Après refroidissement à température ambiante, le précipité est récupéré par centrifugation et lavé trois fois à l'eau distillée puis laissé à l'air libre une nuit. Les échantillons provenant du MW1 et MW2 sont respectivement nommés CeO_2 -MW1 et CeO_2 -MW2. Les échantillons sont ensuite calcinés à 300, 500 ou 650°C sous flux (200 ml/min, pression atmosphérique) d'air ou d'hydrogène pendant 4h. Les échantillons issus d'une calcination sous H_2 ou sous air sont respectivement nommés CeO_2 -H et CeO_2 -air.

L'ensemble du procédé est illustré en figure 67.

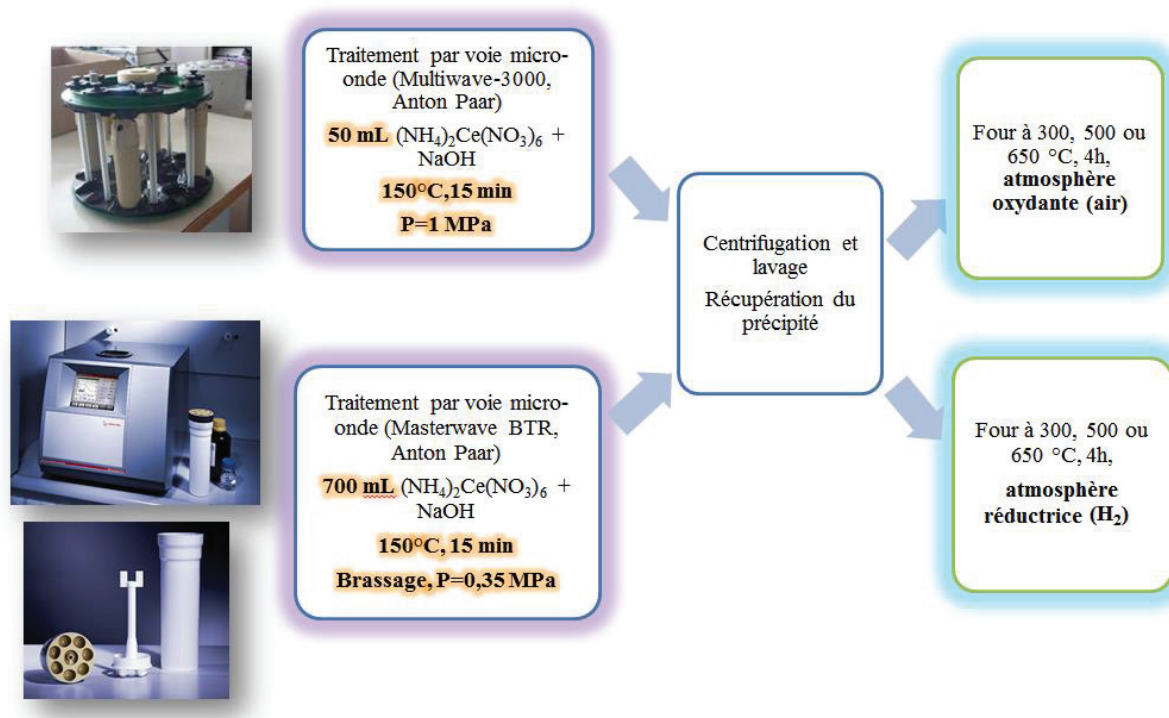


Figure 67 : synthèse des nanoparticules de CeO_2 par voie hydrothermale.

2.2. Caractérisation des NPs

Au vu des premiers résultats (partie 2 expérimentale), les NPs calcinées à 500°C présentent la plus grande réactivité vis-à-vis du Paraoxon : les caractérisations physico-chimiques se sont donc principalement focalisées sur ces NPs.

Les observations Microscopie Electronique à Transmission (MET) (JEOL 2100 HT) ont été effectuées à l'Institut Lumière Matières (ILM, Université Lyon 1) et permettent d'observer la cristallinité, la forme et la taille des NPs. Avant les observations, le CeO₂ est dispersé dans l'eau puis déposé sur des grilles de carbone. Les grilles sont laissées à sécher une nuit. La distribution en taille des NPs est déterminée sur une moyenne de 100 particules.

Les surfaces spécifiques des échantillons ont été déterminées à l'aide d'un analyseur ASAP 2020, par adsorption d'azote au Laboratoire de Génie des Procédés Catalytiques (LGPC, Université Lyon 1). Les méthodes de Brunauer-Emmett-Teller (BET) et Barrett-Joyner-Halenda (BJH) ont été utilisées pour la mesure de la surface spécifique et de la taille des pores.

Les analyses XPS (spectrométrie photoélectronique X) sont effectuées à l'IRCE-Lyon (Université Lyon 1) sur un AXIS Ultra DLD de Kratos Analytical, utilisant une source raie Al K α monochromatisée ($h\nu = 1486.6$ eV) sur une surface de 300 μm x 700 μm et sous vide. Un spectre général est enregistré à 160 eV puis les spectres C 1s, Na 1s, O 1s, Ce 3d sont enregistrés à 40 eV. Elles permettent de déterminer le ratio Ce³⁺/Ce⁴⁺ sur les échantillons obtenus à partir du microonde MW1 et calcinés à 500°C sous flux d'air ou sous flux d'hydrogène.

Des analyses en ATR (Attenuated Total Reflectance) - FTIR (Fourier Transform InfraRed spectroscopy) ont été effectuées sur les échantillons de CeO₂-MW1 calcinés à 500°C sous air ou H₂ afin de comparer la présence des groupements chimiques (IRPrestige-21, Shimadzu). Les échantillons ont été mis en contact avec de l'eau distillée puis séchés 48h à 45°C. Les spectres sont obtenus sur les échantillons préalablement placés sur un cristal et pressés. Le bruit de fond est obtenu sur le cristal nettoyé. Les analyses sont réalisées entre 4000 cm⁻¹ et 400 cm⁻¹.

2.3. Evaluation de l'efficacité de dégradation du CeO₂ vis-à-vis du POX

Le protocole est similaire à celui détaillé dans le chapitre 1 (partie 1.1) à l'exception que les quantités sont divisées par deux : une solution de POX diluée à 200 $\mu\text{mol/L}$ dans l'HBSS est

mise en contact avec 100 mg de CeO₂ pendant 5h. Le ratio reste donc de 2 µmoles de POX par gramme de CeO₂. La réaction du CeO₂ avec le POX est réalisée à température ambiante et à l'obscurité.

3. Résultats et discussion

3.1. Structure du CeO₂ : surface spécifique, taille des cristallites et des pores

La surface spécifique, le volume et la taille des pores du CeO₂ obtenu par voie hydrothermale avec le MW1 ou le MW2 et calciné à différentes températures sont indiqués dans le tableau 24. La taille des cristallites déterminée sur 100 NPs à partir des observations en MET (Figure 68) y est également indiqué.

Tableau 24 : Tailles, surface spécifique, taille et volume des pores du CeO₂ obtenus par les différentes voies de synthèses.

	surface spécifique (m ² /g)	taille des pores (nm)	Volume des pores (cm ³ /g)	taille nanoparticules (nm)
MW1 - non calciné	-	-	-	3,2 ± 0,4
MW1 - 300°C H ₂	-	-	-	-
MW1 - 300°C air	9,1	11,42	0,02	-
MW1 - 500°C H ₂	12,4	7,48	0,04	16,2 ± 4,5
MW1 - 500°C air	5,4	10,85	0,02	9,2 ± 2,1
MW1 - 650 °C air	2,25	28,18	0,01	-
MW2 - non calciné	-	-	-	4 ± 0,1
MW2 - 300°C H ₂	77	3,03	0,054	4,5 ± 0,5
MW2 - 300°C air	48	3,16	0,04	
MW2- 500°C H ₂	33	4,9	0,05	48,2 ± 14,6
MW2 - 500°C H ₂ (reproduit)	22	7,2	0,05	-
MW2 - 500°C air	-	-	-	13,6 ± 3,5

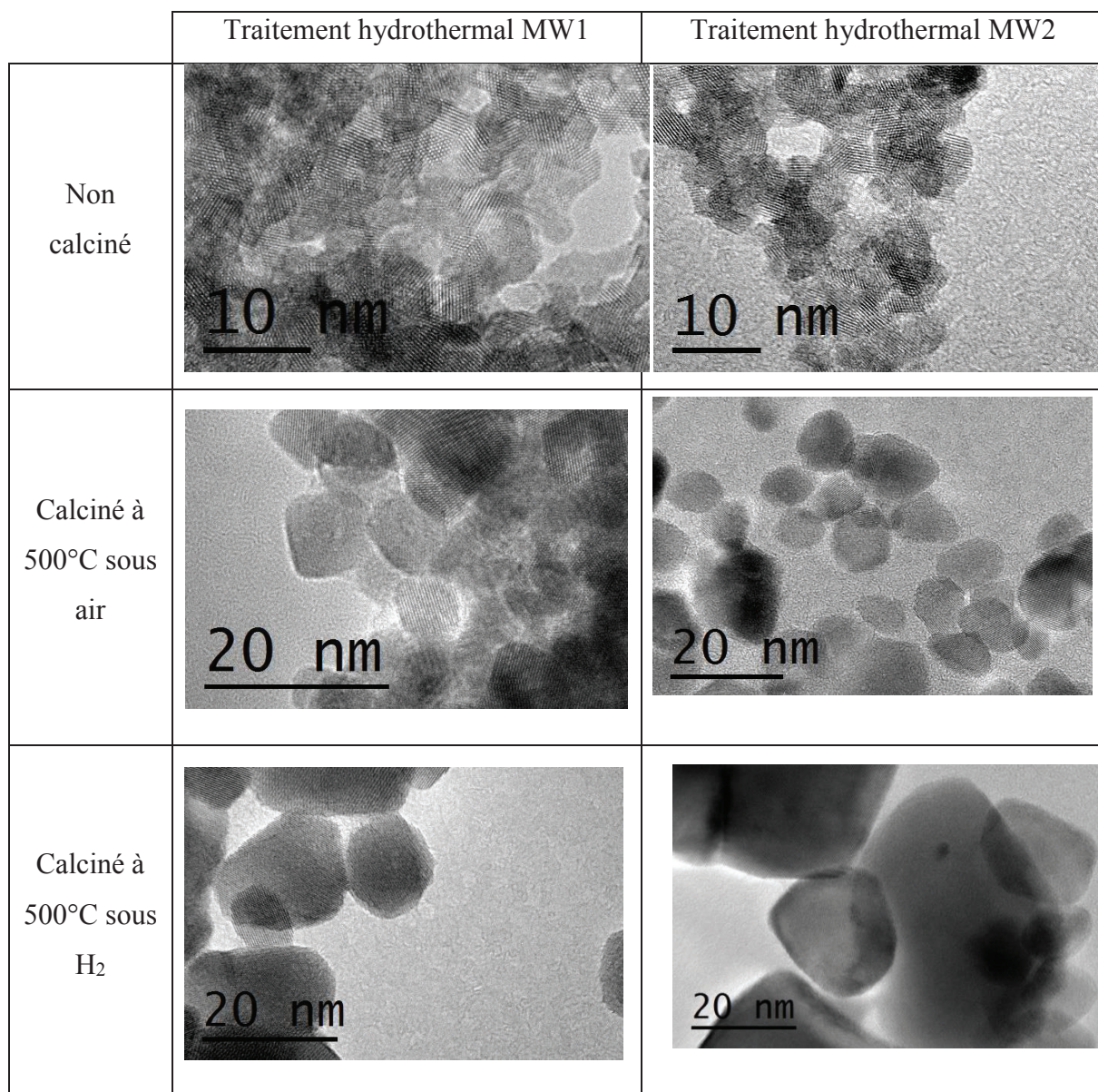


Figure 68 : Images obtenues en MET des échantillons de CeO₂

La surface spécifique est directement reliée au volume ou au diamètre des pores : d'une manière générale, le volume des pores augmente exponentiellement avec la surface spécifique (Figure 69). On ne discutera alors que sur la surface spécifique des NPs.

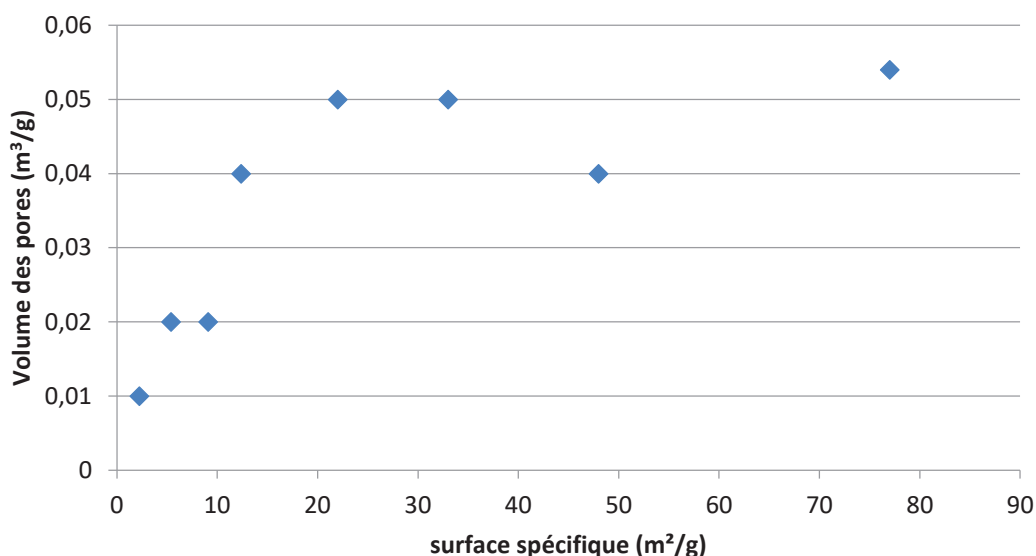


Figure 69 : Evolution de la surface spécifique des nanoparticules de CeO₂ en fonction du volume des pores

3.1.1. Impact de la pression lors du traitement hydrothermal

Les conditions de température sont identiques lors du traitement par MW1 et par MW2. Par contre, la pression mesurée par les capteurs lors du traitement hydrothermal par MW1 est 3 fois supérieure (1 MPa) à la pression avec MW2 (0,35 MPa). Les clichés MET (Figure 68) montrent qu'à la sortie du microonde, les CeO₂-MW1 ont une taille légèrement inférieure (3 nm) aux CeO₂-MW2 (4 nm). L'étude de Da Silva *et al.* (2015) a démontré que l'augmentation de la pression de 0,35 GPa à 1 GPa lors d'une synthèse de CeO₂ induit une pression permanente sur les NPs ce qui affaiblit les liaisons Ce-O et induit une diminution de la longueur de chaînes Ce-O et donc de la taille des cristallites.

3.1.2. Impact de la température et de l'atmosphère lors de la calcination

En calcinant et en augmentant la température de calcination, notamment au-delà de 500°C, la taille des cristallites augmente et a pour conséquence une diminution de la surface spécifique. En effet, les CeO₂-MW1 calcinés à 300, 500 et 650°C en atmosphère oxydante (flux d'air) ont respectivement une surface spécifique de 9,1 m²/g, 10,9 et 28,2 m²/g (tableau 24). Les échantillons de cérine obtenus par MW2 et calcinés dans les mêmes conditions ont une surface spécifique largement supérieure aux échantillons obtenus par MW1 : sous atmosphère oxydante et à 300°C, les NPs ont une surface spécifique de 48 m²/g.

Les traitements sous H₂ ont également tendance à augmenter la surface spécifique des NPs. Par exemple, le CeO₂ obtenu par MW1 et calciné à 500°C a une surface spécifique de 5 m²/g sous atmosphère oxydante et de 12 m²/g sous atmosphère réductrice. Or sous atmosphère réductrice, la taille des cristallites est augmentée et très hétérogène (écart type important) (Figure 68). Le traitement sous H₂ favorise donc la libération des pores entre les NPs. Il n'a pas été trouvé d'explication à ce phénomène dans la littérature.

La taille des pores du CeO₂ traité par MW1 et calciné est équivalente à la taille des cristallites. Il se peut que la taille des pores calculée par la méthode BJH ne soit pas la taille des pores entre les NPs mais entre deux agrégats de NPs. Cette information confirme la forte agrégation du CeO₂.

La surface spécifique importante et la taille des pores inférieures à la taille des cristallites démontrent que les NPs obtenues par MW2 sont moins agrégées.

Sous atmosphère réductrice et à haute température, la mobilité des atomes augmente et les réarrangements de la maille sont accélérés (Naldoni *et al.*, 2012). Par exemple, la calcination sous hydrogène favorise la transformation de la phase anatase du TiO₂ en phase rutile (Ioannidou *et al.*, 2016). Concernant nos échantillons de CeO₂, l'énergie de surface des NPs augmentant avec l'accroissement de la température et l'atmosphère hydrogénée, on observe une augmentation de la taille et une densification des NPs.

Les échantillons de CeO₂ normalement obtenus par MW1 et calcinés à 500°C sous air ont toujours eu des propriétés physico-chimiques similaires et une activité de dégradation du POX identiques. A contrario, les deux échantillons obtenus par MW2 et calcinés à 500°C sous H₂ (reproduits deux fois) possèdent des propriétés physico-chimiques (surface spécifique, taille et volume des pores) différentes et suggère donc des activités catalytiques différentes. La calcination sous H₂ est donc difficile à envisager pour la suite du projet.

3.2. Etat de surface

3.2.1. Observations en MET

A partir des observations en MET, il est possible de détecter la présence de Ce₂O₃ dans l'échantillon de CeO₂-air et CeO₂-H. Les images hautes résolutions (HRTEM) permettent d'observer les plans cristallographiques et donc de mesurer les distances réticulaires dans le

crystal, ainsi que les orientations entre les plans. Par la transformée de Fourier, il est donc possible d'obtenir le diagramme de diffraction de l'image et d'en déduire une phase cristallographiques. On peut ainsi confirmer la nature du cristal. Un exemple est donné en Figure 70.

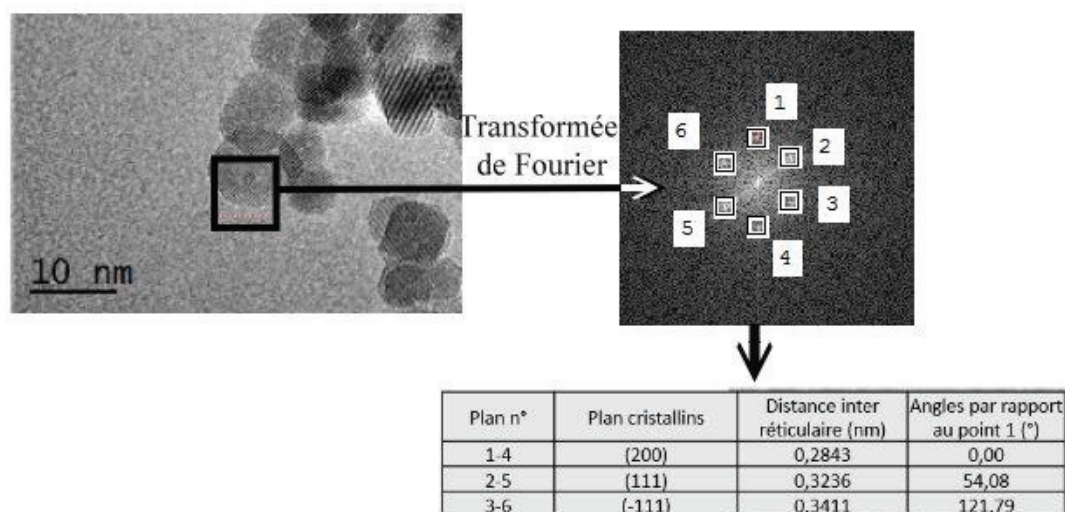


Figure 70 : Obtention du diagramme de diffraction à partir d'une image en MET

Les fiches ICDD du CeO_2 et du Ce_2O_3 permettent de confirmer la nature d'une nanoparticule à partir de la distance entre les plans (distance inter réticulaire) et des angles entre ces plans. Ces paramètres sont calculés à partir des clichés de diffraction. Dans le cas du CeO_2 , les principaux plans cristallins sont les plans (111) (distance inter réticulaires : 3,123 Å), (220) (distance intercalaire : 1,913 Å) et (311) (distance inter réticulaires : 1,631 Å) (Fiche ICDD 00-034-0394 : CeO_2 cubique, groupe d'espace 225) (Figure 71).

Figure 71 : Fiche ICDD 00-034-0394 du CeO_2 cubique, groupe d'espace 225

Space Group: Fm-3m (225) Molecular Weight: 172.12
 Crystal Data [XtlCell a: 5.411 Å XtlCell b: 5.411 Å XtlCell c: 5.411 Å XtlCell α : 90.00°
 XtlCell β : 90.00° XtlCell γ : 90.00° XtlCell Vol: 158.46 Å³ XtlCell Z: 4.00]

d-Spacings (16) - 00-034-0394 (Fixed Slit Intensity) - Cu K α 1 1.54056 Å

2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
28.5543	3.123440	100	1	1	1		76.6977	1.241490	14	3	3	1		117.3129	0.901900	6	6	0	0	
33.0811	2.705640	30	2	0	0		79.0674	1.210120	8	4	2	0		128.3872	0.855610	9	6	2	0	
47.4778	1.913410	52	2	2	0		88.4095	1.104780	14	4	2	2		137.9644	0.825180	6	5	3	3	
56.3336	1.631810	42	3	1	1		95.3937	1.041490	11	5	1	1		141.5594	0.815750	5	6	2	2	
59.0852	1.562210	8	2	2	2		107.2611	0.956620	4	4	4	0								
69.3999	1.353080	8	4	0	0		114.7257	0.914710	13	5	3	1								

Dans le cas du Ce_2O_3 (Fiche 00-023-1048 : Ce_2O_3 hexagonal, groupe d'espace 164), les principaux plans cristallins sont les plans (100) (distance entre les plans ou inter réticulaires : 3,370 Å), (101) (distance intercalaire : 2,945 Å) et (110) (distance inter réticulaires : 1,945 Å) (Figure 72).

Figure 72 : Fiche ICDD 00-023-1048 : Ce_2O_3 hexagonal, groupe d'espace 164

Space Group: P-3m1 (164) **Molecular Weight:** 328.24
Crystal Data [XtlCell a: 3.891 Å **XtlCell b:** 3.891 Å **XtlCell c:** 6.063 Å **XtlCell α :** 90.00°
XtlCell β : 90.00° **XtlCell γ :** 120.00° **XtlCell Vol:** 79.50 Å³ **XtlCell Z:** 1.00]

d-Spacings (2 θ) - 00-023-1048 (Fixed Slit Intensity) - Cu Ka1 1.54056 Å

2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
26.4258	3.370000	30	1	0	0		56.1392	1.637000	30	1	1	2		80.2127	1.195700	7	1	1	4	
29.4545	3.030000	30	0	0	2		56.6670	1.623000	18	2	0	1		81.9917	1.174200	3	2	1	2	
30.3247	2.945000	100	1	0	1		61.0747	1.516000	2	0	0	4		84.9226	1.141000	4	1	0	5	
39.9657	2.254000	30	1	0	2		63.0727	1.472700	5	2	0	2		91.2662	1.077500	7	2	1	3	
46.6606	1.945000	35	1	1	0		67.7310	1.382300	2	1	0	4		93.9913	1.053300	4	3	0	2	
52.7799	1.733000	30	1	0	3		73.0573	1.294100	8	2	0	3		103.0069	0.984200	2	2	0	5	
54.4054	1.685000	4	2	0	0		76.3410	1.246400	11	2	1	1								

L'analyse des plans cristallins a été effectuée sur des NPs individualisées (non superposées avec d'autres NPs) soit en moyenne sur 10 NPs par échantillon. Aucune NP de Ce_2O_3 n'a été identifiée sur ces échantillons.

L'observation de Ce^{3+} par les mesures XPS permettra donc d'obtenir le ratio $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ dans les particules de CeO_2 , sans qu'un biais ne puisse être induit par la présence de Ce_2O_3 .

3.2.2. Mesure en XPS

L'objectif de l'XPS est de déterminer la nature de l'atome (grandeur de l'énergie d'ionisation des électrons de cœur) et leur degré d'oxydation (des petits déplacements du pic sont alors observés en XPS et correspondent à la variation d'énergie entre couches de valence). La composition chimique de l'échantillon est effectuée de la surface du matériau analysé sur une profondeur de 10 nm environ. Des analyses semi-quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur l'intégrale des pics. Les mesures en XPS ont été effectuées sur les échantillons CeO_2 -MW1 non calciné et calciné à 500°C sous flux d'air ou sous flux d' H_2 afin de quantifier le taux de Ce^{3+} et de Ce^{4+} (tableau 25).

Tableau 25 : Ratios des pourcentages atomiques de O/Ce, Ce⁴⁺ et Na/Ce sur trois échantillons de cérine.

	O/Ce	Ce ⁴⁺ /(Ce ³⁺ + Ce ⁴⁺) (% atomique)	Na/Ce
CeO₂ non-calciné	7,28	65	2,71
CeO₂ calciné à 500°C sous air	2,65	56	0,76
CeO₂ calciné à 500°C sous H₂	2,05	59	0,85

Comme précisé dans la thèse de L. Truffault qui a développé la méthode de synthèse du CeO₂ par voie hydrothermale, les mesures en XPS nécessitent la connaissance préalable des spectres de la raie Ce 3d des oxydes de cérium (III) et (IV) purs. Dans le cas du CeO₂ pur, contenant donc idéalement uniquement des ions Ce⁴⁺, le spectre XPS de la raie Ce 3d est composé de 6 pics. Trois pics situés à 882,5, 888,8 et 898,3 eV appartiennent à la raie 3d_{5/2} et trois pics situés à 900,9, 907,5 et 916,8 eV appartiennent à la raie 3d_{3/2}. Dans le cas du Ce₂O₃ pur, contenant uniquement des ions Ce³⁺, le spectre XPS de la raie 3d est composé de 4 pics, deux pics situés à 879,6 et 884,3 eV appartiennent à la raie 3d_{5/2} et deux pics situés à 897,9 et 902,4 eV appartiennent à la raie 3d_{3/2}. Dans le cas d'un échantillon contenant les deux états de valence, le spectre XPS de la raie Ce 3d est donc composé des dix pics cités précédemment se chevauchant (Holgado *et al.*, 2000). Lors de la calcination sous H₂, on s'attend à obtenir un taux de Ce³⁺ plus important que lorsque l'échantillon est calciné sous flux d'air (Holgado *et al.*, 2000).

Le pic à 529,4 eV est attribuable au O 1s (Al-Agel *et al.*, 2015). On remarque dans un premier temps que le ratio O/Ce est largement diminué après calcination : en effet, le chauffage à haute température permet l'élimination de l'eau physisorbée et chimisorbée. Ce ratio est légèrement supérieur dans le cas de l'échantillon CeO₂-MW1-500°C-air que dans le cas du CeO₂-MW1-500°C-H₂. On peut en conclure que la calcination sous atmosphère réductrice permet une meilleure élimination des groupements hydroxyles de surface (ratio O/Ce tend vers 2) et qu'il n'y a pas d'évolution significative de Ce⁴⁺/Ce. Dans le cas d'une calcination sous air, des groupements hydroxyles persistent en surface (ratio O/Ce égal à 2,7).

Le pourcentage atomique de Ce⁴⁺ par rapport au Ce³⁺ est similaire pour tous les échantillons (60% de Ce⁴⁺ et 40% de Ce³⁺). Cependant, ces estimations sont à prendre avec précaution : (i) les incertitudes sont d'environ 20%, (ii) les mesures ont été effectuées sur de

faibles pourcentages atomiques de cérium. En effet, les mesures en XPS ont montré la présence du pic à 1071.5 eV attribuable au Na 1s pour les deux échantillons calcinés dans les deux atmosphères (18% atomique après calcination sous H₂ versus 13% atomique lors de la calcination sous atmosphère oxydante). D'autres auteurs ont montré que la calcination du TiO₂ favorisait la migration des ions Na⁺ à la surface des NPs (Ioannidou *et al.*, 2016 ; Teng *et al.*, 2014 ; Feng *et al.*, 2010). Ce phénomène est encore plus observé lorsque la calcination est effectuée sous atmosphère réductrice. Cependant, le pic du Na 1s est également observé pour l'échantillon non calciné. Le traitement par voie hydrothermale (température consigne de 150°C) et le fait que les échantillons soient placés sous vide lors des mesures XPS doit faire déjà migrer des ions Na⁺ à la surface. Deux hypothèses peuvent être faites :

- Sachant que la précipitation par voie hydrothermale est effectuée en large excès de NaOH, un mauvais lavage du précipité peut amener à la persistance de sodium dans l'échantillon.
- Le cérium et le sodium ont des rayons ioniques identiques (101 pm), on peut alors se demander si le sodium est inclus dans la maille du CeO₂. Truffault *et al.*, (2010) a démontré que le dopage du CeO₂ par du Ca²⁺ (rayon ionique : 100 pm) était possible. Ce dopage n'est pas visible en DRX.

Afin d'invalider l'une des hypothèses, des analyses en ICP (Spectrométrie à Plasma à Couplage Inductif) sur l'échantillon de CeO₂ non calciné. L'ICP est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser la quasi-totalité des éléments simultanément. On l'utilise ici pour doser le Sodium dans l'échantillon. 0,95% en poids de Na ont été détecté dans l'échantillon de CeO₂ non calciné. Ce résultat explique en partie la grande présence de Na en XPS. L'échantillon a été relavé à l'eau distillée puis repassé en ICP. Les résultats montrent que moins de 0,1% de Na ont été quantifié dans l'échantillon. Le lavage à l'eau distillée est suffisant pour réduire d'un facteur 10 le taux de sodium. Ceci permet de confirmer la première hypothèse dans laquelle un mauvais lavage de l'échantillon est à l'origine de la présence de sodium dans les échantillons de CeO₂.

3.2.3. Mesure en FTIR

Les figures 73 et 74 montrent les spectres FTIR de l'échantillon CeO₂-air et CeO₂-H₂ après calcination à 500°C. Les deux spectres présentent une large bande d'absorption située à environ 500 cm⁻¹ qui est attribuée à la liaison Ce-O (Wang & Sun, 2008 ; Andreescu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2008). Après exposition des échantillons à l'air ambiant, il est normal d'observer une large bande à 3300 cm⁻¹ qui correspond aux groupements hydroxyles adsorbés sur l'échantillon

(Ce-OH) (Wang & Sun, 2008). La bande située à environ 1640 cm^{-1} est attribuée au groupement H-O-H (Phoka *et al.*, 2009), et indique également la présence d'eau résiduelle. Les bandes situées à environ 725 , 840 et 1063 cm^{-1} correspondent respectivement au CO_2 , CO_3 et C-O (Wang *et al.*, 2007). Ces bandes sont liées à la présence de CO_2 dans l'atmosphère.

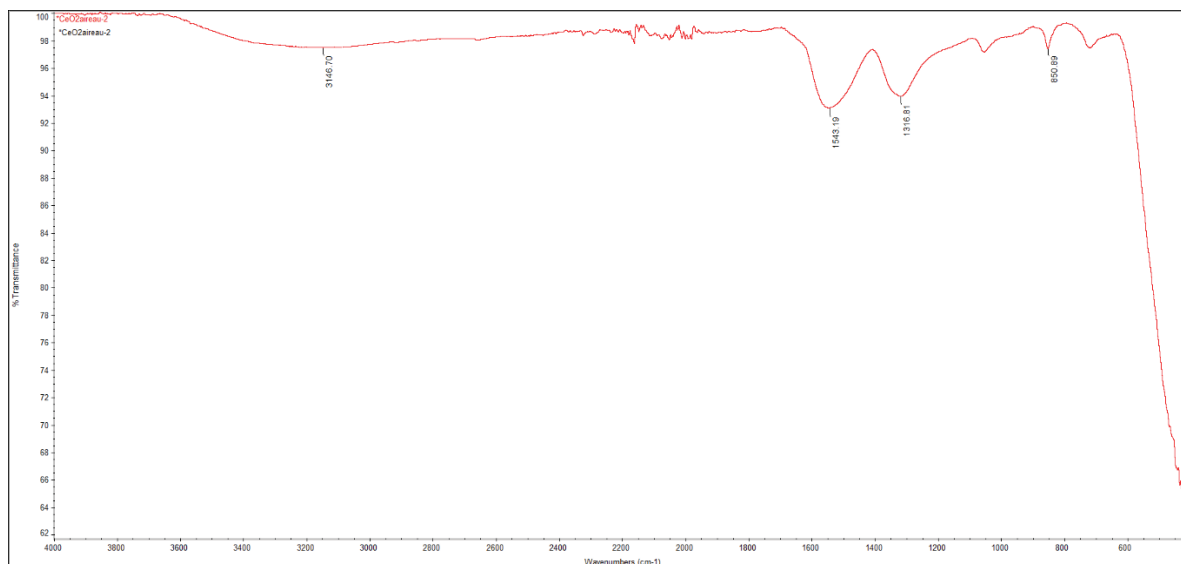


Figure 73 : Spectre FTIR de l'échantillon de cérine obtenu par MW1 et calciné à 500°C sous flux d'air

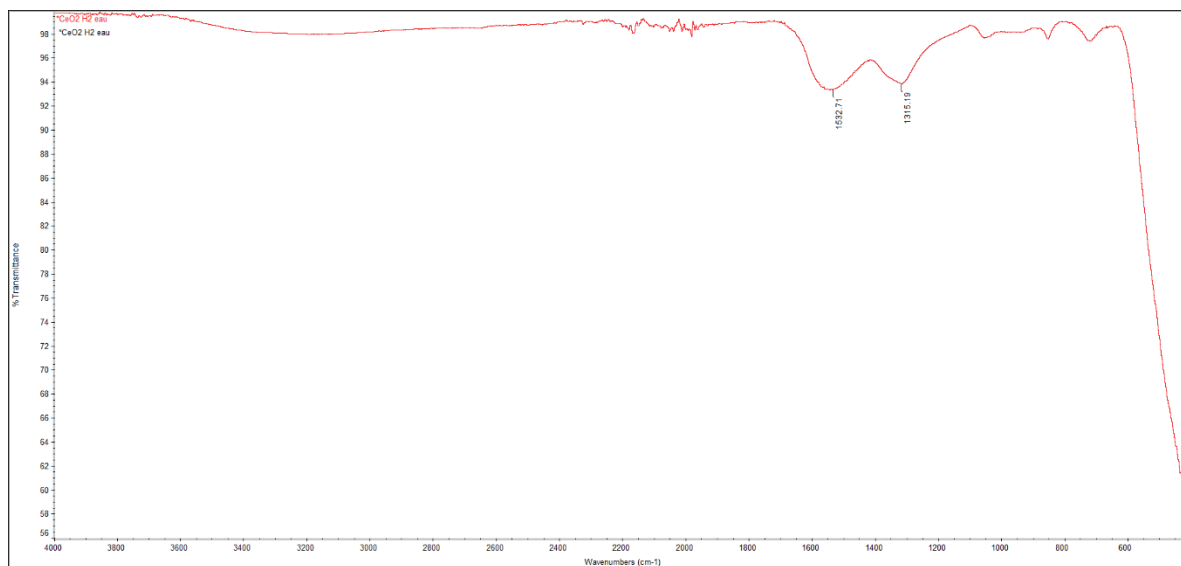


Figure 74 : Spectre FTIR de l'échantillon de cérine obtenu par MW1 et calciné à 500°C sous flux d' H_2

Les pics observés sont tous attribués à des groupements. L'inclusion de Na dans la maille ne peut pas être visible en FTIR car le pic se confondrait avec celui des liaisons Ce-O. La FTIR permet de détecter la présence ou l'absence de certaines liaisons mais ne permet pas leur

quantification. On ne peut donc pas conclure sur la présence plus ou moins importante des groupements OH en surface du CeO₂ entre l'échantillon CeO₂-air et CeO₂-H₂, ou sur la présence de NaOH.

3.3. Dégradation du Paraoxon par les échantillons de CeO₂

La réactivité des NPs de CeO₂ en suspension aqueuse vis-à-vis du Paraoxon a été évaluée par dosage du produit de dégradation, le p-nitrophénol, en spectrophotométrie (2 μmole de POX/g de CeO₂). La figure 75 montre le pourcentage de paraoxon dégradé après 5 h de mise en contact avec le POX.

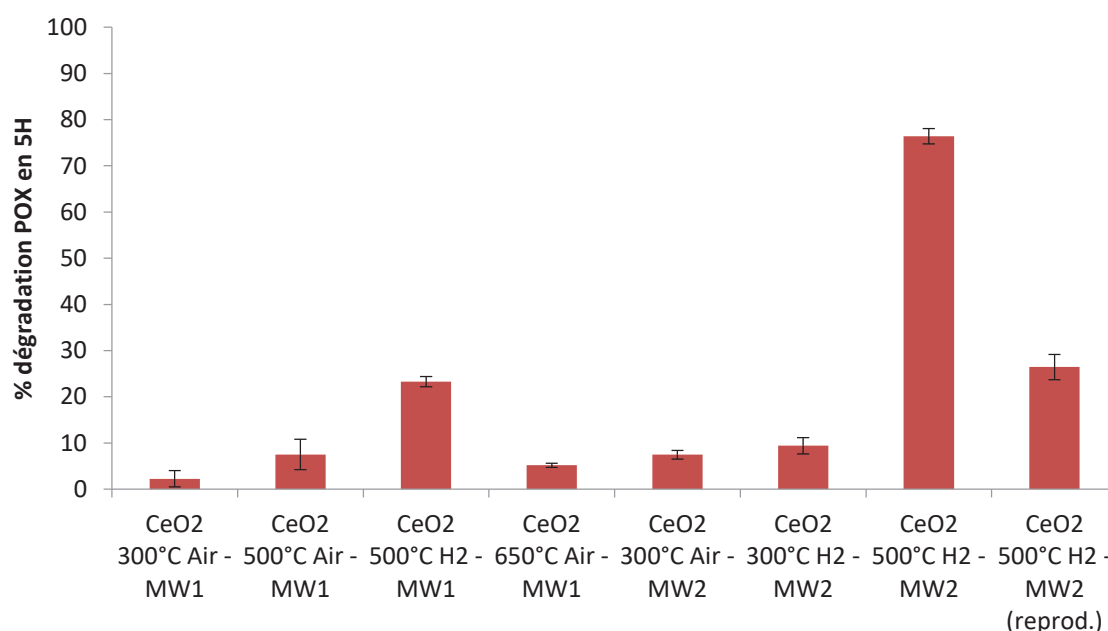


Figure 75 : Pourcentage de Paraoxon dégradé après 5h de mise en contact avec un échantillon de CeO₂ en milieu HBSS.

Les deux échantillons synthétisés indépendamment mais dans les mêmes conditions (MW2-500°C-H₂) ne dégradent pas la même quantité de POX (26% de POX dégradé en 5 h pour un échantillon de cérine et 76% pour le second échantillon). En effet, on avait déjà remarqué que ces deux échantillons possédaient des propriétés physico-chimiques différentes (dont la surface spécifique), ce qui induit une efficacité de dégradation différente.

Les résultats montrent que les NPs sortant de MW2 sont plus efficaces pour la dégradation du POX que ceux traités par MW1 (pour des échantillons calcinés à la même température et dans la même atmosphère). Par exemple, 2,3% de POX ont été dégradé après 5 h pour l'échantillon

CeO₂-300°C-air-MW1 versus 7,5% pour l'échantillon CeO₂-300°C-air-MW2. Ces échantillons sont notamment différents par la surface spécifique ce qui augmente le nombre de sites réactifs à la surface des NPs (9,1 m²/g pour l'échantillon CeO₂-300°C-air-MW1 versus 48 m²/g pour l'échantillon CeO₂-300°C-air-MW2).

Les échantillons calcinés sous atmosphère réductrice ont une réactivité plus importante que les échantillons calcinés sous atmosphère oxydante. L'échantillon CeO₂-500°C-air-MW1 dégrade 7,5% de POX en 5h par rapport à l'échantillon CeO₂-500°C-H₂-MW1 qui permet la dégradation de 23,2% de POX. Ici également, le traitement sous H₂ permet la libération des sites actifs du CeO₂ par augmentation de la surface spécifique et du volume des pores.

Lorsque les échantillons de cérine sont calcinés à une température donnée, il existe une corrélation directe entre la surface spécifique et le pourcentage de dégradation du POX en 5h (Figure 76). Le changement de microonde ou d'atmosphère de calcination n'a donc pas d'impact direct sur les propriétés de surfaces du CeO₂ (groupements hydroxyles, état d'oxydation) mais, en permettant d'augmenter la surface spécifique de la cérine, il est le facteur principal permettant une dégradation significative du toxique. En augmentant la température de calcination à 650°C, les NPs sont de tailles supérieures et ont une surface spécifique qui diminue ce qui limite la dégradation du POX.

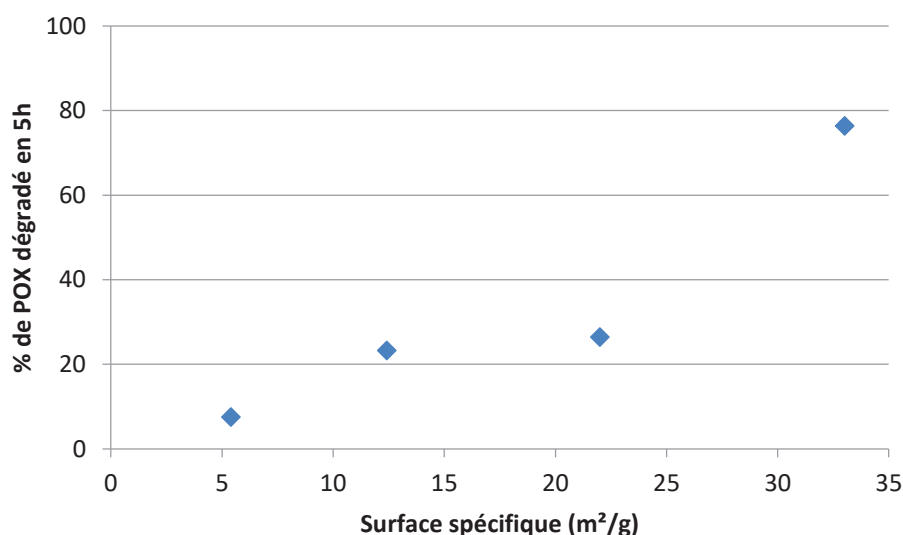


Figure 76 : Pourcentage de dégradation de Paraoxon après 5 h de mise en contact avec du CeO₂ calcinés à 500°C sus H₂ ou sous air, obtenus par MW1 ou MW2 et ayant des surfaces spécifiques différentes.

Néanmoins, la surface spécifique n'est pas le seul critère permettant de justifier une plus forte activité de dégradation du CeO₂. Par exemple, l'échantillon CeO₂-300°C-H₂-MW2 a une surface spécifique de 77 m²/g mais dégrade 9 fois moins de POX que l'échantillon CeO₂-500°C-H₂-MW2 qui a une surface spécifique inférieure de 33 m²/g. Ceci démontre que la structure mais également les propriétés de surface et la cristallinité influencent la réactivité des échantillons.

En effet, en augmentant la température de calcination, on augmente la cristallinité de l'échantillon. La diminution du nombre de défauts structuraux augmente la durée de vie des excitons, en diminuant les probabilités de recombinaisons non radiatives. Ainsi, on facilite le transfert de charge à la surface (Beydoun *et al.*, 1999 ; Ioannidou *et al.*, 2016).

L'évaluation de l'efficacité de dégradation du CeO₂ se faisant en milieu aqueux, il est difficile de conclure de l'impact des groupements hydroxyles en surface et l'état d'oxydation du CeO₂ sur la réactivité vis-à-vis du POX.

4. Conclusion

En vue de changer les propriétés physico-chimiques des NPs, les conditions de synthèses ont été modifiées. Lors du traitement microonde, la taille du récipient contenant le milieu de réaction influe sur la pression pendant le traitement et sur la taille des NPs en sortie. L'agitation lors du traitement hydrothermal MW2 impacte sûrement sur l'agrégation du CeO₂ et permet d'obtenir des NPs de surface spécifique plus importante. La calcination sous atmosphère réductrice permet la libération des pores mais ce phénomène n'est pas décrit dans la littérature.

Lors de la calcination sous H₂, on s'attend à obtenir un taux de Ce³⁺ plus important que lorsque l'échantillon est calciné sous flux d'air. En effet, Holgado *et al.* (2000) observait en XPS l'augmentation des pics correspondant au Ce³⁺ et la diminution des pics du Ce⁴⁺ lorsque la calcination de l'échantillon de CeO₂ était effectuée à haute température (500-600°C) sous hydrogène. Ces mesures étaient effectuées directement après la calcination *in situ* dans l'appareil. En vue d'obtenir une information sur les propriétés de surface, des mesures en XPS et FTIR ont été réalisées. Dans notre cas, les échantillons sont calcinés puis réexposés à l'air jusqu'à leur utilisation. Cette exposition à l'air minimise les différences de propriétés de surface entre l'échantillon CeO₂-H et CeO₂-air et les mesures en XPS/FTIR n'ont pas permis de conclure sur l'état surface de ces deux échantillons. Les mesures en XPS ont tout de même soulevé la présence de sodium dans les échantillons. Cette migration de sodium depuis la masse de l'échantillon jusqu'à la surface, favorisée par l'augmentation de la température et une

atmosphère réductrice, est problématique puisqu'elle peut augmenter l'agglomération des NPs de CeO₂ (voir partie expérimentale 3) et diminuer l'efficacité de dégradation. La calcination sous H₂ favorise également la présence des atomes métallique en surface du CeO₂, donc des ceriums. Les échantillons, une fois mis en solution, présenteront des surfaces métalliques hydroxylées.

L'échantillon traité par MW2 et calciné à 500°C sous H₂ est le plus efficace pour la dégradation du CeO₂. Sa surface spécifique plus importante et sa cristallinité permettent d'optimiser sa réactivité vis-à-vis du toxique. Cependant, les échantillons calcinés à la même température sous H₂ ne présentent pas une réactivité (activité de dégradation) et une microstructure similaire (surface spécifique, volume des pores) contrairement à une calcination sous air où la reproductibilité a déjà été démontrée précédemment. En effet, plusieurs campagnes de synthèses de CeO₂ ont été effectuées à l'ICMN avec plusieurs calcinations sous air à 500°C indépendantes. La cérine obtenue par cette méthode a toujours présenté les mêmes propriétés. Il faudrait donc travailler plus longuement sur le protocole de calcination sous H₂ pour obtenir une meilleure reproductibilité des échantillons.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif du projet a été d'évaluer l'efficacité de décontamination cutanée et de dégradation du CeO₂ vis-à-vis d'un composé organophosphoré, le POX. Le premier objectif a été de mettre en place un protocole de décontamination cutanée *in vitro* et une méthode de dosage du POX autre que la méthode enzymatique d'Ellmann, plus lourde et qui ne permet pas de se rendre compte de l'activité de dégradation des systèmes de décontamination. Une méthode HPLC a été développée et permet de déterminer simultanément et rapidement la quantité de POX restante dans la peau et la quantité du produit de dégradation, le p-nitrophénol. Le protocole de décontamination cutanée est basé sur les travaux de P. Rolland et sur la norme AFNOR (Norme AFNOR NF X 52-122, janvier 2016), utilisant un modèle *in vitro*, la cellule de Franz, et un modèle de peau humaine, la peau d'oreille de porc.

Nous avons fait le choix d'utiliser le dioxyde de cérium, pour la décontamination cutanée des COP. Le CeO₂ utilisé est synthétisé par nos soins ce qui nous permet de contrôler les conditions de synthèse et donc sa composition et la taille des cristallites, contrairement à la cérine vendue par les fournisseurs. Les résultats préliminaires en tube ont confirmé la réactivité des NPs d'oxydes métalliques vis-à-vis des COP puisqu'elles permettent la dégradation du POX en milieu aqueux et lors des expériences de décontamination cutanée. On suppose que la dégradation du POX se fait en surface de la peau puisque les études Raman ont démontré que les NPs, fortement agrégées, restaient en surface de la peau. Contrairement à la TAF qui a une surface spécifique importante, la forte agrégation du CeO₂ limite sa capacité d'adsorption et une élimination efficace du toxique sur la peau.

Le CeO₂ n'étant pas destiné à être utilisé tel quel (car les NPs peuvent induire une toxicité pulmonaire), des systèmes liquides contenant ces NPs ont été formulés : une suspension aqueuse épaissie et des émulsions de Pickering. Utilisés pour la décontamination cutanée, ces systèmes permettent de laver efficacement la surface de la peau du POX déposé mais la dégradation du POX par le CeO₂ est quasiment inexistante. La question de l'élimination des NPs par les éponges utilisées pour la décontamination s'est posée. Les études Raman ont montré que, 24 h après application de l'émulsion de Pickering, les NPs CeO₂ sont bien présentes après la décontamination puisqu'elles sont détectées à l'intérieur de la peau et au-delà du *stratum corneum*. La réaction de dégradation se faisant principalement en surface, la pénétration des NPs (qui peut se faire par différentes voies et avec une cinétique de pénétration différente du POX) ne favorise pas la dégradation du POX.

Ces résultats ont montré le besoin de s'intéresser aux mécanismes permettant la dégradation efficace du POX dans le but d'optimiser la réactivité des NPs de CeO₂. Pour

comprendre ce mécanisme, deux approches ont été utilisées. La première approche est l'utilisation de la modélisation qui a permis, à partir de toutes les données expérimentales obtenues en tube, d'expliquer les conditions expérimentales impactant l'efficacité de dégradation du CeO₂. Le modèle prenant en compte l'agrégation des particules (due au sel et à la proximité physique des particules) est celui qui permet de prédire au mieux la dégradation du POX par le CeO₂ en décontamination cutanée. Ce résultat permet de confirmer que les études menées en tube sont représentatives des résultats attendus en décontamination cutanée. Il permettra de prévoir la dégradation du POX à la surface de la peau en fonction du volume de POX et de la quantité initiale de CeO₂ déposée. Cependant, ce modèle ne permet pas de prévoir la dégradation du POX avec des systèmes liquides.

La deuxième approche a été de modifier les conditions de synthèses dans le but d'obtenir des propriétés de surface et de structure du CeO₂ (accessibles par des analyses physiques fines) différentes et de permettre une corrélation avec le pourcentage de dégradation du POX en tube. L'analyse des propriétés chimiques de la cérine a été délicate à mener : en effet, ces propriétés sont fortement sensibles à l'environnement de mesure et pourraient être différentes lors des conditions de décontamination cutanée. Il a donc été difficile de conclure sur ces résultats. Cependant, on confirme que 500°C reste la température idéale pour une meilleure réactivité puisqu'elle permet une cristallisation des particules (et donc une augmentation de la durée de vie des paires électron-trou facilitant les transferts de charge à la surface de la NP) et une surface spécifique optimale. La surface spécifique reste le paramètre qui gouverne la dégradation du POX. Celle-ci a été augmentée, notamment en changeant la nature du microonde lors de la synthèse des NPs et grâce à une calcination sous atmosphère réductrice, et permet d'augmenter d'un facteur 10 la dégradation du POX.

Cette thèse a montré que la détermination de l'impact des conditions de synthèses sur les propriétés physico-chimiques des NPs influençant l'efficacité de dégradation des nanoparticules (degré d'oxydation, valence, morphologie, surface...) est nécessaire afin de proposer des procédés de préparation de NPs aux propriétés contrôlées, qui permettent une dégradation plus rapide du POX en surface cutanée. Utiliser les échantillons obtenus sous H₂ et par le second microonde (MW2) pour la décontamination cutanée serait déjà un premier sujet à développer avec un travail significatif sur la reproductibilité des échantillons.

Les systèmes liquides permettent de réduire la fraction absorbée de POX dans la peau mais l'intérêt des NPs dans ces formules est discutable puisque la capacité de dégradation est très fortement diminuée. Faut-il continuer à travailler sur des systèmes liquides en changeant la nature des phases ou rester sur une forme poudre? Il conviendra de caractériser l'état de surface

de l'oxyde de cérium en poudre mais aussi en dispersion aqueuse. En présence d'eau, les molécules d'eau s'adsorbent et se dissocient, la valence des ions cérium en surface peut être modifiée (ratio Ce^{3+}/Ce^{4+}). La physicochimie de la surface en fonction de l'environnement de la NP pourra être reliée aux propriétés de décontamination afin de proposer une formule liquide (gels, crème, etc) qui permette de mettre en avant la réactivité des NPs. Des études ont montré que les solvants apolaires comme l'heptane et polaires comme l'acétonitrile ou l'acétone augmentaient la réactivité du CeO_2 . Il serait envisageable d'utiliser un solvant apolaire, adapté à une application topique, comme le DMSO ou l'isohexadécane à la place de la phase aqueuse.

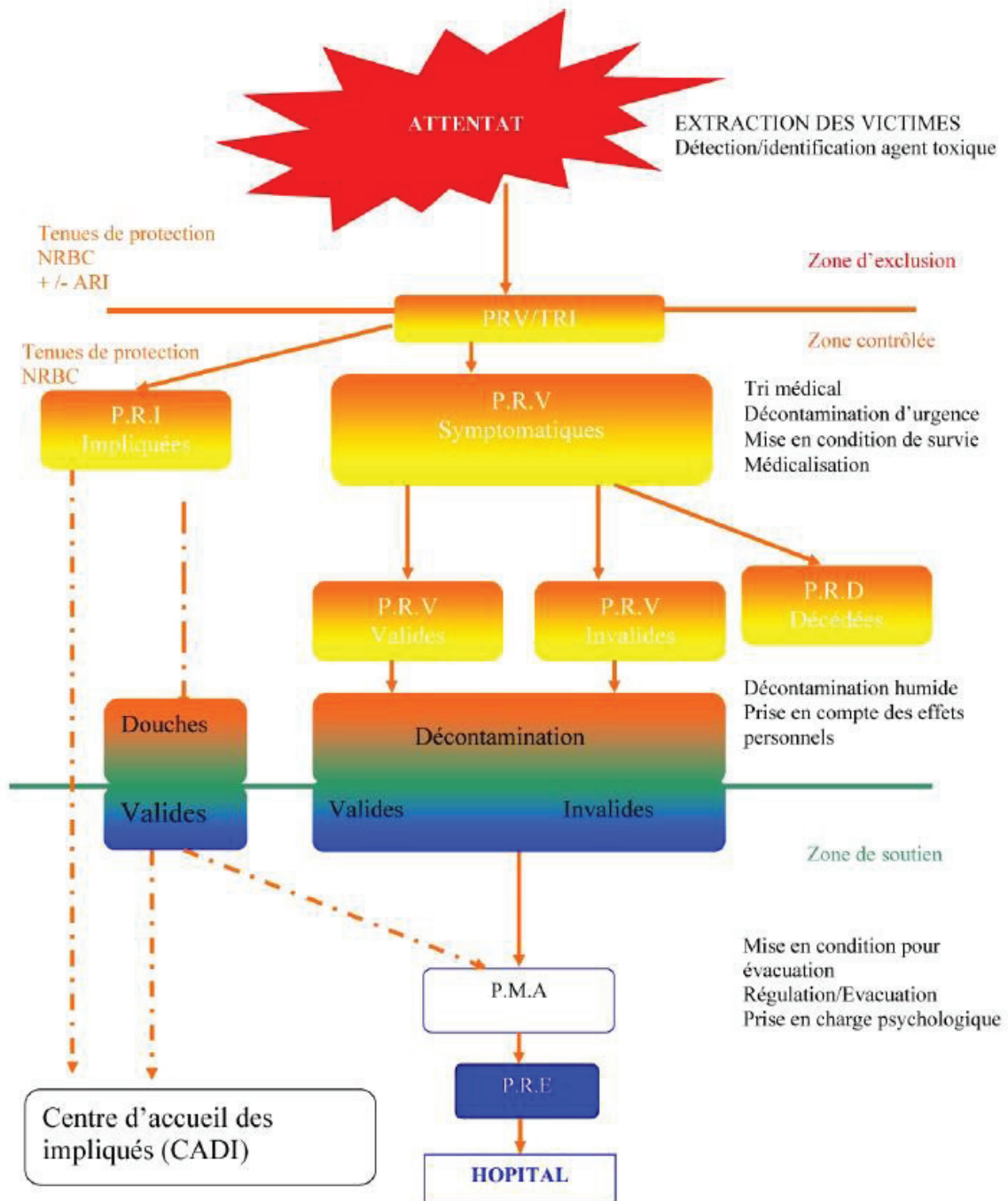
Les protocoles utilisés pour la décontamination cutanée s'inspirent des protocoles d'application de la RSDL ou de la TAF. Il apparaît nécessaire de développer un protocole de décontamination propre au CeO_2 . Trois points majeurs pourraient faire l'objet d'études plus approfondies. Le premier est la détermination de la quantité ou de la concentration optimale de CeO_2 à déposer sur la peau pour obtenir une réactivité suffisante sans craindre une cytotoxicité de la NP. Le second point serait d'évaluer le temps d'application nécessaire (temps entre le dépôt de l'actif et le nettoyage de la peau) pour initier la dégradation des COP par les NPs. Enfin, une application répétée du produit de décontamination pourrait également être envisageable. Le modèle cinétique développé permettant de prédire la dégradation du POX en surface cutanée par le CeO_2 aiderait à la détermination de la quantité de CeO_2 à appliquer en surface cutanée et du temps d'application nécessaire. Cependant, il doit être complété notamment en incluant des paramètres qui rendraient compte de l'efficacité de lavage des systèmes liquides et du passage du POX et du CeO_2 dans la peau.

On a démontré que le CeO_2 permettait la dégradation du POX mais il faudrait vérifier que sa réactivité peut être étendue aux autres COP, voire aux agents vésicants. De plus, l'utilisation d'un autre OP que le POX (qui pénètre peu dans la peau, même après 24 h d'expérimentation) permettrait d'avoir des résultats plus significatifs entre les différents systèmes de décontamination et entre différentes durées entre l'exposition à l'OP et la décontamination.

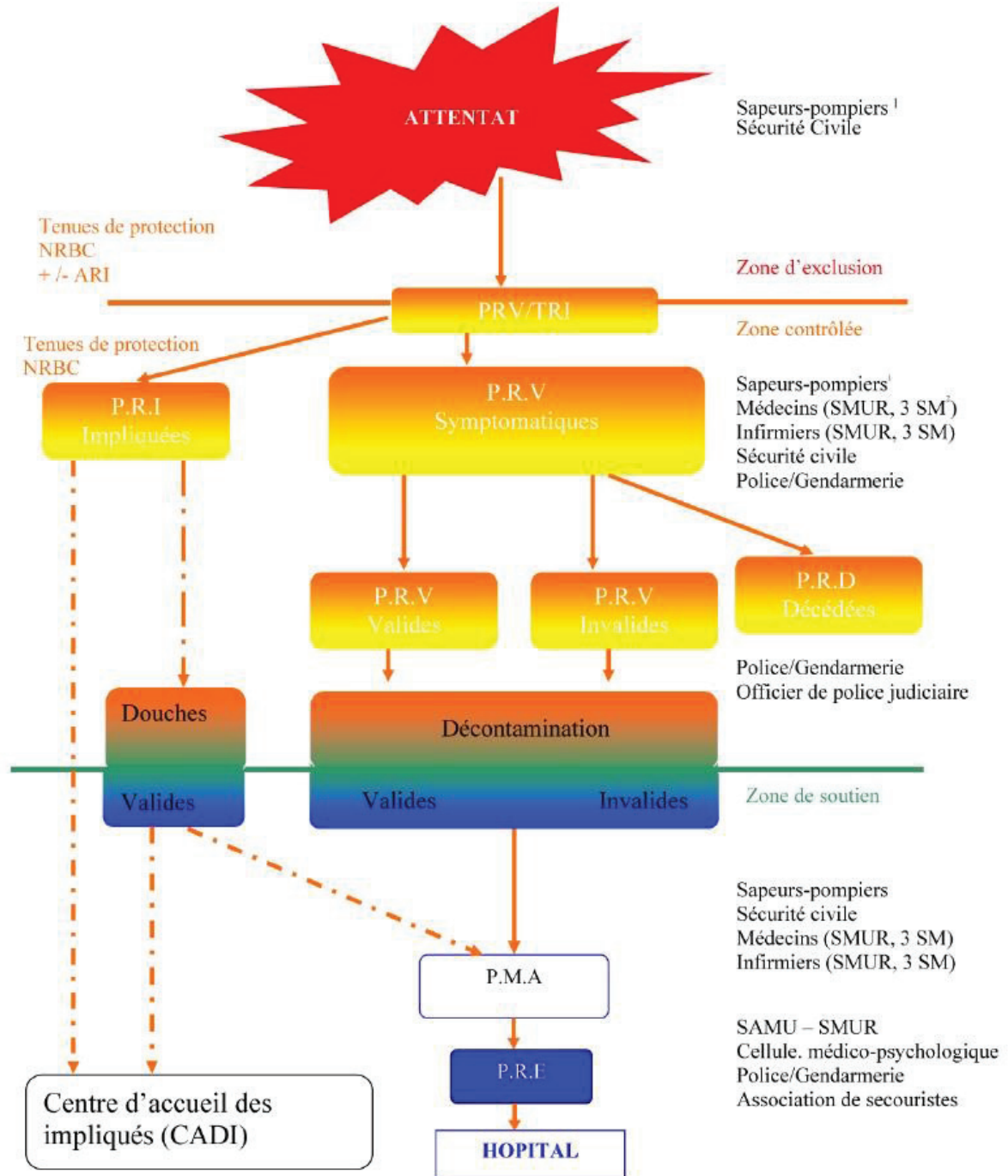
Enfin, comme le montre plusieurs articles, d'autres NPs d'oxydes métalliques pourraient également être envisagées et efficaces pour la dégradation des COP. En effet, même si les résultats de ce travail portent sur le CeO_2 , ils permettent de mettre en avant chaque point, depuis la synthèse des NPs jusqu'à leur utilisation en décontamination cutanée, permettant d'optimiser la dégradation des COP par des NPs d'oxydes métalliques. Ces mécanismes sont transposables aux autres NPs.

ANNEXES :

Annexe 1 : Organisation des primo-intervenants (Circulaire n°700/SGDN/PSE/PPS du 7 novembre 2008)



Annexe 2 : Organisation des services de secours (Circulaire n°700/SGDN/PSE/PPS du 7 novembre 2008)



1 : Marins-pompiers à Marseille
2 : Service de santé et de secours médical

Annexe 3 : Exemple de protocole de décontamination approfondie pour victimes valides et invalides (Cirulaire n°700/SGDN/PSE/PPS du 7 novembre 2008)

Objectifs :

- limiter la contamination et l'intoxication,

Moyens :

- décontamination approfondie,

Matériels :

- gants poudreux / terre de Foulon (ou équivalent) pour absorption de l'agent,
- sacs poubelles en matière plastique de 100 litres ou équivalent,
- des ciseaux à bouts ronds et à lame oblique pour découper les vêtements (3 paires),
- eau de Javel à 2,6% de chlore actif, teepol à 1%,
- bac de trempage,
- kit déshabillage/rhabillage,
- sacs étanches en matière plastique si possible transparents,
- moyens instrumentaux de contrôle de la contamination (type AP2C, PDF1...),
- shampoing, tensio-actif,
- solution polyvalente de décontamination si nécessaire :
 - eau de Javel à 0.8%² de chlore actif,
 - pulvérisateur (type pulvérisateur de jardin).

Victimes valides

Actions à entreprendre en zone de déshabillage:

- placer sur le sol un sac poubelle de 100 litres ou équivalent,
- faire avancer la victime dessus,
- lui expliquer comment elle doit se déshabiller et comment elle va être aidée,
- décontaminer les parties découvertes du corps à l'aide du gant poudreux : saupoudrage par tapotements suivi d'un brossage en utilisant l'autre face du gant, si non effectués au PRV,
- aider la victime à se déshabiller, en effeuillant les vêtements couche par couche et en évitant de répandre du toxique partout. Pour cela procéder en roulant les vêtements de l'intérieur vers l'extérieur,
- découper à l'aide des ciseaux les vêtements devant être enlevés en passant par la tête (pull-over, tee-shirt...),
- si au cours des opérations de déshabillage, une partie contaminée du vêtement vient au contact de la peau, décontaminer immédiatement à l'aide d'un nouveau gant poudreux,
- aider la victime à enlever ses chaussures,
- la victime est invitée par une grande enjambée à quitter le sac poubelle en plastique ou équivalent, et à se diriger vers la zone de décontamination,
- envelopper vêtements et chaussures dans le sac poubelle,
- fermer le sac contenant les vêtements contaminés et les chaussures, l'étiqueter,
- placer le sac fermé dans le manchon d'évacuation qui débouche dans le conteneur situé à l'extérieur,
- pulvérisation de la solution polyvalente de décontamination :
 - asperger par pulvérisation le corps de la victime en évitant les yeux et les cheveux, la solution doit rester appliquée pendant trois minutes pour exercer son pouvoir oxydant et assurer ainsi une décontamination des toxiques chimiques²,

¹ Voir Annexe 24

² Références : « les risques NRBC, savoir pour agir », éditions Xavier MONTAUBAN, 2004 ; « Risques chimiques, Accidents, attentats » éditions Elsevier, 2006.

- pendant cette phase d'incubation, la victime passe en salle de douche pour un double shampoing,
- préparer l'accueil de la victime suivante.

Actions à entreprendre en zone de lavage:

- pendant les trois minutes au cours desquelles la solution polyvalente de décontamination agit, un shampoing est réalisé,
- pratiquer un shampoing en s'appliquant à bien laver à deux reprises les cheveux et la tête,
- rincer abondamment,
- demander à la victime d'enchaîner par une douche en utilisant du savon liquide et de se rincer la tête et le corps,
- lorsqu'une nouvelle victime se présente pour le shampoing, inviter la personne à poursuivre sa douche seule en avançant sous le poste de douche,
- la durée optimale du temps total de douche est fixée à 3 minutes afin d'assurer une bonne décontamination,
- la victime est invitée à se diriger vers la zone de séchage et de rhabillage.

Victimes invalides

Actions à entreprendre en zone de déshabillage:

- prévoir un sac poubelle de 100 litres ou équivalent,
- faire avancer la victime sur le brancard roulant,
- expliquer comment elle va être déshabillée,
- décontaminer les parties découvertes du corps à l'aide du gant poudreux: saupoudrage par tapotements suivi d'un brossage en utilisant l'autre face du gant si non effectué au PRV,
- déshabiller la victime selon le protocole de déshabillage des victimes allongées,
- si au cours des opérations de déshabillage une partie contaminée du vêtement vient au contact de la peau, décontaminer immédiatement à l'aide d'un nouveau gant poudreux,
- envelopper vêtements et chaussures dans le sac poubelle,
- fermer le sac contenant les vêtements contaminés et les chaussures,
- placer le sac fermé dans le manchon d'évacuation qui débouche dans le conteneur situé à l'extérieur,
- pulvérisation de la solution polyvalente de décontamination si nécessaire :
 - asperger par pulvérisation le corps de la victime en évitant les yeux et les cheveux. La solution doit rester appliquée pendant trois minutes pour exercer son pouvoir oxydant et assurer ainsi une décontamination des toxiques chimiques¹,
 - pulvériser aussi le tamis, les poignets et les roues du brancard, pendant cette phase d'incubation, la victime passe en salle de douche pour un double shampoing,
- préparer l'accueil de la victime suivante.

Actions à entreprendre:

- pendant les trois minutes au cours desquelles la solution de décontamination agit, un shampoing est réalisé,
- placer la victime en position de lavage,
- pratiquer un shampoing en s'appliquant à bien laver à deux reprises les cheveux et la tête,
- rincer abondamment,
- enchaîner par une douche en utilisant du savon liquide et de se rincer la tête et le corps,
- la durée optimale du temps total de douche est fixée à 3 minutes afin d'assurer une bonne décontamination,
- faire avancer la victime sur le brancard roulant vers la zone de séchage et de rhabillage.

¹ Références : « les risques NRBC, savoir pour agir », éditions Xavier MONTAUBAN, 2004 ; « Risques chimiques, Accidents, attentats » éditions Elsevier, 2006.

Annexe 4 : Répétabilité des mesures pour la quantification du Paraoxon et p-nitrophénol dilués dans l'éthanol (n= 5)

Concentration de POX dans l'éthanol ($\mu\text{g/mL}$)	Hauteur du pic (μV) du POX sur le chromatogramme	Cv (%)
1	754	3.8
10	6935	1.5
100	73563	1.3

Concentration du PNT dans l'éthanol ($\mu\text{g/mL}$)	Hauteur du pic (μV) du PNT sur le chromatogramme	Cv (%)
1	2613	4.9
10	25581	2.1
50	126962	0.8

Annexe 5: Reproductibilité des mesures pour la quantification du Paraoxon et p-nitrophénol dilués dans l'éthanol (n= 5)

Concentration de POX dans l'éthanol ($\mu\text{g/mL}$)	Hauteur du pic (μV) du POX sur le chromatogramme	Cv (%)
1	718	5.1
10	7473	0.5
100	73096	0.1

Concentration du PNT dans l'éthanol ($\mu\text{g/mL}$)	Hauteur du pic (μV) du PNT sur le chromatogramme	Cv (%)
1	2589	2.2
10	25584	0.1
50	129307	0.5

Annexe 6 : Equation des droites d'étalonnages du Paraoxon et p-nitrophénol (n=3). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM ($\pm\text{Cv}$ pour la pente de la droite).

Solvant de dilution	POX		PNT	
	Ethanol	50% éthanol, 50% HBSS	Ethanol	50% éthanol, 50% HBSS
Pente de la droite	1314.8 \pm 1.1	1754.5 \pm 3.7	2544.6 \pm 1.2	2735.5 \pm 0.8
Ordonnée à l'origine	37.1	779.6	144.3	298.9
R ²	0.9998	0.9981	0.9998	0.9991

Annexe 7 : Stabilité du Paraoxon dilué dans l'éthanol ou 50% ethanol, 50% HBSS.

Concentration en POX dans l'éthanol (µg/mL)	Hauteur du pic (µV) du POX sur le chromatogramme avant congélation	Hauteur du pic (µV) du POX sur le chromatogramme après une nuit de congélation
1	806	743
10	7399	7153
100	78231	81504

Concentration en POX dans 50% ethanol, 50% HBSS (µg/mL)	Hauteur du pic (µV) du POX sur le chromatogramme avant congélation	Hauteur du pic (µV) du POX sur le chromatogramme après une nuit de congélation
1	808	810
10	7604	7474
100	70602	73200

Annexe 8 : Stabilité du P-nitrophénol dilué dans l'éthanol ou 50% ethanol, 50% HBSS.

Concentration en PNT dans l'éthanol (µg/mL)	Hauteur du pic (µV) du PNT sur le chromatogramme avant congélation	Hauteur du pic (µV) du PNT sur le chromatogramme après une nuit de congélation
1	2550	2729
10	25587	25762
100	129638	131491

Concentration en PNT dans 50% ethanol, 50% HBSS (µg/mL)	Hauteur du pic (µV) du PNT sur le chromatogramme avant congélation	Hauteur du pic (µV) du PNT sur le chromatogramme après une nuit de congélation
1	3034	2777
10	27653	28337
100	137069	141486

Références

- Adachi, G., Imanaka, N., Kang, Z.C., 2004. Binary Rare Earth Oxides. *Ed.* Springer Science & Business Media. 257 p. Hollande.
- Aelion, R., Loebel, A., Eirich, F., 1950. Hydrolysis of Ethyl Silicate. *Journal of the American Chemical Society.* 72 (12): 5705–5712.
- AFNOR. Sécurité et protection du citoyen - NRBC-E - Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine - Sécurité et protection du citoyen - NRBC-E - Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine. Norme française NF X 52-122, janvier 2016.
- Al-Agel, F.A., Al-Arfaj, E., Al-Ghamdi, A.A., Stein, B.D., Losovyj, Y., Bronstein, L.M., Shokr, F.S., Mahmoud, W.E., 2015. Structure and magnetic properties of diluted magnetic metal oxides based on Cu-doped CeO₂ nanopowders. *Ceramics International.* 41: 1115–1119.
- Alifanti, M., Baps, B., Blangenois, N., Naud, J., Grange, P., Delmon, B., 2003. Characterization of CeO₂-ZrO₂ Mixed Oxides. Comparison of the Citrate and Sol-Gel Preparation Methods. *Chemistry of Materials.* 15: 395–403.
- Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H., Fessi, H., 2004. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm. Res.* 21, 1818–1825.
- Amiard J.C., 2011. Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. *Ed.* Tec & Doc. 782 p. Paris.
- Andreescu, D., Matijević, E., Goia, D.V., 2006. Formation of uniform colloidal ceria in polyol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 291 (1-3): 93–100.
- Bagwe, R.P. & Khilar, K.C., 1997. Effects of the Intermicellar Exchange Rate and Cations on the Size of Silver Chloride Nanoparticles Formed in Reverse Micelles of AOT. *Langmuir.* 13 (24): 6432–6438.
- Bajpai, A.K., Vishwakarma, N. 2003. Adsorption of polyvinyl alcohol onto Fuller's earth surfaces. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 220: 117–130.
- Badosz, T.J., Laskoski, M., Mahle, J., Mogilevsky, G., Peterson, G.W., Rossin, J.A., Wagner, G.W., 2012. Reactions of VX, GD, and HD with Zr(OH)₄: Near Instantaneous Decontamination of VX. *The Journal of Physical Chemistry C.* 116: 11606–11614.
- Barry B.W., 2002. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv. Drug Deliv.* 54 (Suppl 1): 31-40.
- Bartek, M. J., LaBudde, J. A., Maibach, H. I., 1972. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig, and man. *J. Investig. Dermatol.* 58: 114–123.
- Benson, H., 2005. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr. Drug Deliv.* 2: 23–33.
- Bertrand, C., Ammirati, C., Renaudu, C., 2006. Risques chimiques: accidents, attentats. *Ed.* Elsevier, 186 p.
- Beydoun, D., Amal, R., Low, G., McEvoy, S., 1999. Role of nanoparticles in photocatalysis. *J. Nanopart. Res.* 1 : 439–458.
- Bigley, A.N., Xu, C., Henderson, T.J., Harvey, S.P., Raushel, F.M., 2013. Enzymatic Neutralization of the Chemical Warfare Agent VX: Evolution of Phosphotriesterase for Phosphorothiolate Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society.* 135: 10426–10432.

- Bignon, C, Amigonia, S., Devers, T., Guittard, F., 2016. Barrier cream based on CeO₂ nanoparticles grafted polymer as an active compound against the penetration of organophosphates. *Chemico-Biological Interactions*. 1-8.
- Biljana, A., Safiyya, M.A., Sin Eng, C., 2008. Interethnic variability of plasma paraxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among Asian populations: A short review. *Ind Health*. 46: 309—17.
- Bisio, C., Carniato, F., Palumbo, C., Safronyuk, S.L., Starodub, M.F., Katsev, A.M., Marchese, L., Guidotti, M., 2016. Nanosized inorganic metal oxides as heterogeneous catalysts for the degradation of chemical warfare agents. *Catalysis Today*.
- Bjarnason, S., Mikler, J., Hill, I., Tenn, C., Garrett, M., Caddy, N., Sawyer, T.W., 2008. Comparison of selected skin decontaminant products and regimens against VX in domestic swine. *Hum Exp Toxicol*. 27: 253-261.
- Boeniger, M., 2005. *Skin Decontamination of Chemical Exposures*. Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Health and Safety.
- Boncheva, M., Damien, F., Normand, V., 2008. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1778: 1344-55.
- Boutard T., 2013. 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.
- Bouwstra J.A. & Ponc M., 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 1758: 2080-2095.
- Brain K.R. & Chilcott R.P. 2008. Physicochemical factors affecting skin absorption. In: Chilcott R.P. & Price S. *Principles and practice of skin toxicology*. John Wiley & Sons. 392 p.
- Brain, K.R., Walters, K.A., Watkinson, A. C., 2002. Methods for studying percutaneous absorption. In: Walters, K.A., *Dermatological and transdermal formulation. Drugs and the pharmaceutical science*, vol 119. Ed. CRC Press. 592 p. New York.
- Brinker C.J. & Scherer G.W., 1990. *Sol-gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. Ed. Academic Press. 462 p. Boston.
- Bronaugh R.L. & Franz, T.J., 1986. Vehicle effects on percutaneous absorption: in vivo and in vitro comparisons with human skin, *Br. J. Dermatol*. 115: 1–11.
- Bronaugh R.L. & Maibach H.I., 1985. Percutaneous absorption of nitroaromatic compounds: in vivo and in vitro studies in the human and monkey, *J. Invest. Dermatol*. 84: 180–183.
- Byrappa K. & Yoshimura M., 2001. *Handbook of hydrothermal technology - A technology for crystal growth and materials processing*, William Andrew Publishing/Noyes.
- Caputo, F., De Nicola, M., Sienkiewicz, A., Giovanetti, A., Bejarano, I., Licoccia, S., Traversa, E., Ghibelli, L., 2015. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis. *Nanoscale* 7, 15643–15656.
- Cavallo JD., 2010. *Les risques NRBC-E, savoir pour agir*. Ed. Xavier Montauban. 331 p. Paris.
- Celardo, I., Pedersen, J.Z., Traversa, E., Ghibelli, L., 2011. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 3, 1411.
- Chan, H.P., Zhai, H., Hui, X., Maibach, H.I., 2012. Skin decontamination: principles and perspectives. *Toxicology and Industrial Health* 29 : 955–968.
- Chang, H.-Y. & Chen, H.-I., 2005. Morphological evolution for CeO₂ nanoparticles synthesized by precipitation technique. *Journal of Crystal Growth*. 283: 457–468.

- Chen, H., Sayari, A., Adnot, A., Larachi, F., 2001. Composition–activity effects of Mn–Ce–O composites on phenol catalytic wet oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*. 32(3) : 195–204.
- Chen, H.-I. & Chang, H.-Y., 2004. Synthesis and characterization of nanocrystalline cerium oxide powders by two-stage non-isothermal precipitation. *Solid State Communications*. 133: 593–598.
- Chigurupati, S., Mughal, M.R., Okun, E., Das, S., Kumar, A., McCaffery, M., Seal, S., Mattson, M.P., 2013. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials*. 34 (9) : 2194–2201.
- Chilcott R., 2007. Dermal Aspects of Chemical Warfare Agents. In : Marrs T.T., Maynard R.L., Sidell F. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. 2nde Ed. John Wiley & Sons. 750 p.
- Chilcott, R.P., 2014. Managing mass casualties and decontamination. *Environment International*. 72 : 37–45.
- Chilcott, R.P., Dalton, C. H., Hill, I., Davison C.M., Blohm, K. L., Clarkson, E.D., Hamilton, M. G., 2005. Evaluation of a Barrier Cream against the Chemical Warfare Agent VX using the Domestic White Pig. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 97: 35–38.
- Chilcott, R.P., Jenner, J., Hotchkiss, S.A.M., Rice, P., 2001. In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *Journal of Applied Toxicology*. 21: 279–283.
- Choi Y.B. & Prausnitz M.R., 2011. The rule of five for non-oral routes of drug delivery: ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharm Res*. 28: 943–948.
- Circulaire relative à la doctrine nationale d'emploi des moyens de secours et de soins face à une action terroriste mettant en oeuvre des matières chimiques n°700/SGDN/PSE/PPS du 7 novembre 2008.
- Clarkson, E.D., Schulz, S.M., Railer, R.F., Smith, K.H., 2012. Median lethal dose determination for percutaneous exposure to soman and VX in guinea pigs and the effectiveness of decontamination with M291 SDK or SANDIA foam. *Toxicology Letters*. 212: 282–287.
- Cnubben, N.H., Elliott, G.R., Hakkert, B.C., Meuling, W.J., Van de Sandt, J.J., 2002. Comparative in vitro–in vivo percutaneous penetration of the fungicide ortho-phenylphenol, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35: 198–208.
- Cone E.J., 1996. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Ther. Drug Monit.* 18: 438–443.
- Convention sur l'Interdiction de la Mise au Point, de la Fabrication, du Stockage et de l'Emploi des Armes Chimiques et sur leur Destruction du 13 Janvier 1993 (réactualisée le 29 Juillet 2005).
- Corriu R. & Anh Nguyễn T., 2008. *Chimie moléculaire, sol-gel et nanomatériaux*. Ed. Ecole Polytechnique. 201 p. Paris
- Coujard R. & Poirier J., 1980. *Précis d'histologie humaine*. Ed. Presses Université Laval. 752 pages. Québec.
- Craig, F.N., Cummings, E.G., Sim, V.M., 1977. Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, VX. *J. Investig. Dermatol.* 68: 357–361.
- Crank J., 1979. *The Mathematics of Diffusion*. Ed. Clarendon. 414 p. Oxford.
- Da Silva, A.N., Pinto, R.C.F., Freire, P.T.C., Junior, J.A.L., Oliveira, A.C., Filho, J.M., 2015. Temperature and high pressure effects on the structural features of catalytic nanocomposites oxides by Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 138: 763–773.

- Dalton, C., Graham, S., Jenner, J., 2015. Effect of exposure area on nerve agent absorption through skin in vitro. *Toxicology in Vitro*. 30: 454–461
- Dalton, C., Hattersley, I., Rutter, S., Chilcott, R., 2006. 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 In Vitro*. 20: 1532-1536.
- Daněk, O., Štengl, V., Bakardjieva, S., Murafa, N., Kalendová, A., Opluštil, F., 2007. Nanodispersive mixed oxides for destruction of warfare agents prepared by homogeneous hydrolysis with urea. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 68: 707–711.
- Danielsson, I. & Lindman, B., 1981. The definition of microemulsion. *Colloids Surfaces*. 3: 391-392.
- Darroudi, M., Sarani, M., Kazemi Oskuee, R., Khorsand Zak, A., Hosseini, H.A., Gholami, L., 2014. Green synthesis and evaluation of metabolic activity of starch mediated nanoceria. *Ceramics International*. 40: 2041–2045.
- Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J.-F., Riedel, L.M., Seal, S., Hickman, J.J., 2007. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*. 28 (10): 1918–1925.
- De Bleecker J.L. & Engel A.G., 1995. Immunocytochemical study of CD45 T cell isoforms in inflammatory myopathies. *Am J Pathol*.146(5): 1178–1187.
- Djuriclic, B. & Pickering, S., 1999. Nanostructured Cerium Oxide: Preparation and Properties of Weakly-agglomerated Powders. *J. Eur. Ceram. Soc.* 19, 1925-1934.
- Dubois J. & Demelin M., 2007. La peau : de la santé à la beauté - notions de dermatologie et de dermocosmétologie. Ed. Privat.208 p. Toulouse
- Duncan, E.J.S., Brown, A., Lundy, P., Sawyer, T.W., Hamilton, M., Hill, I. Conley, J.D., 2002. Site-specific percutaneous absorption of methyl salicylate and vx in domestic swine. *J Appl Toxicol*. 22: 141-148.
- Dupeux M., 2004. Aide mémoire Science des matériaux Ed. Dunod. 336 p. Paris
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7 (2): 88–95.
- Feng, X., Hock, R., Mankel, E., Lingenfelser, D., Völker, B., Mayer, T., Jaegermann, W., 2010. Processing Temperature and Surface Na Content of TiO₂ Nanocrystallites in Films for Solid-State Dye-Sensitized Solar Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*. 114 (47): 20049–20054.
- Feughelman M., 1997. Morphology and properties of hair. *Hair and hair care*. Ed. DH Johnson. New York
- Forster M., 2010. Evaluation de la pénétration cutanée des ingrédients de systèmes dispersés : utilisation combinée des cellules de diffusion et de la microscopie confocale Raman. Thèse de l'université de Lyon 1.
- Franz T.J., 1975. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 64: 190-195.
- Fredriksson T., 1969. Influence of solvents and surface-active agents on the barrier function of the skin towards Sarin II. Increase in rate of absorption. *Acta Derm Venereol*. 49: 55–58
- Gold, M.B., Bongiovanni, R., Scharf, B.A., Gresham, V.C., Woodward, C.L., 1994. Hypochlorite solution as a decontaminant in sulfur mustard contaminated skin defects in the euthymic hairless guinea pig. *Drug Chem Toxicol*. 17: 499-527.
- Gomaa H.M. & Faust S.D., 1972. Chemical Hydrolysis and Oxidation of Parathion and Paraoxon in Aquatic Environments. 111: 189–209.

- Gordon R. & Clarkson E., 2009. Rapid decontamination of chemical warfare agents. In : Gupta R.C. Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Ed. Academic Press Inc. 1198 p.
- Grams Y.Y. & Bouwstra J.A., 2005. Penetration and distribution in human skin focusing on the hair follicle. In: Bronaugh R.L., Maibach H.I., Percutaneous Absorption: Drugs Cosmetics Mechanisms Methods. Ed. Taylor & Francis. 920 p.
- Grissom R.E. & Shah P.V., 1992. Cutaneous absorption of anticholinesterases. In : Ballantyne B. & Marrs T.C. Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Ed. Elsevier. 662 p. Oxford.
- Guillard, C., Kartheuser, B., Lacombe, S., 2011. La photocatalyse : dépollution de l'eau ou de l'air et matériaux autonettoyants. Procédés chimie - bio - agro | Opérations unitaires. Génie de la réaction chimique.
- Hadi A. & Yaacob I.I., 2007. Novel synthesis of nanocrystalline CeO₂ by mechanochemical and water-in-oil microemulsion methods. Materials Letters. 61: 93–96.
- Hall A. & Maibach H.I., 2006. Water decontamination of chemical skin/eye splashes: a critical review. Cutaneous and Ocular Toxicology. 25: 67–83.
- Hamilton, M.G., Hill, I., Conley, J., Sawyer, T.W., Caneva, D.C., Lundy, P.M., 2004. Clinical aspects of percutaneous poisoning by the chemical warfare agent VX: effects of application site and decontamination. Mil Med. 169: 856-862.
- Hamoudi, S., Sayari, A., Belkacemi, K., Bonneviot, L., Larachi, F., 2000. Catalytic wet oxidation of phenol over Pt_xAg_{1-x}MnO₂/CeO₂ catalysts. Catalysis Today. 62 (4): 379–388.
- He, H.-W., Wu, X.-Q., Ren, W., Shi, P., Yao, X., Song, Z.-T., 2012. Synthesis of crystalline cerium dioxide hydrosol by a sol–gel method. Ceramics International. 38: 501-504.
- Henych, J., Štengl, V., Slušná, M., Matys Grygar, T., Janoš, P., Kuráň, P., Štastný, M., 2015. Degradation of organophosphorus pesticide parathion methyl on nanostructured titania-iron mixed oxides. Applied Surface Science. 344: 9–16.
- Herrling, T., Seifert, M., Jung, K. Cerium Dioxide: Future UV-filter in Sunscreen ? SOFW-Journal. 139 (5): 10-14.
- Hirst, S.M., Karakoti, A.S., Tyler, R.D., Sriranganathan, N., Seal, S., Reilly, C.M., 2009. Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. Small. 5 (24), 2848–2856.
- Holgado, J.P., Alvarez, R., Munuera, G., 2000. Study of CeO₂ XPS spectra by factor analysis: reduction of CeO₂. Applied Surface Science. 161 (3-4): 301–315.
- Horie, M., Nishio, K., Fujita, K., Endoh, S., Miyauchi, A., Saito, Y., Iwahashi, H., Yamamoto, K., Murayama, H., Nakano, H., Nanashima, N., Niki, E., Yoshida, Y., 2009. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity toward Cultured Cells. Chemical Research in Toxicology. 22 (3): 543–553.
- Horita, T., Sakai, N., Yokokawa, H., Dokiya, M., Kawada, T., Van Herle, J., Sasaki, K., 1997. Ceria-zirconia composite electrolyte for solid oxide fuel cells. Journal of Electroceramics. 1(2): 155-164.
- Hu, M.Z.-C., Payzant, E.A., Byers, C.H., 2000. Sol–Gel and Ultrafine Particle Formation via Dielectric Tuning of Inorganic Salt–Alcohol–Water Solutions. Journal of Colloid and Interface Science. 222 (1): 20–36.
- Huang, Y., Cai, Y., Qiao, D., Liu, H., 2011. Morphology-controllable synthesis and characterization of CeO₂ nanocrystals. Particuology. 9: 170–173.
- Hui, X., Domoradzki, J.Y., Maibach, H.C., 2012. In vitro study to determine decontamination of 3,5-dichloro-2,4,6-trifluoropyridine (DCTFP) from human skin. Food and Chem. Toxicol. 50, 2496–2502.

- Hurst C.R., 1997. Decontamination. In: Sidell, F.R., Takafuji, E.T., Franz, D.R. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Ed. Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center. 721 p. Washington.
- ICH Q2(R1), Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: methodology, Proceedings of the international conference on harmonization, Geneva, 2005.
- ICH, 1996. Guideline for good clinical practice E6(R1). ICH harmonised tripartite guideline. International Conference on Harmonization, pp 1–57.
- Ioannidou, E., Ioannidi, A., Frontistis, Z., Antonopoulou, M., Tselios, C., Tsikritzis, D., Konstantinou, I., Kennou, S., Kondarides, D.I., Mantzavinos, D., 2016. Correlating the properties of hydrogenated titania to reaction kinetics and mechanism for the photocatalytic degradation of bisphenol A under solar irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental* 188, 65–76.
- Jacobi, U., Kraiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W., Lademann, J., 2007. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*. 13: 19–24.
- Jager, B.V. & Stagg, G.N., 1958. Toxicity of diacetyl monoxime and of pyridine-2-aldoxime methiodide in man. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 102: 203-211.
- Janoš, P., Henych, J., Pelant, O., Pilařová, V., Vrtoch, L., Kormunda, M., Mazanec, K., Štengl, V., 2016. Cerium oxide for the destruction of chemical warfare agents: A comparison of synthetic routes. *Journal of Hazardous Materials*. 304: 259–268.
- Janos, P., Kuran, P., Kormunda, M., Štengl, V., Grygar, T. M., Dosek, M., Stastny, M., Ederer, J., Pilarova, V., Vrtoch, L., 2014. Cerium dioxide as a new reactive sorbent for fast degradation of parathion methyl and some other organophosphates. *J. of Rare Earths*. 32 (4): 360-369.
- John, H., Balszuweit, F., Kehe, K. (2009). Toxicokinetics of chemical warfare agents: nerve agents and vesicants. In: Gupta R.C., *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*. Ed. Elsevier. 1198 p. London.
- Jokanovic, M., Kosanovic, M., Brkic, D., Vukomanovic, P., 2011. Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: an overview. *Clinical neurology and neurosurgery*. 113(1): 7-10.
- Joosen, M. J.A., Van der Schans, M. J., Van Helden, H. P. M., 2010. Percutaneous exposure to the nerve agent VX: Efficacy of combined atropine, obidoxime and diazepam treatment. *Chemico-Biological Interactions*. 188 : 255–263.
- Josse, D., Barrier, G., Bifarella, R., Cruz, C., 2013. In vitro skin decontamination effectiveness of VX by using absorbents. In: Brain K.B. & Chilcott R.P. *Advances in Dermatological Sciences*. Ed. Royal Society of Chemistry, 474 pages. Cambridge
- Josse, D., Boudry, I., Naud, N., 2006. Protection cutanée vis-à-vis des agents organophosphorés et de l'ypérite au soufre. Bilan et perspectives. In : Loudes. *Médecine et armées. Revue du Service de santé des armées*. Tome 34 (1).
- Josse, D., Wartelle, J., Cruz, C., 2015. Showering effectiveness for human hair decontamination of the nerve agent VX. *Chemico-Biological Interactions*. 232: 94–100.
- Kadar, T., Fishbine, E., Meshulam, J., Sahar, R., Amir, A., Barness, I., 2003. A topical skin protectant against chemical warfare agents. *Isr. Med. Assoc. J.* 5: 717-719.
- Kalakuntla, R.K., Wille, T., Le Provost, R., Letort, S., Reiter, G., Müller, S., Thiermann, H., Worek, F., Gouhier, G., Lafont, O., Estour, F., 2013. New modified β -cyclodextrin derivatives as detoxifying agents of chemical warfare agents (I). Synthesis and preliminary screening: Evaluation of the detoxification using a half-quantitative enzymatic assay. *Toxicology Letters*. 216: 200–205.

- Kaneko, K., Inoke, K., Freitag, B., Hungria, A.B., Midgley, P.A., Hansen, T.W., Zhang, J., Ohara, S., Adschiri, T., 2007. Structural and Morphological Characterization of Cerium Oxide Nanocrystals Prepared by Hydrothermal Synthesis. *Nano Letters*. 7: 421–425.
- Karalliedde L. & Henry J. A., 1993. Effects of Organophosphates on Skeletal Muscle. *Hum Exp Toxicol*. 12: 289-296.
- Kehe, K., Balszuweit, F., Steinritz, D., Thiermann, H., 2009. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*. 263(1): 12-19.
- Kim, K., Tsay, O.G., Atwood, D.A., Churchill, D.G., 2011. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews*. 111: 5345–5403.
- Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm*, 2013, 447: 12-21.
- Larese Filon, F., Mauro, M., Adami, G., Bovenzi, M., Crosera, M., 2015. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 72, 310–322.
- Lauer, A.C., Elder, J.T., Weiner N.D., 1997. Evaluation of the hairless rat as a model for in vivo percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci*. 86: 13–18.
- Lehn J.M., 1997. *La chimie supramoléculaire: Concepts et perspectives*. Ed. De Boeck Supérieur. Bruxelles. 288 p.
- Lepick O., 1998. *La Grande Guerre chimique 1914-1918*. Ed. Presses Universitaires de France, 384 p, Paris
- Levitin, H.W., Siegelson, H.J., Dickinson, S., Halpern, P., Haraguchi, Y., Nocera, A., Turineck, D., 2003. Decontamination of mass casualties re-evaluating existing dogma. *Prehospital and Disaster Medicine*. 18: 200–207.
- Li, R., 2002. Synthesis and UV-shielding properties of ZnO- and CaO-doped CeO₂ via soft solution chemical process. *Solid State Ionics*. 151 (1-4): 235–241.
- Lillie, S.H., Hanlon, E., Kelly, J.M., Rayburn, B.B., 2005. Potential military chemical/biological agents and compounds. *Multiservices Tactics Techniques and Procedures*.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 23: 3–25.
- Liu, J., Zhao, Z., Wang, J.Q., Xu, C.M., Duan, A.J., Jiang, G.Y., 2008. The highly active catalysts of nanometric CeO₂-supported cobalt oxides for soot combustion. *Applied Catalysis B: Environmental*. 84(1-2): 185–195.
- Loke, W.K., U, S.H., Lim, J.S., Tay, G.S., Koh, C.H., 1999. Wet decontamination-induced stratum corneum hydration effects on the skin barrier function to diethylmalonate. *Journal of Applied Toxicology*. 19: 285–290.
- Lombard A., 2014. Comment se traduit l'action localisée des substances chimiques sur l'organisme ? *Environnement - Sécurité | Sécurité et gestion des risques*. 1170.
- MacDougall, D., Crummett, Warren B.; *et al.*, 1980. Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. *Anal. Chem*. 52: 2242–49.
- Magnusson, B., Pugh, W., Roberts, M., 2004. Simple rules defining the potential of compounds for transdermal delivery or toxicity. *Pharm. Res*. 21: 1047–1054.
- Mai, H.-X., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Si, R., Feng, W., Zhang, H.-P., Liu, H.-C., Yan, C.-H., 2005. Shape-Selective Synthesis and Oxygen Storage Behavior of Ceria Nanopolyhedra, Nanorods, and Nanocubes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 109 : 24380–24385.

- Maibach, H.I., Feldman, R.J., Milby, T.H., Serat, W.F., 1971. Regional variation in percutaneous penetration in man. *Pesticides. Archives of environmental health.* 23(3): 208-211.
- Manoli, F., Kanakis, J., Malkaj, P., Dalas, E., 2002. The effect of aminoacids on the crystal growth of calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth.* 236 (1-3): 363–370.
- Marrs T.T., Maynard R.L., Sidell F. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment.* 2nde Ed. John Wiley & Sons. 750 p.
- Masui, T., Fujiwara, K., Machida, K., Adachi, G., Sakata, T., Mori, H., 1997. Characterization of Cerium(IV) Oxide Ultrafine Particles Prepared Using Reversed Micelles. *Chemistry of Materials.* 9: 2197–2204.
- McDermot, H.L., Finkbeiner, A.J., Wills, W.J., Heggie, R.M., 1967. The enhancement of penetration of an organophosphorus anticholinesterase through guinea pig skin by dimethyl sulfoxide. *Can J Physiol Pharmacol.* 45: 299–303
- Meek, E.C., Chambers, H.W., Coban, A., Funck, K.E., Pringle, R.B., Ross, M.K., Chambers, J.E., 2012. Synthesis and in vitro and in vivo inhibition potencies of highly relevant nerve agent surrogates. *Toxicol Sci.* 126(2) :525-33.
- Merrick, M.V., Simpson, J.D., Liddell, S., 1982. Skin decontamination a comparison of four methods. *British Journal of Radiology.* 55: 317–318.
- Millerioux, J., Cruz, C., Bazire, A., Polly, V., Lallement, G., Lefeuvre, L., Josse, D., 2009a. Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicology in Vitro.* 23, 127–133.
- Millerioux, J., Cruz, C., Bazire, A., Lallement, G., Lefeuvre, L. Josse, D., 2009b. In vitro selection and efficacy of topical skin protectants against the nerve agent VX. *Toxicol In Vitro.* 23: 539-545.
- Millot N. & Nièpce J.-C., 2014. *Cristallographie géométrique : Cours, exercices et problèmes corrigés.* Ed. Lavoisier. 266 p. Paris
- Mircioiu, C., Voicu, V. A., Ionescu, M., Miron, D. S., Radulescu, F. S., C. Nicolescu, A., 2013. Evaluation of in Vitro Absorption, Decontamination and Desorption of Organophosphorous Compounds from Skin and Synthetic Membranes. *Toxicology Letters.* 219: 99–106.
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., Kuca, K., 2015. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 38, 32–36
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., Novotny, L., Kuca, K., 2011. Method of static diffusion cells for assessment of pesticides skin permeation. *Mil. Med. Sci. Lett.* 80, 46-51.
- Misík, J., Pavliková, R., Kuča, K., 2013. Percutaneous Toxicity and Decontamination of Soman, Vx, and Paraoxon in Rats Using Detergents. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology.* 64:211-217.
- Mogensen, M., 2000. Physical, chemical and electrochemical properties of pure and doped ceria. *Solid State Ionics.* 129: 63–94.
- Moody R.P. & Maibach H.I., 2006. Skin decontamination: importance of the wash-in effect. *Food and Chemical Toxicology.* 44: 1783–1788.
- Munro, N. B., Talmage, S. S., Griffin, G. D., Waters, L. C., Watson, A. P., King, J. F., Hauschild, V., 1999. The Sources, Fate, and Toxicity of Chemical Warfare Agent Degradation Products. *Environ. Health Perspect.* 107 (12): 933-974.
- Munro, N.B., Ambrose, K.R., Watson, A.P., 1994. Toxicity of the organophosphate chemical warfare agents GA, GB and VX: implications for public protection. *Environ Health Perspect.* 102:8–38.

- Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H., 2000. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical science & technology today*. 3(9): 318-326.
- Naldoni, A., Allieta, M., Santangelo, S., Marelli, M., Fabbri, F., Cappelli, S., Bianchi, C.L., Pan, C., Zhang, D., Shi, L., 2008. CTAB assisted hydrothermal synthesis, controlled conversion and CO oxidation properties of CeO₂ nanoplates, nanotubes, and nanorods. *Journal of Solid State Chemistry*. 181: 1298–1306.
- Niemann, B., Veit, P., Sundmacher, K., 2008. Nanoparticle Precipitation in Reverse Microemulsions: Particle Formation Dynamics and Tailoring of Particle Size Distributions. *Langmuir*. 24 (8): 4320–4328.
- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L., Wang, X., Kolattukudy, P., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*. 73(3): 549–559.
- Nultsch W., 1998. *Botanique générale*. Ed. Boeck Supérieur. 602 p. Paris.
- OCDE. Organisation for economic co-operation and development. Guideline for the testing of chemicals. skin absorption: *in vitro* method. OECD, Paris (2004).
- Ogiso, T., Shiraki, T., Okajima, K., Tanino, T., Iwaki, M., Wada, T., 2002. Transfollicular drug delivery: penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins *in vitro*. *J. Drug Target*. 10: 369–378.
- Ohta, H., Ohmori, T., Suzuki, S., Ikegaya, H., Sakurada, K., and Takatori, T., 2006. New safe method for preparation of sarin-exposed human erythrocytes acetylcholinesterase using non-toxic and stable sarin analogue isopropyl p-nitrophenyl methylphosphonate and its application to evaluation of nerve agent antidotes. *Pharmaceut. Res*. 23; 2827–2833.
- OIAC. "Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques". www.opcw.org/fr: consulté le 3 Juin 2016.
- Opresko, D. M., Young R.A., Faust, R.A., Talmage, S.S., Watson, A.P., Ross, R.H., Davidson, K.A., King, J., 1998. Chemical warfare agents: Estimating oral doses. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 156 : 1–183.
- Pan, C., Zhang, D., Shi, L., 2008. CTAB assisted hydrothermal synthesis, controlled conversion and CO oxidation properties of CeO₂ nanoplates, nanotubes, and nanorods. *Journal of Solid State Chemistry*. 181: 1298–1306.
- Pauku, Y., Michalkova, A., Leszczynski, J., 2009. Quantum-Chemical Comprehensive Study of the Organophosphorus Compounds Adsorption on Zinc Oxide Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*. 113: 1474–1485.
- Pesic, M., Podolski-Renic, A., Stojkovic, S., Matovic, B., Zmejkoski, D., Kojic, V., Bogdanovic, G., Pavicevic, A., Mojovic, M., Savic, A., Milenkovic, I., Kalauzi, A., Radotic, K., 2015. Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity. *Chemico-Biological Interactions*. 232: 85-93.
- Phoka, S., Laokul, P., Swatsitang, E., Promarak, V., Seraphin, S., Maensiri, S., 2009. Synthesis, structural and optical properties of CeO₂ nanoparticles synthesized by a simple polyvinyl pyrrolidone (PVP) solution route. *Materials Chemistry and Physics*. 115 (1): 423–428.
- Pierscionek, B.K., Keenan, J., Yasseen, A., Colhoun, L.M., Li, Y.B., Schachar, R.A., Chen, W., 2010. CeO₂ Nanoparticles have No Detrimental Effect on Eye Lens Proteins. *Current Analytical Chemistry*. 6 (2): 172-176.
- Pilgram, G.S.K., Engelsma-van Pelt, A.M., Bouwstra, J.A., Koerten, H.K., 1999. Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organisation studied in relation to depth and temperature. *J Invest Dermatol*. 113: 403–409.

- Pournajaf, R., Hassanzadeh-Tabrizi, S.A., Jafari, M., 2014. Reverse microemulsion synthesis of CeO₂ nanopowder using polyoxyethylene(23)lauryl ether as a surfactant. *Ceramics International*. 40: 8687–8692.
- Prasad, G.K., Ramacharyulu, P.V.R.K., Kumar, J.P., Srivastava, A.R., Singh, B., 2012. Photocatalytic degradation of paraoxon-ethyl in aqueous solution using titania nanoparticulate film. *Thin Solid Films*. 520: 5597–5601.
- Praveen Kumar, J., Prasad, G.K., Ramacharyulu, P.V.R.K., Garg, P., Ganesan, K., 2013. Mesoporous CuO–ZnO binary metal oxide nanocomposite for decontamination of sulfur mustard. *Materials Chemistry and Physics*. 142: 484–490.
- Psaro, R., Dal Santo, V., 2012. Effect of Nature and Location of Defects on Bandgap Narrowing in Black TiO₂ Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 134, 7600–7603.
- Ramacharyulu, P.V.R.K., Praveen Kumara, J., Prasada, G.K., Singha, B., Sreedharb, B., Dwivedic, K., 2014. Sunlight assisted photocatalytic detoxification of sulfur mustard on vanadium ion doped titania nanocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 387: 38–44.
- Ramirez-Martinez, J.M., Bay, C., Tramond, B., Reiss, J.P., Dupeyron, R., 1992. Décontamination de blessés chimiques : expérience de la division Daguet. *Méd Armées*. 6: 20 – 61.
- Rawlings, A. & Matts, P., 2005. Stratum corneum moisturization at the molecular level: An update in relation to the dry skin cycle. *Journal of Investigative Dermatology*. 124 (6):1099-1110.
- Recommandation relative à la définition des nanomatériaux n° 2011/696/UE du 18 Octobre 2011.
- Reifenrath, W.G., Mershon, M.M., Brinkley, F.B., Miura, G.A., Broomfield, C.A., Cranford, H.B., 1984. Evaluation of diethyl malonate as a simulant for 1,2,2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate (soman) in shower decontamination of the skin. *J Pharm Sci*. 73: 1388-1392.
- Renshaw B. 1946. Mechanisms in production of cutaneous injuries by sulfur and nitrogen mustards. In: Division 9, National Defense Research Committee, comp. *Chemical Warfare Agents, and Related Chemical Problems. Summary Technical Report of Division 9, NDRC*. Washington, DC: Office of Scientific Research and Development.
- Renuka, N.K., 2012. Structural characteristics of quantum-size ceria nano particles synthesized via simple ammonia precipitation. *Journal of Alloys and Compounds*. 513: 230–235.
- Robbins C., 2002. Chemical and physical behavior of human hair. *Chemical and physical behavior of human hair*. Ed. Springer-Verlag. 473 p. New York.
- Roberts M.S. & Walters K.A., 2008. Human skin morphology and dermal absorption. *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Informa Healthcare. p. 1-15.
- Rolland, P., Bolzinger, M.A., Cruz, C., Briançon, S., Josse, D., 2011. Human scalp permeability to the chemical warfare agent VX. *Toxicol. In Vitro*. 25, 1974-1980.
- Rolland, P., Bolzinger, M.-A., Cruz, C., Josse, D., Briançon, S., 2013. Hairy skin exposure to VX in vitro: Effectiveness of delayed decontamination. *Toxicology in Vitro*. 27, 358–366.
- Romano J.A. Jr. & Filbert, M.G., 1999. Historical overview of topical skin protectant development. *J Appl Toxicol*, 19.
- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Maibach, H.I., 1999. Stripping method for measuring percutaneous absorption in vivo. In: Bronaugh RL & Maibach HI. *Percutaneous absorption: drugs cosmetics mechanisms methodology*, Ed. Taylor & Francis. 920 p. New York.

- Rousseau, J.M., Ruttimann, M., Brinquin, L., 2000. Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 19(8): 588-598.
- Russell, A.J., Berberich, J.A., Drevon, G.F., Koepsel, R.R., 2003. Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annual review of biomedical engineering*. 5: 1-27.
- Saïssy J.M. & Rüttimann M., 1999. Intoxications par les organophosphorés. *Consensus d'actualisation SFAR - Médecine d'urgence*.
- Saleh, M.A., Ahmed, A.E., Kamel, A., Dary, C., 1997. Determination of the distribution of malathion in rats following various routes of administration by whole-body electronic autoradiography. *Toxicol Ind Health*. 13(6): 751–758.
- Savio, A.K.P.D., Fletcher, J., Smith, K., Iyer, R., Bao, J.M., Robles Hernández, F.C., 2016. Environmentally effective photocatalyst CoO–TiO₂ synthesized by thermal precipitation of Co in amorphous TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental*. 182: 449–455.
- Sawyer, T.W., Mikler, J., Worek, F., Reiter, G., Thiermann, H., Tenn, C., Weatherby, K. Bohnert, S., 2011. The therapeutic use of localized cooling in the treatment of vx poisoning. *Toxicol. Lett*. 204: 52-56.
- Schmook, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A., 2001. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*. 215: 51-56.
- Senthilnathan J. & Philip, L., 2010. Removal of Mixed Pesticides from Drinking Water System Using Surfactant-Assisted Nano-TiO₂. *Water, Air, & Soil Pollution*. 210: 143–154.
- Sharma N. & Kakkar R., 2013. Recent advancements on warfare agents/metal oxides surface chemistry and their simulation study. *Adv. Mat. Lett*. 4(7), 508-52.
- Sidell F. R. 1997. Nerve Agents. In : Sidell F.R., Takafuji, A. T., Franz, D.R. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Ed. Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center. 721 p. Washington.
- Sidell F.R. & Borak J., 1992. Chemical warfare agents: II. Nerve agents. *Annals of emergency medicine*. 21(7): 865-871.
- Sim V.M., 1962. Variability of Different Intact Human-Skin Sites to the Penetration of VX. U.S. Army Chemical Research and Development Laboratories Technical Report, CRDLR 3122, AD 271163, Army Chemical Center, MD.
- Sim, V. M. & J. L. Stubbs. 1960. VX Percutaneous Studies in Man (U). U.S. Army Chemical Research and Development Laboratories Technical Report, CRDLR 3015, AD 318533, Army Chemical Center, MD.
- Singh P. & Roberts M.S., 1994. Effects of vasoconstriction on dermal pharmacokinetics and local tissue distribution of compounds. *J Pharm Sci*. 83(6): 783–791.
- Singh, S., Kumar, A., Karakoti, A., Seal, S., Self, W.T., 2010. Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Molecular BioSystems*. 6 (10): 1813-1820.
- Singh, S., Zhao, K., Singh, J., 2002. In vitro permeability and binding of hydrocarbons in pig ear and human abdominal skin. *Drug Chem Toxicol*. 25(1): 83-92.
- Sirin, G.S., Zhou, Y., Lior-Hoffmann, L., Wang, S., Zhang, Y., 2012. Aging mechanism of soman inhibited acetylcholinesterase. *J Phys Chem B*. 116(40):12199-12207.
- Small MJ., 1984. Compounds formed from the chemical decontamination of HD, GB, and VX and their environmental fate. *Tech Rpt 8304; AD A149515*. Fort Detrick, MD:U.S. Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory.

- Stehle, R., Schulreich, C., Wellert, S., Gäb, J., Blum, M.-M., Kehe, K., Richardt, A., Lapp, A., Hellweg, T., 2014. An enzyme containing microemulsion based on skin friendly oil and surfactant as decontamination medium for organo phosphates: Phase behavior, structure, and enzyme activity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 413: 127–132.
- Štengl V., Matys Grygar T., Opluštil F., Němec T., 2012. Ge⁴⁺ Doped TiO₂ for Stoichiometric Degradation of Warfare Agents. *Journal of Hazardous Materials*. 227–228: 62–67.
- Tan, J.P.Y., Tan, H.R., Boothroyd, C., Foo, Y.L., He, C.B., Lin, M., 2011. Three-Dimensional Structure of CeO₂ Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*. 115: 3544–3551.
- Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B., Breton, P., 2007. Skin decontamination of mustards and organophosphates: comparative efficiency of RSDL and fuller's earth in domestic swine. *Hum Exp Toxicol*. 26: 135-141.
- Teichmann, A., Jacobi, U., Ossadnik, M., Richter, H., Koch, S., Sterry, W., Lademann, J., 2005. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J. Invest. Dermatol*. 125: 264-269.
- Teng, F., Li, M., Gao, C., Zhang, G., Zhang, P., Wang, Y., Chen, L., Xie, E., 2014. Preparation of black TiO₂ by hydrogen plasma assisted chemical vapor deposition and its photocatalytic activity. *Applied Catalysis B: Environmental*. 148-149: 339–343.
- Thabet, H., Brahmi, N., Kouraïchi, N., Elghord, H., Amamou M., 2009. Intoxications par les pesticides organophosphorés : nouveaux concepts. *Réanimation*. 18 : 633—639.
- Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO₂ Nanoparticles for Escherichia coli. *Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism. Environmental Science & Technology*. 40 (19) : 6151–6156.
- Timperley C., 2014. *Best Synthetic Methods: Organophosphorus (V) Chemistry*. Ed. Academic Presse. 786 p. Newnes.
- Tiseanu, C., Parvulescu, V.I., Boutonnet, M., Cojocaru, B., Primus, P.A., Teodorescu, C.M., Solans, C., Dominguez, M.S., 2011. Surface versus volume effects in luminescent ceria nanocrystals synthesized by an oil-in-water microemulsion method. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 13: 17135.
- Tok, A.I.Y., Boey, F.Y.C., Dong, Z., Sun, X.L., 2007. Hydrothermal synthesis of CeO₂ nanoparticles. *J. of Mat. Process. Tech*. 190 : 217–222.
- Trovarelli A. & Fornasiero P, 2013. *Catalysis by Ceria and Related Materials*. Ed. Imperial College Press. 908 p. London.
- Trovarelli, A., De Leitenburg, C., Boaro, M., Dolcetti, G., 1999. The utilization of ceria in industrial catalysis. *Catalysis Today*. 50: 353–367.
- Truffault L., 2010. *Synthèse et caractérisation de nanoparticules à base d'oxydes de cérium et de fer pour la filtration des UV dans les produits solaires*. Thèse de l'Université d'Orléans.
- Tsunekawa, S., Sahara, R., Kawazoe, Y., Kasuya, A., 2000. Origin of the blue shift in ultraviolet absorption spectra of nanocrystalline CeO_{2-x} particles. *Materials Transactions*. 41 (8): 1104-1107.
- Vallet, V., Cruz, C., Josse, D., Bazire, A., Lallement, G., Boudry, I., 2007. In vitro percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin. *Toxicol In Vitro*. 21(6): 1182-90.
- Vallet, V., Cruz, C., Licausi, J., Bazire, A., Lallement, G., Boudry, I., 2008. 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.

- Van Hooidek, C., Ceulen, B., Bock, J., Van Genderen, J., 1983. CW Agents and the Skin: Penetration and Decontamination. Pp. 153-160 in Proceedings of the International Symposium on Protection against Chemical Warfare Agents. Umea, Sweden: National Defence Research Institute.
- Verma, M., Chandra, R., Gupta, V.K., 2016. Synthesis and characterization of magnetron sputtered ZrO₂ nanoparticles: Decontamination of 2-chloro ethyl ethyl sulphide and dimethyl methyl phosphonate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 4: 219–229.
- Verma, M., Gupta, V.K., Dave, V., Chandra, R., Prasad, G.K., 2014. Synthesis of sputter deposited CuO nanoparticles and their use for decontamination of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES). *Journal of Colloid and Interface Science*. 438: 102–109.
- Villa, A.F., Houze, P., Monier, C., Risède, P., Sarhan, H., Borron, S.W., Mégarbane, B., Garnier, R., Baud, F.J., 2007. Toxic doses of paraoxon alter the respiratory pattern without causing respiratory failure in rats. *Toxicology*. 232: 37–49.
- Vivien, B., Poignant, J., Marsan, J.F., Coignard, H., Nahon, M., Lejay, M., Delpech, P., Carlic P., 2012. Prise en charge d'une victime NRBC. *Le Congrès Médecins. Les Essentiels*.
- Vivier L. & Duprez, D., 2010. Ceria-Based Solid Catalysts for Organic Chemistry. *ChemSusChem*. 3, 654–678.
- Vucemilović, A., Hadzija, M., Jukić, I., 2008. Efficacy of mineral cationic carrier against sulphur mustard in skin decontamination. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 59: 289-293.
- Vucemilović, A., Hadzija, M., Jukić, I., 2009. Skin decontamination with mineral cationic carrier against sarin determined in vivo. *Arh Hig Rada Toksikol.* 60: 173-177.
- Wagner, G.W., Bartram, P.W., Koper, O., Klabunde, K.J., 1999. Reactions of VX, GD, and HD with Nanosize MgO. *The Journal of Physical Chemistry B*. 103: 3225–3228.
- Wang, S., Gu, F., Li, C., Cao, H., 2007. Shape-controlled synthesis of CeOHCO₃ and CeO₂ microstructures. *J. Cryst. Growth*. 307: 386-394.
- Wang, T. & Sun, D., 2008. Preparation and characterization of nanometer-scale powders ceria by electrochemical deposition method. *Mater. Res. Bull.* 43(7): 1754-1760.
- Wang, Z.L. & Feng, X., 2003. Polyhedral Shapes of CeO₂ Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 107: 13563–13566.
- Watson A., Opresko D. Hauschild V., 2003. Evaluation of Chemical Warfare Agent Percutaneous Vapor Toxicity: Derivation of Toxicity Guidelines for Assessing Chemical Protective Ensembles, ORNL/TM-2003/180.
- Wester R.C. & Maibach H.I., 1993. Topical Drug Delivery: Percutaneous Absorption. In Shah, V., Maibach, H.I., Jenner J. Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration. Ed. Springer. 402 p. New York & London.
- Wester R.C. & Maibach H.I., 1999. Regional variation in percutaneous absorption. In: Bronaugh RL & Maibach HI. Percutaneous absorption: drugs cosmetics mechanisms methodology, Ed. Taylor & Francis. 920 p. New York.
- Wester, R.C., Hui, X., Landry, T., Maibach, H.I., 1999. In vivo skin decontamination of methylene bisphenyl isocyanate (MDI): soap and water ineffective compared to polypropylene glycol, polyglycol-based cleanser, and corn oil. *Toxicological Sciences*. 48: 1–4.
- Wester, R.M., Tanojo, H., Maibach, H.I., Wester, R.C., 2000. Predicted Chemical Warfare Agent VX Toxicity to Uniformed Soldier Using Parathion in Vitro Human Skin Exposure and Absorption, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 168 (2): 149-152.
- Williams A.C. & Barry B.W., 2012. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64: 128–137.

- Worek, F., Seeger, T., Reiter, G., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J.L., Aggarwal, N., Thiermann, H., Tawfik, D.S., 2014. Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: A proof-of-concept study. *Toxicology Letters*. 231(1):45-54.
- World Medical Association, 2004. Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. Ferney-Voltaire, World Medical Association, pp 1–5.
- Wu, H., Ramachandran, C., Weiner, N.D., Roessler, B.J., 2001. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions, *Int. J. Pharm.* 220: 63–75.
- Yang, Y.-C., 1999. Chemical Detoxification of Nerve Agent VX. *Accounts of Chemical Research*. 32, 109–115.
- Yang, Y.C., Baker, J.A., Ward, J.R., 1992. Decontamination of chemical warfare agents. *Chemical Reviews*. 92 (8): 1729–1743.
- Yao, H., 1984. Ceria in automotive exhaust catalysts I. Oxygen storage. *Journal of Catalysis*. 86, 254–265.
- Zenerino, A., Boutard, T., Bignon, C., Amigoni, S., Josse, D., Devers, T., Guittard, F., 2015. New CeO₂ nanoparticles-based topical formulations for the skin protection against organophosphates. *Tox. Reports*. 2: 1007-1013.
- Zhang, Y., Andersson, S., Muhammed, M., 1995. Nanophase catalytic oxides: I. Synthesis of doped cerium oxides as oxygen storage promoters. *Applied Catalysis B: Environmental*. 6 (4): 325–337.
- Zhou, K., Yang, Z., Yang, S., 2007. Highly Reducible CeO₂ Nanotubes. *Chemistry of Materials*. 19: 1215–1217.